

В. В. РЕВИН Г. В. МАКСИМОВ О. Р. КОЛЬС

БИОФИЗИКА

УЧЕБНИК

*Допущено Министерством образования Российской Федерации
в качестве учебника для студентов высших учебных заведений, обу-
чающихся по направлению 510600 «Биология» и специальностям
011600 «Биология», 011700 «Антропология», 011800 «Зоология»,
011900 «Ботаника», 012000 «Физиология», 012100 «Генетика», 012200
«Биофизика», 012300 «Биохимия», 012400 «Микробиология»*

САРАНСК
ИЗДАТЕЛЬСТВО МОРДОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
2002

УДК 576.32/.36(075.8)
ББК Е071
Р321

Р е ц е н з е н т ы:

кафедра биофизики и биотехнологии Воронежского университета;
доктор биологических наук *А. А. Каменский*;
доктор физико-математических наук *Г. Ю. Ризниченко*

Под редакцией члена-корреспондента РАН профессора *А. Б. Рубина*

Ревин В. В.

Р321 Биофизика: Учеб. / В. В. Ревин, Г. В. Максимов, О. Р. Кольс;
Под ред. проф. А. Б. Рубина. — Саранск: Изд-во Мордов.
ун-та, 2002. — 156 с.
ISBN 5—7103—0719—X

В учебнике изложены современные представления о биофизике клетки. Приведены основные теоретические и экспериментальные подходы к исследованию биофизических процессов в функционирующей клетке, ее органеллах и в первую очередь в биологических мембранах. Основное внимание уделено важнейшим биологическим процессам, таким, как проницаемость, биоэлектроток, клеточная подвижность и рецепция, фотосинтез. Рассматриваются вопросы клеточной и мембранной патологии.

Предназначен для студентов и преподавателей биологических факультетов университетов, а также для аспирантов и научных работников, занимающихся изучением физико-химических основ процессов жизнедеятельности.

УДК 576.32/.36(075.8)
ББК Е071

ISBN 5—7103—0719—X

© В. В. Ревин, Г. В. Максимов,
О. Р. Кольс, 2002

ВВЕДЕНИЕ

Биофизика — наука о наиболее простых и фундаментальных взаимодействиях, лежащих в основе биологических процессов. Подразумевается взаимодействие на всех уровнях биологических систем — от клеточных органелл до популяций.

Как правило, при исследовании биологических систем выделяют два направления:

- изучение формы и многообразия живого — этим занимаются анатомия, морфология, гистология и цитология;
- изучение процессов, обеспечивающих жизнедеятельность организма, т. е. поступление, распределение и выведение веществ, метаболизм, синтез, а также энергообеспечение этих процессов, — этим занимаются физиология, биохимия и биофизика.

Необходимо отметить, что названные дисциплины связаны со всем многообразием живой природы и стремятся выявить общие принципы функционирования различных организмов, учитывая при этом их специфику и своеобразие.

Конечная цель изучения биологической системы — расшифровка механизмов функционирования организма, выявление взаимосвязанных изменений структуры и функции на всех уровнях — от субклеточного до популяционного. Биофизика является биологической дисциплиной, изучающей физико-химические взаимодействия в самом широком аспекте.

Возникновение биофизики во многом связано с вопросами, поставленными физиологией. Физиология исследует функции органов, место и роль этих функций в обеспечении жизнедеятельности, в то время как задача биофизики — изучение первичных механизмов, лежащих в основе физиологических функций.

Значительная часть биофизических исследований выполнена на субклеточном и молекулярном уровнях, поэтому биофизика чаще, чем другие биологические дисциплины, использует результаты и методы физики, химии и физической химии. Это важно для понимания основополагающих биологических процессов. Хотя исследователи биофизики и физиологи имеют общую цель — понимание механизмов жизнедеятельности, конкретная роль их различна. Как уже отмечалось, любой организм, относящийся к растительному или животному царству, исследуют в двух аспектах — его строение и протекающие в нем

процессы. У разных видов могут быть большие различия в организации систем органов и в их работе. Однако в первичных процессах, лежащих в основе физиологических функций, обнаруживается большое сходство, и данными процессами занимается биофизика. Поэтому можно считать, что биофизика не имеет своего постоянного объекта, а имеет предмет исследования.

Таким образом, физиология непосредственно связана с данным видом объектов исследования, а биофизика изучает физико-химические процессы, присущие разным видам живого, т. е. выявляет общие закономерности на молекулярном уровне.

Целью биофизического исследования является первичный механизм функционирования как отдельной клетки, так и ее оргanelл и молекул при естественных условиях функционирования биосистемы. Мы уделим особое внимание рассмотрению основных биофизических механизмов функционирования клетки в нормальных и экстремальных (патологических) условиях. Предполагается, что читатель достаточно полно знаком с гистологией и особенно цитологией. В данной книге сведения о строении, структуре клеток, химическом составе приводятся лишь в качестве напоминания, поскольку они необходимы для обсуждения задач биофизики и для обоснования применяемых методов исследования.

Конкретные задачи биофизики клетки — расшифровка первичных молекулярных процессов, структурно-метаболических перестроек и т. д. — требуют использования новейших физических, химических и физико-химических методов, адаптированных к работе с биологическими объектами в условиях, близких к естественным. В результате знакомства с учебником читатель должен твердо уяснить, какие именно сведения о клетке и какую информацию можно получить с помощью различных методов. Безусловно, в одной книге полностью изложить все вопросы современной биофизики клетки невозможно. Мы рассмотрим узловые моменты, знание которых необходимо для овладения основами курса общей биофизики.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ — аденозиндифосфат	МП — мембранный потенциал
цАМФ — циклический аденозин- монофосфат	НАД ⁺ — окисленный никотинамид- адениндинуклеотид
АТФ — аденозинтрифосфат	НАД·Н — восстановленный нико- тинамидадениндинуклеотид
АФК — активные формы кисло- рода	НАДФ ⁺ — окисленный никотин- амидадениндинуклеотидфосфат
АХ — ацетилхолин	НАДФ·Н — восстановленный ни- котинамидадениндинуклеотидфос- фат
АХР — ацетилхолиновый рецептор	НК — нервные клетки
БЛМ — бислойная липидная мем- брана	ПД — потенциал действия
БМ — биологическая мембрана	ПЗК — потенциалзависимый канал
БРК — водорасщепляющий комп- лекс	ПМ — плазматическая мембрана
ГВ — гидрофобные взаимодействия	ПНС — периферическая нервная система
ГК — глиальные клетки	ПП — потенциал покоя
цГМФ — циклический гуанидин- монофосфат	РВ — ритмическое возбуждение
ГТГ — гипертриглицеридемия	РКР — резонансное комбинацион- ное рассеяние
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота	РНК — рибонуклеиновая кислота
ЖК — жирная кислота	СД — сахарный диабет
ИЛ — интерлейкин	ССИ — сверхслабое излучение
ИНСД — инсулинонезависимый сахарный диабет	СТХ — сакситоксин
КЛСМ — конфокальная лазерная сканирующая микроскопия	ТТХ — тетродотоксин
КР — комбинационное рассеяние	ТЭА — тетраэтиламмоний
ЛД — латеральная диффузия	Ф _h — фосфор неорганический
ЛПВП — липопротеины высокой плотности	ФДА — флуоресцеиндиацетат
ЛПНП — липопротеины низкой плотности	ФИ-ФЛС — фосфоинозитид-специ- фичная фосфолипаза С
	ФЛ — фосфолипиды
	ФС1 — фотосистема 1
	ФС2 — фотосистема 2

ФЭУ — фотоэлектронный умножитель

ХТЦ — хлортетрациклин

ЦНС — центральная нервная система

ЦЭТ — цепь электронного транспорта

ШК — шванновская клетка

ЭВС — электронно-возбужденное состояние

ЭКМ — экстраклеточный матрикс

ЭПР — электронный парамагнитный резонанс

ЭР — эндоплазматический ретикулум

ЯМР — ядерный магнитный резонанс

Глава 1

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ КЛЕТКИ

Клетка (лат. *cellula*, *cytus*) — основная структурно-функциональная единица биологии и элементарная биологическая система. В природе существуют растительные и животные одноклеточные и многоклеточные организмы*. Размер эукариотных клеток, из которых состоят многоклеточные организмы, варьирует в основном в диапазоне 10 — 100 мкм; однако встречаются и гораздо более крупные клетки (например, клетки водоросли *Nitella* достигают иногда длины 25 см) и даже части клеток (например, аксон нервной клетки позвоночных может иметь протяженность 1 м и более). Общее число клеток в многоклеточном организме определить, конечно, невозможно. Он функционирует благодаря наличию разных типов специализированных клеток, объединенных в функциональные комплексы, ткани и органы, связь между которыми осуществляется за счет межклеточных взаимодействий, гуморальной или нервной системы. У позвоночных животных и человека известно более 200 типов клеток. Главные из них — клетки эпителия, мышечные клетки, клетки соединительной ткани, нервные клетки и клетки крови.

Принимая во внимание многообразие клеток, необходимо учитывать, что, согласно Р. Вирхову (R. Virchow), «всякая клетка от клетки», т. е. принципы развития клеток всех видов едины. Любой организм начинает развитие от одной клетки — зиготы, имеющей полный набор хромосом, характерный и постоянный для каждого вида организма. В ходе индивидуального развития в работу включаются различные гены и участки хромосом, что приводит к дифференциации, т. е. образованию клеток со специфическими особенностями функционального назначения и строения. Однако, видимо, в силу общего происхождения принципы строения разных клеток имеют сходство, как бы единый план строения и соответственно сходные принципы функционирования на субклеточном и молекулярном уровне. Это позволяет использовать результаты, полученные на одних клетках, для объяснения функционирования других. Поэтому можно выделить несколько видов клеток, на

*В настоящей книге не затрагиваются вопросы, касающиеся микроорганизмов — прокариот (бактерии, синезеленые водоросли, археобактерии) и эукариот (микроскопические грибы, микроскопические формы водорослей, простейшие; размер последних от 10 мкм до 3 мм).

которых наиболее удобно изучать механизмы тех или иных функций. Прежде всего необходимо исследовать основные процессы, обеспечивающие жизнедеятельность клеток, а затем особенности, связанные с их функционированием.

Схема строения «обобщенной клетки» представлена на рис. 1.1.

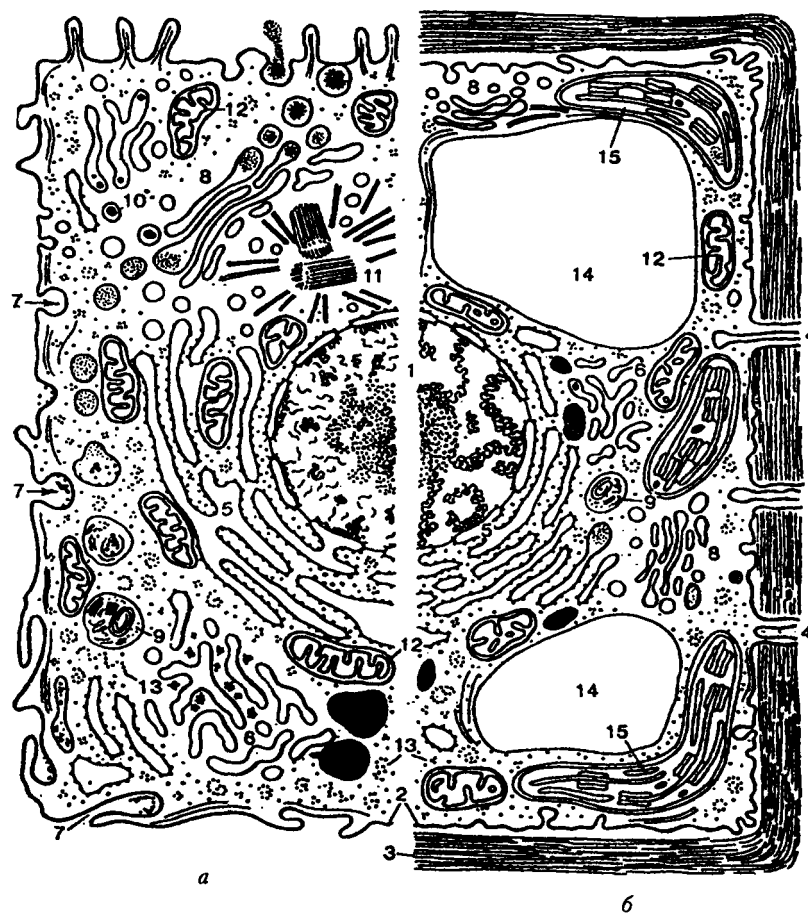


Рис. 1.1. Комбинированная схема строения эукариотической клетки: *а* — клетка животного происхождения; *б* — растительная клетка; 1 — ядро с хроматином и ядрышком; 2 — плазматическая мембрана; 3 — клеточная стенка; 4 — плазмодесма; 5 — гранулированный эндоплазматический ретикулум; 6 — гладкий ретикулум; 7 — пиноцитозная вакуоль; 8 — комплекс Гольджи; 9 — лизосома; 10 — жировые включения в гладком ретикулуме; 11 — центриоль и микротрубочки центросферы; 12 — митохондрия; 13 — полирибосомы гиалоплазмы; 14 — центральная вакуоль; 15 — хлоропласт

В литературе используется несколько вариантов классификации клеток:

- по типу функционирования (например, сократительные клетки гладкой и поперечно-полосатой мускулатуры, кардиомиоциты, опорные клетки кости и соединительной ткани). Основным критерием для такого разделения могут служить внутриклеточные сократительные белки (мышечная клетка) или высокоорганизованный экстраклеточный матрикс (клетки соединительной ткани);

- по типу эмбрионального развития;

- по типу эволюционного развития.

Каждая клетка является открытой системой, селективно обменивающей энергию и вещество с окружающей средой и функционирующей в определенном ритме (микроосцилляции, клеточный цикл), который сопровождается колебаниями условий экстраклеточной среды (макроосцилляции). Функционирование такого рода открытой клеточной системы подчиняется следующим критериям:

- клетка — это система, образованная за счет разделения липидной мембраной двух водных фаз (экстраклеточной среды и цитоплазмы);

- транспорт вещества и ионов через мембрану осуществляется за счет белков (пор, переносчиков или насосов); химические реакции в клетках катализируются белками, которые сами являются продуктами клеточных процессов синтеза;

- опорные (поддерживающие) и метаболические функции в клетке обеспечиваются за счет внутриклеточных химических процессов и координации входящего и выходящего потоков ионов и вещества;

- клетка — система, находящаяся в динамическом, далеком от стационарного состоянии; межклеточные контакты или объединение отдельных клеток в ткань обеспечиваются либо специальными мембранными белками, либо белками, выделяемыми в межклеточную среду;

- полисахариды и жиры являются основными депо энергии клетки, накопление которой обеспечивается такими процессами, как гликолиз, цикл Кребса или окислительное фосфорилирование; перераспределение запасенной энергии в клетке осуществляется с помощью АТФ;

- особенности строения и функций структурных белков и ферментов закодированы в ДНК; в многоклеточном организме все типы клеток имеют одинаковую последовательность нуклеотидов в ДНК; необходимая для синтеза белков информация переносится от ДНК на РНК (транскрипция) и далее в цитоплазму (трансляция), где реализуется при синтезе белка в рибосомах;

- факторы роста, цитокины, гормоны и другие молекулы регулируют межклеточные взаимодействия и координируют функционирование ткани в процессе развития организма.

1.1. ОСНОВНЫЕ СТРУКТУРЫ И ОРГАНЕЛЛЫ КЛЕТКИ

Экстраклеточный матрикс. Функции ЭКМ заключаются в обеспечении и поддержании формы клетки, транспорта веществ и ионов, предохранении клетки от проникновения инфекции, обеспечении клеточной адгезии в процессе морфогенеза. Основным компонентом ЭКМ является вода, содержащая комплекс различных гликопротеинов, глюкозаминогликанов, протеогликанов, а в случае костной ткани — кристаллы минералов. Наиболее распространенным гликопротеином ЭКМ является коллаген. В состав ЭКМ также входят фибринонектин (интегрин), ламинин, необходимый для развития нервной клетки, тенаскин, обеспечивающий антиадгезивное действие, эластин, необходимый для связи с гликопротеиновыми микрофибриллами, и т. д.

Плазматическая мембрана, или клеточная мембрана, — клеточная структура, выполняющая важную роль в реализации таких клеточных процессов, как эндоцитоз, экзоцитоз, клеточная адгезия, клеточное движение, межклеточные взаимодействия и передача сигнала. Плазматическая мембрана является полупроницаемым барьером, состоящим из протеинов и липидов, выполняющих активную роль в осуществлении мембранных процессов. Толщина ПМ составляет 7 — 10 нм.

Цитоплазма — высокоупорядоченная многофазная коллоидная система (гиалоплазма*) с находящимися в ней органеллами, обязательная часть клетки между ПМ и ядром. Для цитоплазмы характерно постоянное движение ее коллоидных частиц и других компонентов. Она пронизана микротрубочками, филаментами и микрофиламентами, полимеризация или распад которых обеспечивает обратимые переходы участков цитоплазмы из золь в гель. Совокупность филаментов и микротрубочек составляет цитоскелет, с которым связаны изменения формы клетки и движение внутриклеточных структур.

Цитоскелет — клеточная структура цитоплазмы эукариотов, включающая микрофиламенты (5 — 7 нм), микротрубочки (24 нм) и интермедиатные филаменты (10 нм). Это динамическая сеть, участвующая в обеспечении ряда клеточных процессов (движение клетки, поддержание формы и геометрии, внутриклеточный транспорт цитоплазмы, движение клеточных ресничек и жгутиков).

Комплекс Гольджи, называемый также аппаратом Гольджи или пластинчатым комплексом, — совокупность органелл клетки, участвующих в ряде клеточных процессов (синтез гликопротеинов, секреция, синтез и утилизация компонентов мембран и др.). Структура комплекса Гольджи консервативна для всех эукариотов и включает в себя поляризованные органеллы и цистерны, поверхности которых не идентичны мембране. Он присутствует во всех клетках эукариотических

* Гиалоплазма — основная плазма, матрикс цитоплазмы; сложная, бесцветная коллоидная система, способная к переходам из состояния золь в гель.

организмов (кроме эритроцитов млекопитающих). Его структурно-функциональная единица — диктосома.

Митохондрия — органелла клетки овальной формы. Число митохондрий зависит от типа клетки и максимально в активных клетках (кардиомиоцитах). Состоит из наружной и внутренней мембраны, межмембранного пространства, матрикса, содержащего ДНК. Основная функция митохондрий заключается в синтезе АТФ при окислении сахаров и липидов. Они содержат ферменты цикла Кребса, а также цикла окисления жирных кислот и аминокислот.

Ядро — важная клеточная структура, содержащая ядрышки и хромосомы. Окружена ядерной оболочкой, которая состоит из двух отдельных мембран — внутренней и наружной, в некоторых местах мембраны соединены друг с другом; двухмембранная ядерная оболочка пронизана порами, на краях которых наружная мембрана переходит во внутреннюю. Через поры осуществляется обмен между ядром и цитоплазмой. Ядро содержит гранулы с ДНК и РНК и присутствует во всех эукариотических клетках.

Хлоропласт — внутриклеточная органелла растений, в которой осуществляется фотосинтез. Его длина 5 — 10 мкм, ширина 2 — 4 мкм.

Лизосома — субмикроскопическая частица (0,2 — 0,8 мкм) в цитоплазме, содержащая гидролитические ферменты. Образуется в КГ, осуществляет внутриклеточное пищеварение.

Рибосома — органелла клетки, осуществляющая биосинтез белка. Частица (диаметром около 2 нм) сложной формы. Состоит из двух — большой и малой — субъединиц, на которые может диссоциировать.

Эндоплазматический ретикулум — система мелких вакуолей и канальцев, соединенных друг с другом, ограниченная мембраной. Толщина мембраны ЭР — 5 — 7 нм. Его производные — микротельца, а в растительной клетке — вакуоли.

Пероксисомы — небольшие вакуоли (0,3 — 1,5 мкм), связанные с мембранами ЭР. Играют важную роль в превращении жиров в углеводы. Участвуют в расщеплении перекиси водорода.

1.2. ОСНОВНЫЕ ТИПЫ КЛЕТОК

1.2.1. КЛЕТКИ ЖИВОТНЫХ

Нервные клетки участвуют в генерации возбуждения (сенсорные клетки), его проведении (аксоны и дендриты нервного волокна) и передаче на другие клетки (синапс).

Классификация НК проводится на основании:

1) размера и формы (мультиполярные, биполярные, униполярные и псевдоуниполярные нейроны);

- 2) функции (моторные, сенсорные, интернейроны);
- 3) характеристики выделяемого клеткой транмиссера (холинэргические, адренергические нейроны и т. д.).

Глиальные клетки — ядерные клетки, обеспечивающие функционирование НК в центральной и периферической нервной системе (соотношение числа НК к ГК составляет от 10/1 до 50/1). При классификации выделяют четыре типа ГК (астроциты, олигодендроциты, эпендимальные клетки и микроглии). В ПНС глиальными являются шванновские клетки, которые обеспечивают образование миелина нервного волокна.

Мышечные клетки (скелетные мышечные волокна, гладкие мышечные клетки и кардиомиоциты) участвуют в изменении положения костной ткани или эластичности соединительной ткани кровеносных сосудов.

Клетки крови — клетки специализированной ткани, состоящей из форменных элементов крови (эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов) и плазмы.

Эритроциты — клетки крови (7 — 8 мкм в диаметре, $4 - 6 \cdot 10^6$ /мкл), форма — двояковогнутый диск, время жизни — 120 дней, обеспечивают транспорт кислорода и углекислого газа, не содержат органелл и ядра.

Тромбоциты — клетки крови (диаметр 1,5 — 3 мкм, $130 - 400 \cdot 10^3$ /мкл), форма — шар, время жизни — 10 — 12 дней, обеспечивают свертывание крови, агрегацию и т. д.

Лейкоциты — клетки крови ядерные, предохраняющие организм от инфекции (фагоцитоз и лимфоцитоз). К ним относятся:

а) лимфоциты — моноядерные клетки ($1,3 - 3,4 \cdot 10^3$ /мкл), выполняющие ключевую роль в обеспечении иммунитета;

б) моноциты — ядерные клетки (12 — 15 мкм в диаметре, $0,1 - 0,6 \cdot 10^3$ /мкл), время жизни — 3 дня, предохраняют организм от последствий травмы, обеспечивают восстановление, иммунный ответ;

в) нейтрофилы — ядерные клетки (12 — 15 мкм в диаметре, $1,8 - 7,5 \cdot 10^3$ /мкл), содержащие митохондрии, рибосомы и эндоплазматический ретикулум, время жизни — 6 — 7 дней, обеспечивают дезактивацию проникших в кровь микроорганизмов;

г) базофилы — ядерные клетки (12 — 15 мкм в диаметре, составляют менее 1 % от всех лейкоцитов), содержат гранулы, гидролизующие ферменты, пероксидазы, время жизни — 1 — 2 дня;

д) эозинофилы — сегментированные ядерные клетки (12 — 15 мкм в диаметре, $100 - 400$ /мкл), время жизни — менее 12 ч.

1.2.2. КЛЕТКИ РАСТЕНИЙ

Часто в качестве объекта электробиологических исследований используются водоросли семейства харовых. Они удобны для микроэлектродного изучения благодаря крупным размерам. Длина одной клетки достигает 40 мкм, а диаметр составляет от 150 до 500 мкм (рис. 1.2). Снаружи клетка покрыта клеточной оболочкой толщиной до 15 мкм, далее следует клеточная мембрана — плазмолемма, толщина которой составляет от 10 до 15 нм, между вакуолью и плазмолеммой находится слой цитоплазмы (от 15 до 25 мкм), содержащий хлоропласты.

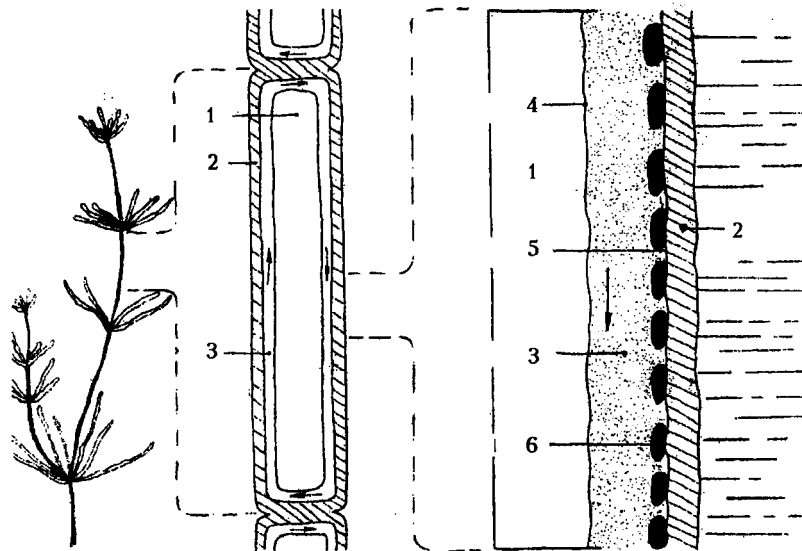


Рис. 1.2. Общий вид и строение водоросли *Nitella*: 1 — вакуоль; 2 — клеточная стенка; 3 — цитоплазма; 4 — тонопласт; 5 — плазмолемма; 6 — хлоропласт

1.3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОК

1.3.1. МЕТОД ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Одним из традиционных методов клеточной биофизики наряду со световой (оптической) микроскопией является метод электронной микроскопии, который позволяет наблюдать объекты размером меньше 10 нм (рис. 1.3). При использовании данного метода клетки и ткани фиксируют в 2,5%-м растворе глutarового альдегида, приготовленного

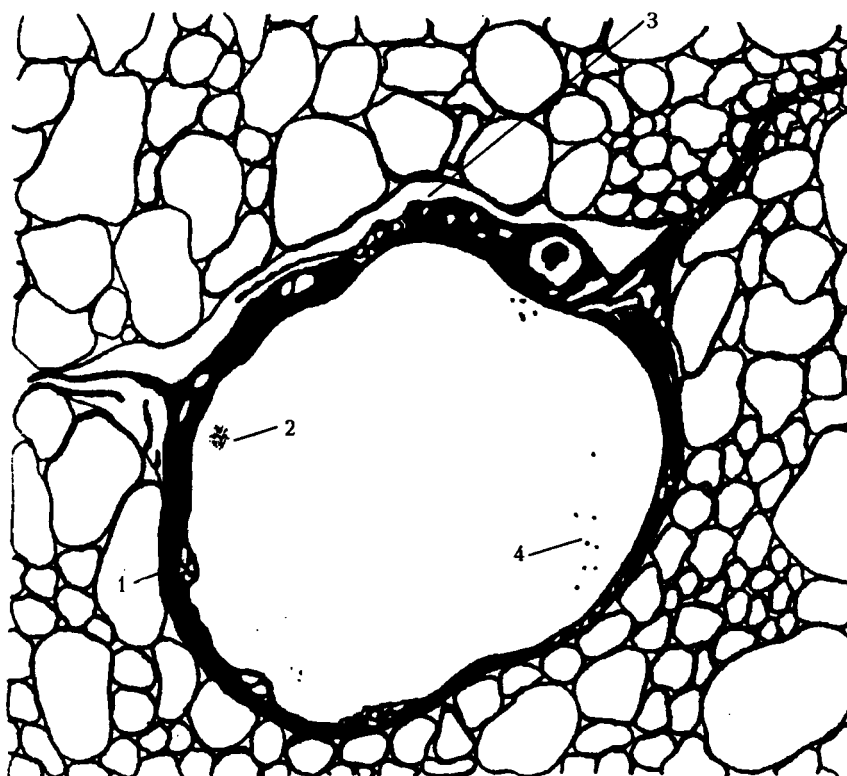


Рис. 1.3. Электронная фотография гигантского аксона кальмара:
1 — аксолема; 2 — митохондрия; 3 — шванновская клетка;
4 — нейрофилламенты

на 0,1 М фосфатном или Na-какодилатном буфере (pH 7,2 — 7,4). Затем для удаления глутарового альдегида препараты промывают буферным раствором и окрашивают 1%-м раствором OsO_4 . Далее препараты обрабатывают спиртовыми растворами возрастающей концентрации (от 30 до 100°). Для повышения контрастности окрашенных препаратов к 70-градусному спирту добавляют 2%-й раствор уранил-ацетата. Обезвоживание осуществляют путем выдерживания препаратов в абсолютном ацетоне при периодической смене раствора. Для заливки образцов готовят смесь ацетон — смола в соотношении 3 : 1. В состав смолы входит ряд специальных ингредиентов. После заливки срезы помещают в термостат и инкубируют при температуре 37 °C в течение 12 ч. После удаления ацетона препарат заливают смолой и последовательно инкубируют при температуре от 37 до 57 °C. Далее препараты нарезают на микротоме (срезы толщиной 60 — 90 нм),

просматривают и фотографируют в электронном микроскопе ЭЛМ-100А.

1.3.2. МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Для регистрации изменений многих клеточных процессов и характеристики вязкости, мембранного потенциала, внутриклеточного или связанного содержания ионов используют метод флуоресцентных зондов (например, такие зонды, как *fu ga-2*, хлортетрациклин, 9-аминоакридин и флуоресцеиндиацетат).

В основе метода флуоресцентного определения мембраносвязанного кальция лежит способность антибиотика ХТЦ, локализованного в мембране, образовывать комплекс с ионом кальция, что приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции зонда. Его свечение регистрируют с одного и того же участка клетки в течение всего времени эксперимента с помощью люминесцентного микроскопа. Возбуждение флуоресценции ХТЦ вызывают с помощью галогенной лампы накаливания, выделяя полосу за счет комбинации фильтров. Регистрацию свечения проводят с помощью фотометрической насадки, выделяя полосу с помощью интерференционных светофильтров при длине волны максимального пропускания светового пучка 490 и 550 нм.

При регистрации внутриклеточного рН в качестве зонда используют ФДА в конечной концентрации 10^{-5} моль. После 20 мин инкубации (время, необходимое для накопления в объекте достаточного для флуориметрии количества флуоресцеина) клетки тщательно отмывают от экстраклеточного ФДА. Для обеспечения постоянного рН экстраклеточной среды при инкубации клеток добавляют 50 ммоль НЕРЕС, доводя рН раствора до 6,2 — 8,5. Спектры флуоресценции препаратов регистрируют с помощью инвертированного микроспектрофлуориметра: возбуждение флуоресценции препаратов осуществляют обычно с помощью галогенной лампы накаливания и комбинации стеклянных светофильтров. Размер фотометрируемого участка клетки составляет, как правило, 60 × 60 мкм (при объективе × 10). Значение внутриклеточного рН определяют по величине отношения интенсивностей флуоресценции окрашенного препарата при длинах волн 516 и 570 нм, сопоставляя его со значениями соответствующей калибровочной кривой, представляющей собой зависимость величины этого отношения от значений рН буферных растворов флуоресцеина.

Для регистрации внутриклеточного Ca^{2+} после загрузки и перед началом опыта клетки промывают исходным раствором и выдерживают 30 — 40 мин для деэтерифицирования и достижения равновесного распределения между связанной и свободной формами молекул зонда (*fu ga-2*) внутри клетки. Для определения содержания кальция в клетке применяют микроспектрофлуориметрический метод. Клетки помещают в перфузируемую ячейку на предметном столике инвертиро-

ванного микроскопа, совмещенного со спектрофлуориметром, оснащенный ксеноновой лампой, разделителем лучей, двумя монохроматорами и двойным зеркальным чопперным механизмом, позволяющим чередовать возбуждение молекул fura-2 лучами двух длин волн — 340 и 380 нм (с частотой 100 Гц). Ширина полосы возбуждения не должна превышать 3,5 нм. Концентрацию Ca^{2+} рассчитывают по отношению интенсивностей флуоресценции (505 нм) в ответ на возбуждение, вызванное лучами с длинами волн 340 и 380 нм.

1.3.3. МЕТОД ВОССТАНОВЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПОСЛЕ ФОТООТБЕЛИВАНИЯ

Метод восстановленной флуоресценции после фотоотбеливания используется в биофизике клетки для измерения коэффициента латеральной диффузии белков и липидов в плазматических мембранах. Если пометить интересующие нас белки или фосфолипиды флуоресцентной меткой, например производным флуоресцеина, и ввести их в клетку, то при регистрации с помощью флуоресцентного микроскопа (рис. 1.4) наблюдается флуоресценция, величину которой можно оценить фотоэлектронным умножителем и проанализировать на персональном компьютере.

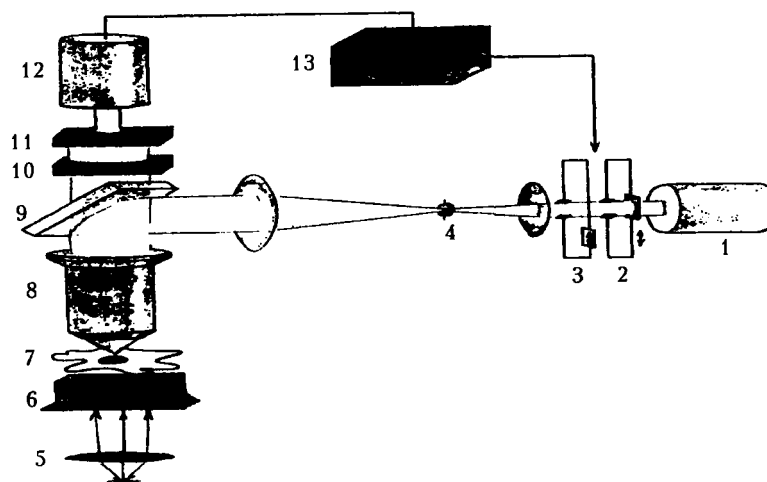


Рис. 1.4. Упрощенная схема установки для исследования восстановленной флуоресценции после фотоотбеливания: 1 — лазер; 2, 3 — аттенюаторы (ослабители луча); 4 — диафрагма; 5 — осветитель; 6 — конденсатор микроскопа; 7 — исследуемая клетка; 8 — объектив микроскопа; 9 — дихроичное зеркало, отражающее падающий свет и пропускающее свет возбужденной флуоресценции; 10 — отсекающий светофильтр; 11 — «зонд» — узкая диафрагма, выделяющая флуоресценцию с исследуемого участка; 12 — ФЭУ; 13 — блок регистрации и управления установкой

Возбуждающий флуоресценцию луч лазера фокусируется на участке плазматической мембраны (порядка нескольких квадратных микрон). Далее этот луч должен быть ослаблен аттенюаторами настолько, чтобы вызвать лишь флуоресценцию метки, но не фотоокисление компонентов мембраны (рис. 1.5).

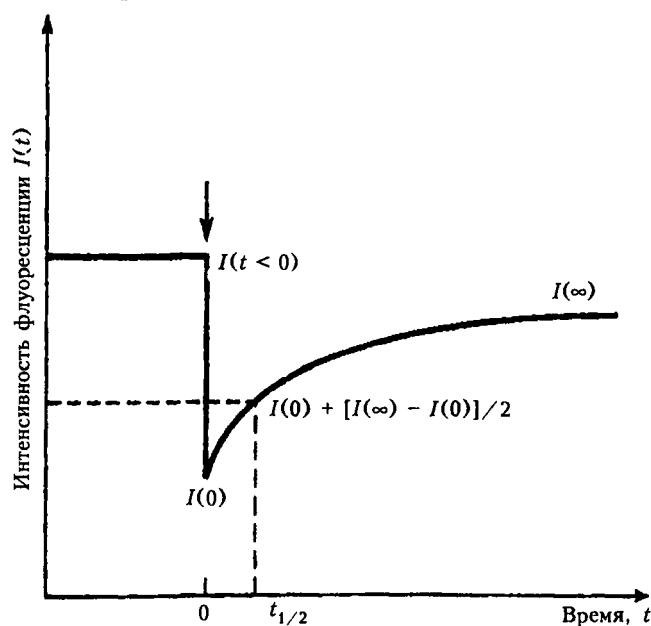


Рис. 1.5. Восстановление интенсивности флуоресценции после фотоотбеливания. Метод расчета данных по трем точкам: $I(t < 0)$ — интенсивность флуоресценции до фотоотбеливания; $I(0)$ — интенсивность флуоресценции непосредственно после фотоотбеливания; $I(\infty)$ — предельное значение интенсивности флуоресценции после ее восстановления. Стрелкой отмечен момент фотоотбеливания

В начале эксперимента интенсивность возбуждающего луча на несколько десятков миллисекунд увеличивают настолько, чтобы вызвать фотоокисление флуоресцентной метки (фотоотбеливание). Вслед за этим его интенсивность возвращают к исходному уровню и регистрируют интенсивность флуоресценции участка клетки после фотоокисления метки. Так как продукт фотоокисления не флуоресцирует, то восстановление исходного уровня флуоресценции наступает вследствие латеральной диффузии меченых молекул белка или липида из соседних областей клетки. Таким образом, регистрация скорости восстановления исходного уровня флуоресценции участка мембраны клетки после фотоотбеливания позволяет определить коэффициенты диффузии мембранных белков и липидов.

1.3.4. МЕТОД КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

Теория метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии была разработана в 1977 — 1978 гг. Основное условие конфокальности (совпадения фокусов) заключается в том, чтобы проекция диафрагмы детектора на объекте точно совпадала с фокусом освещающего объект света (рис. 1.6).

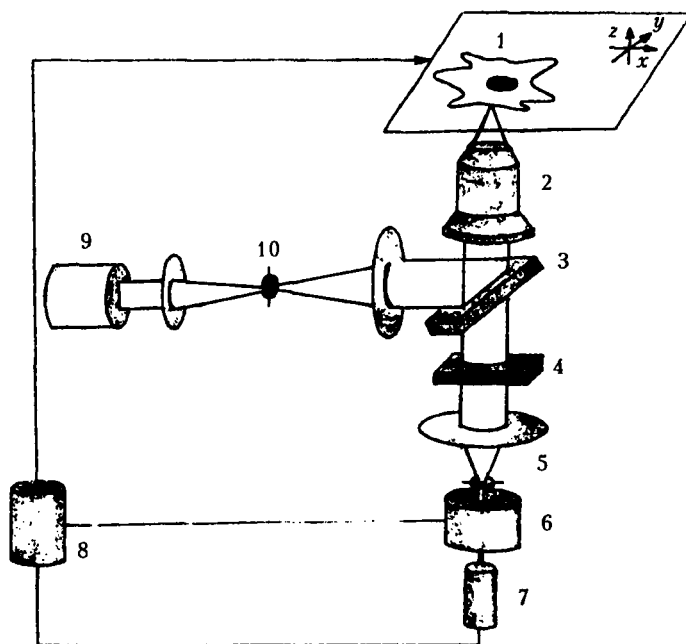


Рис. 1.6. Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп: 1 — сканируемый в 3 направлениях предметный столик; 2 — объектив микроскопа (инвертированного); 3 — дихроичное зеркало; 4 — отсекающий фильтр; 5 — диафрагма детектора; 6 — спектрограф (для выделения нужной полосы флуоресценции); 7 — ФЭУ; 8 — блок регистрации и управления установкой; 9 — лазер; 10 — диафрагма осветителя

Существенным моментом регистрации является как можно меньший диаметр диафрагмы детектора, что достижимо при использовании достаточно мощных источников освещения — лазеров. Сочетание этих особенностей позволяет значительно увеличить разрешение (до 100 — 200 нм) и контрастность образца по сравнению с обычной световой микроскопией. Флуоресценция, возникающая в той части образца, на которую сфокусирован объектив, достигает детектора и затем регист-

рируется. В обычной световой люминесцентной микроскопии детектируется флуоресценция всей освещенной части образца, хотя те участки, которые находятся вне фокуса, видны не контрастно. КЛСМ позволяет послойно просматривать живые клетки (подобие томографии) и количественно оценивать их флуоресцентное изображение. Предметный столик с объектом передвигается в плоскости $x - y$, а также по оси z . Каждое полученное изображение фиксируется компьютером, и даже воссоздается изображение каждого отдельного вертикального оптического среза, что невозможно при обычной оптической световой микроскопии. Количественные характеристики объекта методом КЛСМ получают, определяя интенсивность флуоресценции с помощью ФЭУ. Если исследователя интересует распределение макромолекул данного типа между ядром и цитоплазмой, то «окно» изображения можно поместить в оптический срез ядра, определить интенсивность флуоресценции из него (F_n), а затем поместить такое же «окно» в участок цитоплазмы на том же оптическом срезе и определить интенсивность флуоресценции из этого «окна» (F_c). Тогда отношение $A = F_n / F_c$ будет характеризовать распределение интересующих нас флуоресцентно меченных молекул между ядром и цитоплазмой в данном оптическом срезе.

1.3.5. МЕТОД СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

В настоящее время в биологии широко применяется спектроскопия комбинационного рассеяния. Комбинационное рассеяние света — хорошо известное физическое явление, успешно используемое в исследовании структуры молекулы, ее динамического поведения, внутримолекулярных колебаний и межмолекулярных взаимодействий.

В биологии клетки спектроскопия КР используется при исследовании полимерных биологических макромолекул — полипептидов, полинуклеотидов и полисахаридов. При анализе структуры белков с помощью КР оцениваются полосы спектра, характерные для амида А (колебания N—H-связей), амида 1, амида 2 и амида 3. При анализе структуры нуклеиновых кислот исследуются полосы спектра КР, характерные для воды, сахаров, нуклеотидов (колебания C=O-, C=N- и C=C-связей), симметричные и асимметричные колебания PO₂-связей, колебания PO-связей фосфата и CO-связей сахаров, а также скелетные, деформационные колебания всех связей полинуклеотидов. При анализе структурных изменений полисахаридов с помощью КР-спектроскопии оцениваются колебания OH- и CH-связей сахаров, целлюлозы и хитина (рис. 1.7).

В биофизике клетки КР-спектроскопия широко используется для исследования конформационных изменений белков и фосфолипидов в природных и модельных мембранах. Например, исследование колебаний C—C и C—H-связей позволило выявить зависимости конформа-

ционных изменений углеводородных цепочек жирных кислот от упорядоченности мембранных фосфолипидов клеточной мембраны.

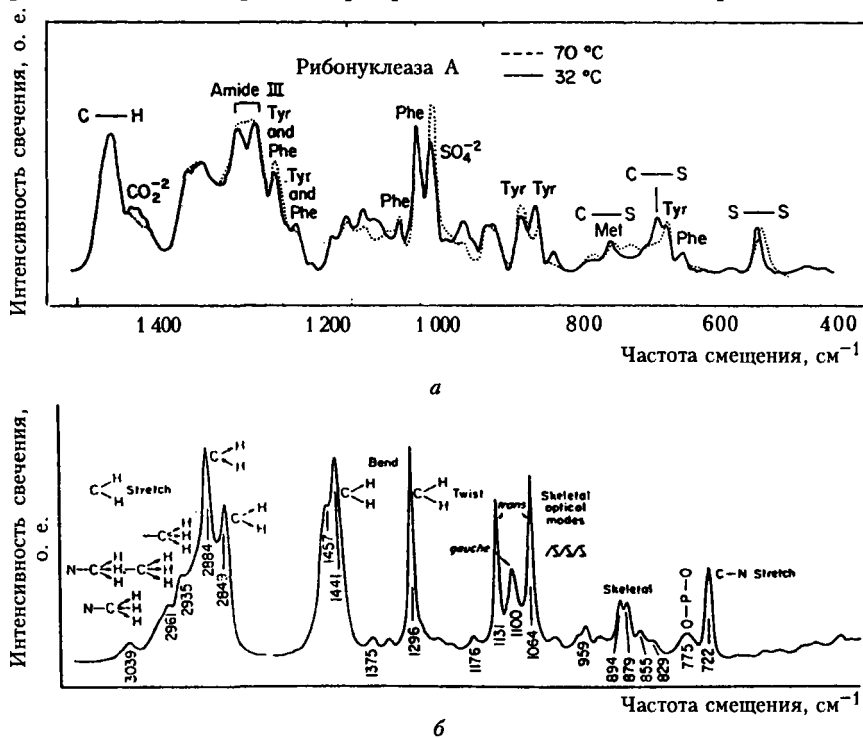
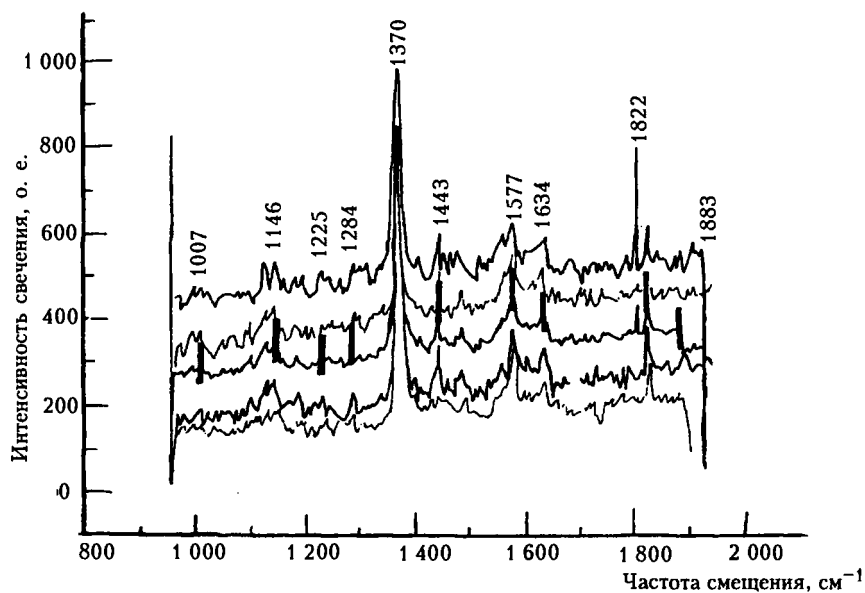


Рис. 1.7. Спектр комбинационного рассеяния белков (а) и липидов (б)

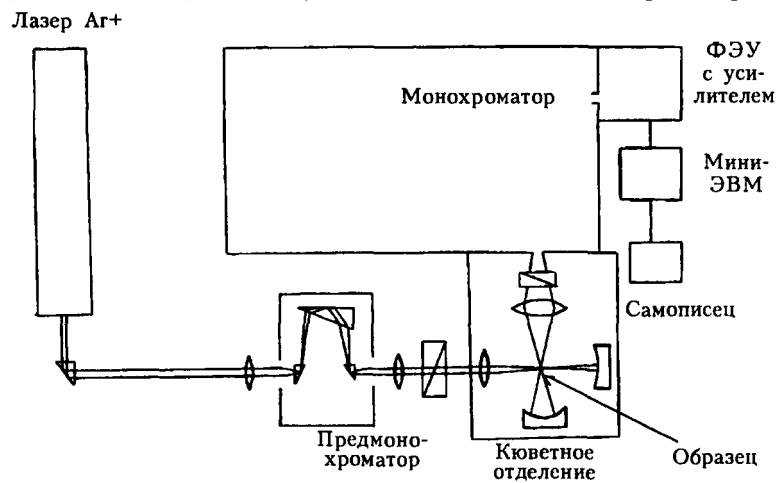
Использование лазерного излучения с длиной волны поглощения порфирина позволяет регистрировать спектры резонансного комбинационного рассеяния протопорфиринов в эритроцитах. В этих спектрах доминируют линии, лежащие в области 1000 — 1650 см⁻¹, которые обусловлены плоскостными колебаниями связей С—С и С—N и деформационными колебаниями С—Н. Некоторые из них подвержены влиянию химических превращений, происходящих с атомом железа, и могут быть использованы для изучения структуры макроцикла (рис. 1.8).

При исследовании состояния гемоглобина эритроцитов с помощью КР-спектроскопии образец крови обычно помещают в специальный держатель, что позволяет фокусировать луч возбуждающего света на объекте (рис. 1.9). Источником возбуждающего света при регистрации спектров КР служит газовый лазер, непрерывный генерирующий излучение в области следующих длин волн: 441,6; 476,5; 488,0; 496,5; 501,7; 514,5 нм. С помощью светофильтров мощность излучения под-



Р и с. 1.8. Спектр комбинационного рассеяния порфирина гемоглобина

держивают на уровне 20 — 100 мВт, что не приводит к существенным изменениям нативного состояния объекта. Рассеянное на образце излучение собирают системой линз на входную щель монохроматора. Сканирование спектра КР осуществляют двойным монохроматором,



Р и с. 1.9. Блок-схема спектрометра комбинационного рассеяния

спектральная область прибора составляет 400 — 850 нм, относительное отверстие — 1 : 5,3, обратная дисперсия — 0,45 нм/мм, полуширина аппаратной функции — не более 1 см⁻¹ (при длине волны 550 нм), скорость сканирования — 0,18 нм/с, точность измерения — около 4 см⁻¹. Регистрацию сигналов РКР осуществляют ФЭУ, работающим в режиме счета фотонов. Накопление спектров проводят на многоканальном анализаторе импульсов или персональном компьютере.

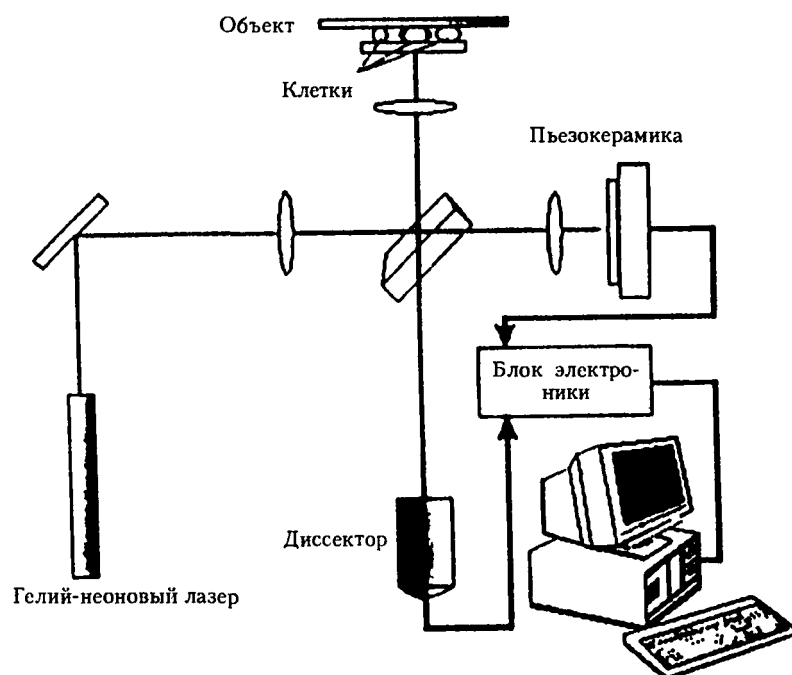
1.3.6. МИКРОСПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Спектры КР от отдельных участков клетки получают на КР-микроспектрометре с тройным монохроматором и фотоэлектронной регистрацией сигнала. Запись и обработку спектров проводят с помощью компьютера. В качестве источника возбуждения используют аргоновый лазер. С целью устранения плазменных линий, расположенных вблизи от возбуждающей линии, перед кюветным отделением помещают предмонохроматор или интерференционный фильтр. Для получения спектров с пространственным разрешением применяют РКР-спектрометр, состыкованный с оптическим микроскопом. При работе с клетками устанавливают водоиммерсионный объектив 100× с числовой апертурой 0,95. Этот объектив фокусирует лазерный луч в плоскости $x - y$ до 1 мкм². Установка диафрагмы диаметром 200 мкм дает пространственное разрешение по оси z , составляющее около 4 мкм. Пространственное разрешение — около 4 мкм³.

1.3.7. МЕТОД ДИНАМИЧЕСКОЙ ФАЗОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В настоящее время для исследования быстрых изменений формы клетки или отдельных ее частей используют лазерный фазовый микроскоп (рис. 1.10), представляющий собой модифицированный интерференционный микроскоп с модуляцией фазы референтной волны, с гелий-неоновым лазером ($\lambda = 633$ нм) для когерентного освещения объекта и диссектором в качестве координатно-чувствительного фотоприемника. Важно, что измерение клеток проводят в отраженном свете. При регистрации используют объектив $\times 20/0,45$, размер поля зрения — 128×128 пикс (20×20 мкм); время измерения в одной точке скан-линии T_i — 1 мс, время ввода трек-диаграммы — 14,7 с. Микроскоп позволяет получать изображения в виде оцифрованного двумерного распределения фазы $h(x, y)$, которая измерялась в единицах длины (оптической разности хода лучей) в реальном времени. Метод динамической фазовой микроскопии основан на периодических измерениях фазы вдоль произвольно установленного сегмента (скан-линии) в изображении объекта. Полученная при периодическом сканировании матрица чисел (трек-диаграмма) содержит информацию об

изменениях локальной фазовой высоты в точках скан-линии за время измерений. Накопленные в памяти компьютера данные подвергаются обработке и содержат количественную информацию о флуктуациях локальной разности хода (фазовой высоты) $h(x, y)$, пропорциональной проекции локального показателя преломления $n(x, y, z)$. Как правило, линию сканирования выбирают поперек клетки и производят периодические измерения высоты фазового профиля $h(x)$, где x — координата скан-линии.



Р и с. 1.10. Блок-схема динамического фазового микроскопа

Глава 2

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Биологические мембраны (лат. *membrana* — кожа, оболочка, перепонка) — структуры, ограничивающие клетки (клеточные, или плазматические, мембраны) и внутриклеточные органоиды (мембраны митохондрий, хлоропластов, лизосом, эндоплазматического ретикулума и др.). Мембраны содержат белки, липиды, углеводы, различные макромолекулы (гликопротеиды, гликолипиды), а также в небольших количествах коферменты, нуклеиновые кислоты, антиоксиданты, неорганические ионы и т. д.

Биологические мембраны состоят из нескольких молекулярных слоев, суммарная толщина которых обычно не превышает 10 нм.

Предположение о существовании мембран, отделяющих внутреннее содержимое живой клетки от окружающей среды, высказывалось еще в XIX в. На это указывали, в частности, данные о значительных различиях между составом клетки и окружающей среды. В 1890 г. немецкий исследователь В. Пфедфер (W. Pfeffer) предложил термин «клеточная, или плазматическая, мембрана». Однако увидеть и сфотографировать ПМ удалось лишь в 40-е гг. XX в. при использовании электронного микроскопа. В 1935 г. Дж. Даниэлли (J. Danielli) и Г. Давсон (H. Davson) сформулировали гипотезу двойного липидного слоя, определяющего строение ПМ. В 1964 г. Дж. Д. Робертсон (J. D. Robertson) развил данное представление, сформулировав концепцию асимметричности в строении ПМ. Согласно его теории биологическая мембрана содержит белки, которые связаны электростатически; на наружной поверхности БМ находятся гликолипиды. В 1966 г. Дж. Ленард (J. Lenard) и С. Сингер (S. Singer) предложили жидкомозаичную модель структуры БМ, согласно которой белки «плавают» на поверхности липидного бислоя в виде глобулярных молекул, погруженных в БМ. В 1970 г. Г. Вандеркой (G. Vanderkooi) и Д. Е. Грин (D. E. Green) предложили белково-кристаллическую модель структуры БМ; наличие в БМ жесткой белковой структуры обусловлено дальнедействующими белок-белковыми взаимодействиями. Отметим, что эти представления активно развиваются и сегодня (рис. 2.1). В настоящее время наиболее популярна теория жидкомозаичной мембраны.

Рассмотрим подробнее плазматическую мембрану. ПМ играют важную роль в осуществлении следующих клеточных функций:

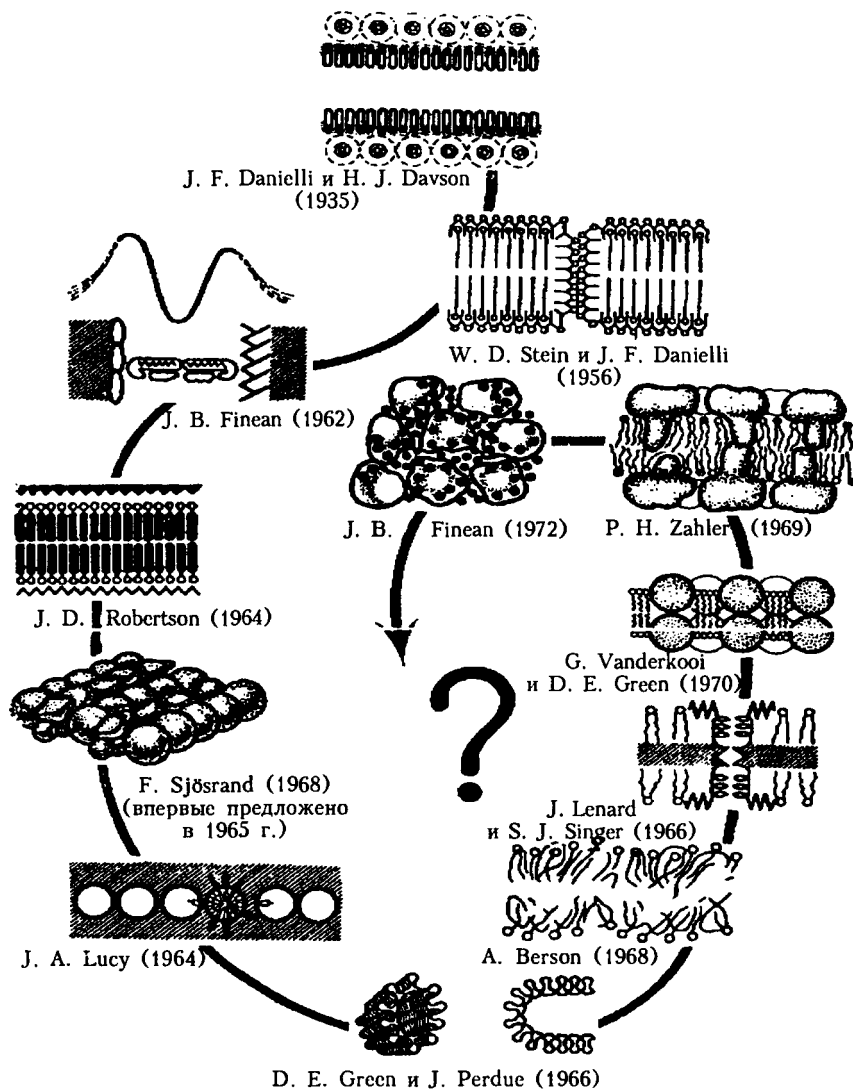


Рис. 2.1. Развитие представлений о молекулярной организации биологических мембран

- 1) механическая — обеспечивают прочность и автономность клетки;
- 2) барьерная — благодаря полупроницаемости обеспечивают селективный транспорт и распределение ионов между клеткой и средой;

3) генерация и проведение возбуждения — содержат каналы, обменники и насосы, обеспечивающие транспорт ионов;

4) энергетическая — обеспечивают синтез АТФ в мембранах митохондрий и хлоропластов;

5) матричная — обеспечивают расположение и ориентацию белков и их взаимодействие;

6) адгезивная — обеспечивают межклеточные взаимодействия;

7) двигательная — обеспечивают процесс движения клетки;

8) секреторная — обеспечивают процесс экзо- и эндоцитоза.

Липиды ПМ подразделяют на фосфолипиды, гликолипиды, холестерин, триглицерол, стероиды и свободные жирные кислоты. Белки ПМ выполняют ряд функций (клеточное узнавание, рецепция, соединение отдельных комплексов и т. д.) и подразделяются на интегральные и периферические. Интегральные белки пронизывают липидный бислой ПМ и связаны с фосфоинозитидами. Периферические белки локализованы на поверхности ПМ (ферменты; белки, координирующие форму цитоскелета; белки, связанные с гликокаликсом).

Для ПМ клетки характерно явление асимметрии, при котором распределение и состав липидов на цитоплазматической поверхности мембраны отличаются от распределения и состава на экстраклеточной. Явление асимметрии ПМ необходимо для:

- поддержания исходной формы клетки;
- фиксации белковой ориентации, способствующей максимальному проявлению их активности (фермент, канал);
- распознавания антигенов;
- регуляции вязкости ПМ;
- обеспечения процесса выведения старых клеток.

В настоящее время рассматриваются несколько общих факторов, регулирующих состояние ПМ. К ним относят действие температуры, состав жирных кислот, содержание холестерина, контакт ПМ с цитоскелетом, действие детергентов, анестетиков и гормонов.

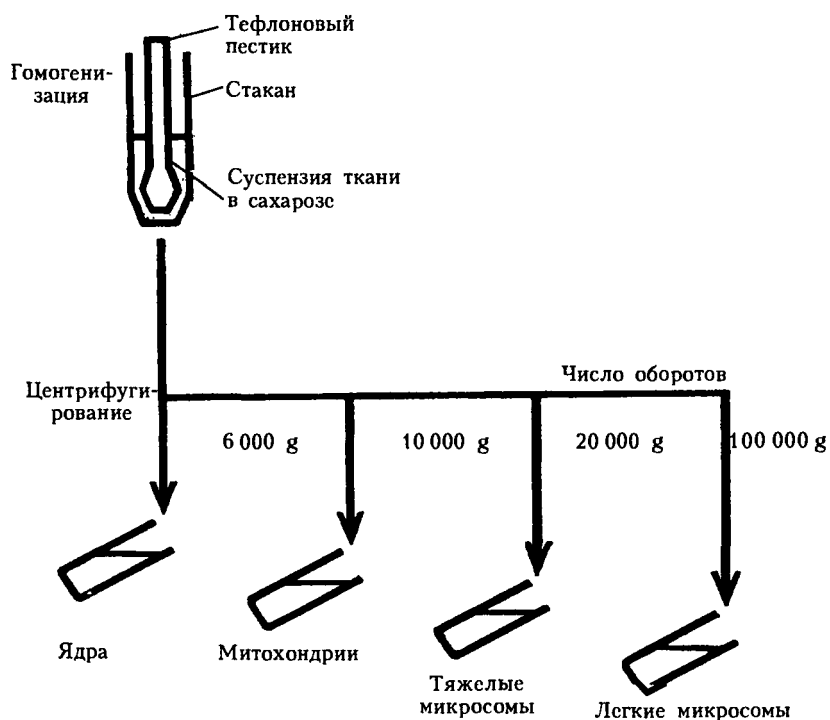
Особый интерес представляют данные о наличии в ПМ специализированных областей (доменов). Функциональное значение данных структурных модификаций ПМ заключается в определении различий между апикальной и базолатеральной поверхностями полярных клеток, создании барьеров между апикальной и базолатеральной мембранами, изменении характера процессов рецепции.

2.1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

В соответствии с задачами эксперимента при исследовании мембран применяются следующие методы.

2.1.1. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ

Для исследования молекулярного состава и структуры ПМ их выделяют из клеток путем разрушения (гомогенизации) и отделения центрифугированием. Известно, что в зависимости от плотности частицы осаждаются с разной скоростью и при постоянном центробежном ускорении скорость осаждения частиц пропорциональна их массе. Так, при ускорении 6 000 g осаждаются ядра, затем митохондрии, а при 20 000 – 100 000 g – микросомы (фрагменты мембран ЭР) (рис. 2.2).



Р и с. 2.2. Разделение тканей на субклеточные фракции методом центрифугирования

Для более полного разделения центрифугирование проводят несколько раз. При получении фракций, содержащих в основном мембраны одного типа, субклеточные фракции центрифугируют в градиенте плотности сахарозы или фикола. С целью идентификации и проверки чистоты полученных субклеточных фракций проверяют наличие при-

месей с помощью светового и электронного микроскопов; анализируют липидный состав или активность маркерных ферментов. В процессе проведения указанных операций некоторые (возможно, очень важные) компоненты нативных мембран могут быть утрачены. Поэтому следует обращать внимание на разные виды контроля.

2.1.2. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МЕМБРАН

При изучении структуры мембраны большое значение имеют методы фазово-контрастной микроскопии, основанной на том, что структурные элементы с разными показателями преломления имеют неодинаковую яркость. Различные детали клеток можно, таким образом, дифференцировать, но мембраны при этом не видны, так как световой микроскоп позволяет видеть объекты размером не менее 20 нм, а толщина биомембран, как уже упоминалось, не превышает 10 нм.

Разрешающая способность электронных микроскопов гораздо выше. При длине волны, используемой в электронной микроскопии (1 — 2 нм), можно различать объекты размером 0,5 — 1,0 нм, т. е. даже крупные молекулы. Электронная микроскопия позволяет связать данные о структуре объекта с результатами химического анализа. Однако этот метод имеет ряд существенных недостатков, которые необходимо учитывать при работе с биологическим материалом. Ведь предварительно исследуемый объект обезживают, фиксируют, затем контрастируют солями тяжелых металлов, что может привести к его искажению.

В последнее время в биофизике внедряется динамическая лазерная микроскопия, с помощью которой исследуются изменения формы живых объектов в трехмерном изображении.

Одним из наиболее точных методов исследования структуры молекул, составляющих мембрану клетки, является метод рентгеноструктурного анализа, основанный на дифракции рентгеновских лучей. Как правило, это явление наблюдается в тех случаях, когда на пути лучей встречаются препятствия, сравнимые по размеру с длиной волны луча. Если на исследуемый объект направляют параллельный пучок рентгеновских лучей, а за объектом помещают фотопленку, то на ней фиксируется дифракционная картина. На рентгенограмме наблюдается множество пятен (дифракционных максимумов), образующихся в результате интерференции лучей. Анализ рентгенограммы дает сведения о структуре объекта на молекулярном (и даже атомном) уровне. Ценность метода заключается в том, что появляется возможность, во-первых, изучить пространственное расположение молекул, точно измерить расстояние между ними, оценить их внутримолекулярную структуру, во-вторых, определить структуру молекулярных компонентов мембраны в нефиксированных клеточных препаратах.

Следующим традиционным методом исследования состояния мем-

бран является ядерный магнитный резонанс. В основе ЯМР-спектроскопии лежит физическое явление поглощения электромагнитных волн (в радиочастотном диапазоне) ядрами атомов, обладающими магнитным моментом. При биологических исследованиях часто используют ^{13}C , ^1H , ^{31}P . Структура ЯМР-спектров зависит от величины диполь-дипольных взаимодействий между данным ядром и соседними ядрами, неоднородностью магнитного поля и т. д. Процессы релаксации, связанные с диполь-дипольными взаимодействиями, служат мерой, характеризующей «подвижность» отдельных атомов и молекул. Метод ЯМР позволяет получать информацию с высокой точностью об избирательном поведении отдельных частей молекул белков и липидов, составляющих биологическую мембрану.

В настоящее время имеются спектры ЯМР многих белков, что делает возможным наблюдение за структурными изменениями, сопровождающими их функционирование, а также изучение состояния воды в биологических мембранах. ЯМР на ядрах ^{31}P применяют при исследовании структуры и поведения фосфолипидов в модельных и природных мембранах. Достоинство метода заключается в том, что в этом случае получают сведения непосредственно от молекулы конкретного фосфолипида, а не от посредника, как, например, при работе со спиновыми зондами. К недостаткам метода относят то, что ЯМР-спектры сложны и часто плохо разрешимы, кроме того, он имеет относительно малую чувствительность (концентрация образца должна быть не ниже 10^{-3} моль/л).

Метод электронного парамагнитного резонанса широко используется для исследований в области молекулярной и клеточной биофизики. Это явление было открыто русским физиком Е. К. Завойским в 1944 г. В дальнейшем оно послужило основой для создания метода спектроскопии ЭПР, который успешно применяют при изучении структуры молекул, содержащих парамагнитные частицы, а также кинетики изменений положения частицы при модификации конформации самой молекулы или ее соседей. В биологических объектах наиболее распространенными парамагнитными частицами являются свободные радикалы и ионы. Парамагнитными бывают ионы переходных металлов — Fe, Co, Ni, Cu, Mn. Метод ЭПР дает возможность наблюдать их окислительно-восстановительные превращения и судить об изменении конформации включающих их комплексов. С помощью ЭПР исследуют также триплетные состояния, возникающие, например, в ходе фотобиологических реакций. Очень большое значение для мембранологии имеет использование спиновых зондов и меток, когда в исследуемую систему (в данном случае в мембрану) вводят стабильные свободные радикалы, по изменению характеристик спектров ЭПР которых судят о структурно-динамическом состоянии молекул мембраны.

Результаты, получаемые с помощью метода ЭПР (используются магнитные свойства электронов) и ЯМР (используются магнитные

свойства атомных ядер), дают возможность выяснить структурную организацию мембран и их изменения при функционировании. Кроме того, они дополняют электронно-микроскопические данные об ультраструктурной организации мембран.

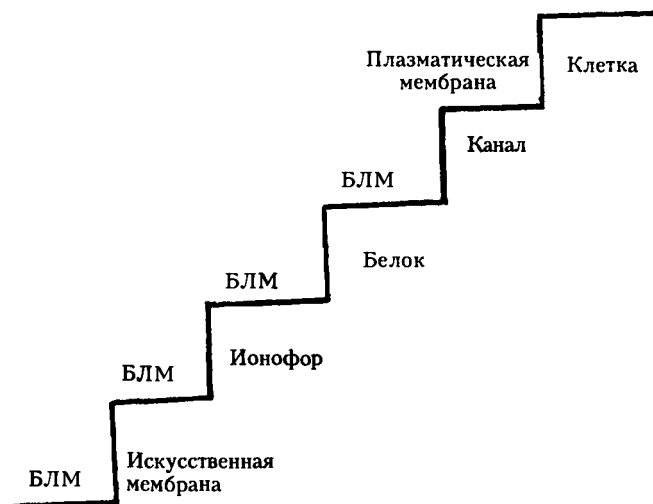
При изучении структурной организации мембран применяются и многие другие физические методы, например флуоресцентная спектроскопия. Известно, что флуоресценция в клетках сопровождается возникновением электронно-возбужденных состояний, когда электрон переходит из основного состояния в возбужденное. Полученная молекулой энергия может расходоваться в виде тепла или излучаться в виде света. Испускание света осуществляется более длительное время, чем поглощение.

При работе с биологическими объектами, в частности с клеточными мембранами, регистрируют либо собственную флуоресценцию отдельных молекул ПМ, либо флуоресценцию зондов или меток, специфически связанных с макромолекулой и введенных в клетку. Различают флуоресцентные зонды, связывающиеся с молекулами мембраны нековалентно, и флуоресцентные метки, образующие с молекулами мембраны химическую связь. При включении метки или зонда в мембрану их флуоресцентные свойства меняются, что дает информацию о структурных особенностях изучаемой системы.

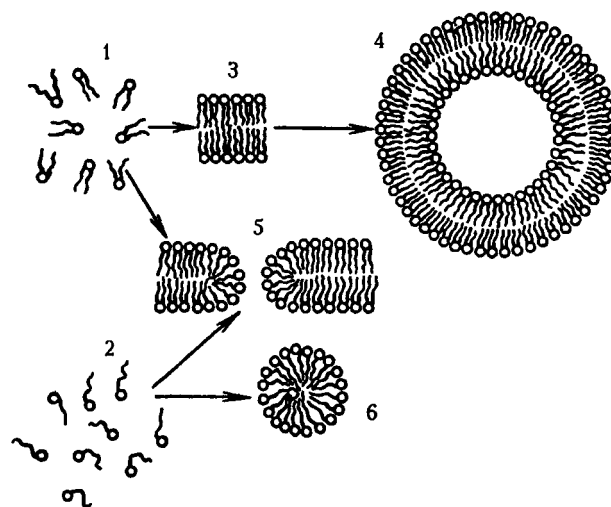
Для исследования отдельных компонентов мембраны большой интерес представляют методы колебательной спектроскопии: инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния.

Кроме описанных выше методов изучения биологических мембран важную роль играет моделирование — формирование искусственных моно- или бислойных липидных мембран и протеолипосом, базирующееся на том, что амфипатические молекулы липидов способны образовывать на границе раздела вода — органический растворитель мономолекулярные пленки. В настоящее время широко используются методы получения моно- и бислойных липидных мембран, а также методы формирования замкнутых пузырьков — везикул, липосом (рис. 2.3, 2.4). В такие мембраны, как правило, вводят белки или мелкие фрагменты мембран, выделенных из клетки (протеолипосомы). Так как липидный бислой — обязательный компонент биологической мембраны, результаты, полученные при исследовании физических характеристик модели мембраны и ее проводимости, имеют большое значение для понимания ряда процессов организации и функционирования нативных биологических мембран. Возможности такого рода моделирования еще более расширяются при формировании протеолипосом (рис. 2.5).

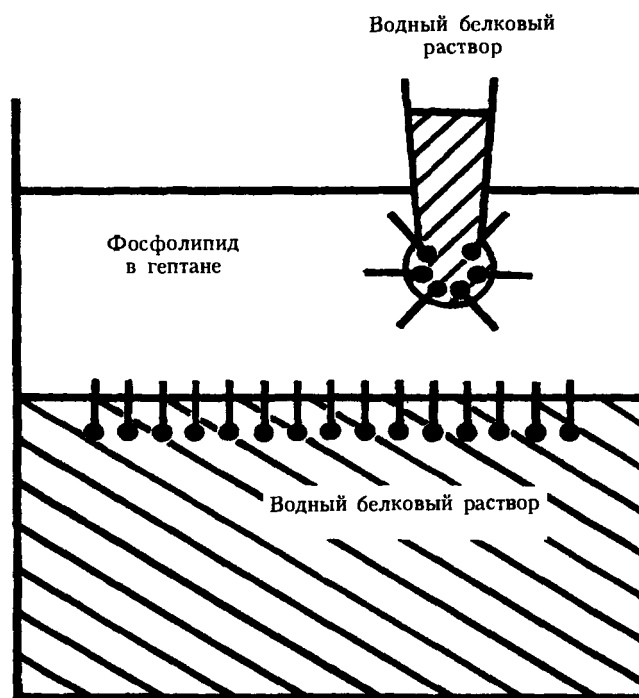
Представленные методы применяются при исследовании практически всех видов клеточных мембран.



Р и с. 2.3. Иерархия моделей биологических мембран



Р и с. 2.4. Самосборка фосфолипидных везикул в водном растворе: 1 — молекулы фосфолипидов; 2 — их лизоформы; 3 — бислойная мембрана; 4 — липосома; 5 — пора в бислойной мембране; 6 — мицелла



Р и с. 2.5. Один из способов конструирования искусственного липидного бислоя: один монослой образуется на границе раздела вода — гептан, другой — вокруг капли водного раствора, внесенного пипеткой в гептан; при их соприкосновении появляется истинный двойной слой

2.2. СОСТАВ И СТРУКТУРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

Как отмечалось выше, основными компонентами биологических мембран являются липиды, белки и углеводы, причем в процентном отношении большая часть массы приходится на долю белков и липидов. Кроме того, в мембранах выявлены такие минорные компоненты, как нуклеиновые кислоты, полиамины и неорганические ионы, а также связанная вода. Соотношение основных структурных компонентов — белков и липидов — значительно колеблется в зависимости от вида мембраны. Так, в мембранах митохондрии массовая доля белка составляет 60 — 65 %, а липидов — 35 — 40 %. В миелиновой оболочке нерва содержится всего 20 — 40 % белка, остальные 60 — 80 %

составляют липиды. В табл. 2.1 приводятся данные об относительном содержании белков и липидов в мембранах различных клеточных оргanelл.

Таблица 2.1

Содержание белков и липидов в различных мембранах*, %

Структура мембраны	Белки	Липиды
Миелин (седалищный нерв)	20 – 40	60 – 80
Эритроциты	60	40
Митохондрии	60 – 65	35 – 40
Ядра	48 – 52	38 – 47
Хлоропласты	50 – 60	40 – 50
Бактерии	55 – 65	10 – 20

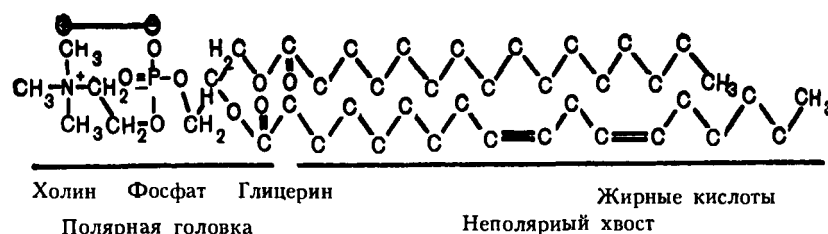
* Относительное содержание белков и липидов в мембранах клеточных оргanelл неодинаково, поскольку они выполняют различные функции.

2.2.1. МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ

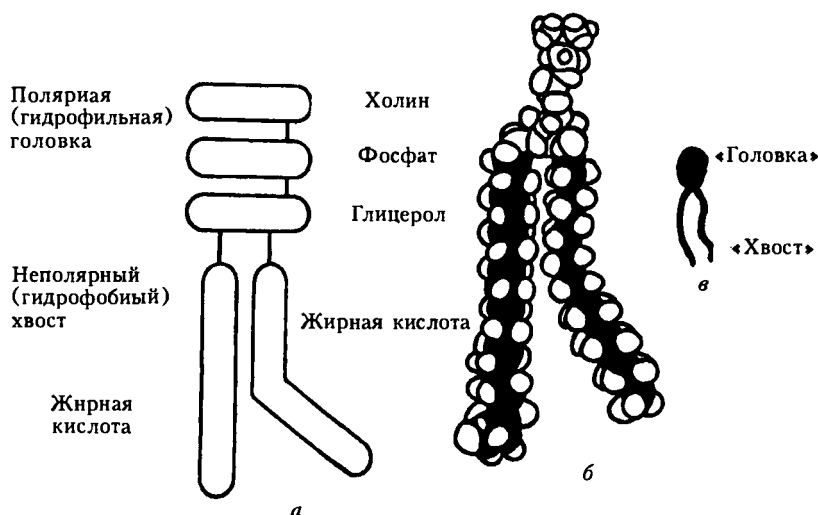
Известно, что мембраны клеток животных, человека, растений и бактерий различны по своему липидному составу. Так, липиды хлоропластов содержат в основном моно- и дигалактодиглицериды, а в липидах мембран животных клеток преобладают фосфатидная кислота и фосфатидилэтаноламин. Различия в составе мембран оргanelл одной клетки менее выражены, однако ядерная, митохондриальная и микросомальная мембраны заметно отличаются друг от друга.

В состав биологических мембран входят липиды трех различных классов: фосфолипиды, гликолипиды и стероиды. Основная роль в формировании бислойной липидной мембраны отводится фосфолипидам: глицерофосфолипидам (производным фосфатидной кислоты) — фосфатидилхолин (рис. 2.6), фосфатидилэтаноламину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитидам, сфинголипидам (производным церамида) и сфингомиелинам. Структурная формула ФЛ, входящих в состав мембран животных клеток, представлена на рис. 2.7. Среди ФЛ наиболее распространены фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин. Так, в мембранах митохондрий половину (48 %) от всех фосфолипидов составляет фосфатидилхолин. В большом количестве этот липид содержится и в других мембранах животных клеток. Особое место среди фосфолипидов занимают фосфатидилсерин и фосфатидная кислота, полярные головки которых заряжены отрицательно,

что определяет поверхностный заряд тех участков мембраны, где сосредоточены молекулы данных липидов (табл. 2.2).



Р и с. 2.6. Структура молекулы фосфатидилхолина (лецитина)



Р и с. 2.7. Молекула фосфолипида фосфатидилхолина, представленная схематически (а), в виде пространственной модели (б) и символа (в)

Различия в составе липидов в мембранах объясняются еще и тем, что ФЛ могут отличаться не только полярными «головками», но и жирно-кислотными хвостами. Функциональные свойства липидов во многом зависят от того, насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты входят в состав ФЛ. На рис. 2.8 и 2.9 показаны структура насыщенных и ненасыщенных жирных кислот и организация сформированных из них монослоев.

Липидный состав мембран клеток млекопитающих, % от массы всех липидов

Таблица 2.2

Липиды	Плазматические мембраны	Митохондрии	Лизосомы	Ядра	Эндоплазматический ретикулум	Комплекс Гольджи
Фосфатидилхолин	18,5	37,5	23,0	44,0	48,0	24,5
Сфингомиелин	12,0	0	23,0	3,0	5,0	6,5
Фосфатидилэтаноламин	11,5	28,5	12,5	16,5	19,0	9,0
Фосфатидилсерии	7,0	0	6,0	3,5	4,0	2,5
Фосфатидилинозитол	3,0	2,5	6,0	6,0	7,5	5,0
Лизофосфатидилхолин	2,5	0	0	1,0	1,5	3,0
Дифосфатидилглицерин	0	14,0	5,0	1,0	0	0
Другие фосфолипиды	2,5	—	—	—	—	—
Холестерин	19,5	—	14,0	10,0	5,5	7,5
Эфиры холестерина	2,5	2,5	8,0	1,0	1,0	4,5
Свободные жирные кислоты	6,0	—	—	9,0	3,5	18,0
Другие липиды	15,0	15,0	2,5	5,0	5,0	16,0

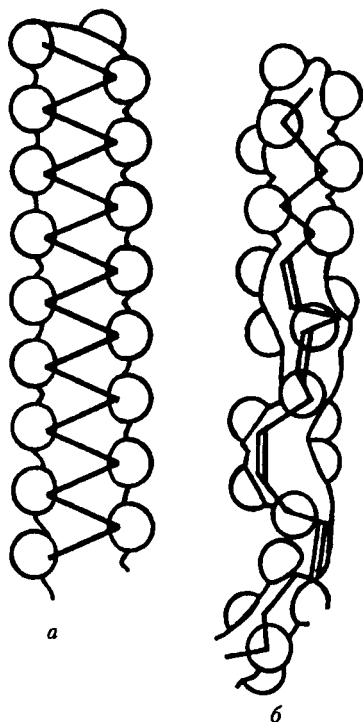


Рис. 2.8. Структура насыщенных (а) и ненасыщенных (б) жирных кислот

межмолекулярными взаимодействиями.

Поверхностные явления в БЛМ описываются уравнением адсорбции Гиббса:

$$-d\sigma = \Gamma_i d\mu_i,$$

где σ — поверхностное натяжение; Γ_i — степень адсорбции на поверхности; μ — химический потенциал.

Для бинарной системы, например для системы липид — вода, уравнение Гиббса приобретает более простой вид:

$$-d\sigma = \Gamma_1 d\mu_1 + \Gamma_2 d\mu_2.$$

При $\Gamma_2 = 0$, т. е. низкой концентрации растворенного вещества, адсорбирующегося на поверхности раздела фаз,

$$-d\sigma = \Gamma_1 d\mu_1.$$

В случае разбавленных растворов $d\mu = RT \ln a = RT \ln C$, тогда

$$\Gamma_1 = -a_1 d\sigma / RT da_1 = -C_1 d\sigma / RT dC_1.$$

Образование мембранных структур представляет собой динамический процесс усложнения (увеличения) числа монослоев липидов в мембране. Искусственные мембраны подразделяют на:

1) монослой — мембрана, состоящая из одного слоя молекул липида на границе полярной фазы (1/2 БЛМ);

2) бислой (двойной монослой) — мембрана, состоящая из двух слоев молекул липида, — БЛМ (размером 5 — 7 нм);

3) мультислойные липосомы — везикулы, мембраны которых образованы несколькими БЛМ (диаметр липосом составляет несколько микрон);

4) монослойные липосомы — везикулы, мембраны которых образованы одной БЛМ (диаметр липосом от 20 до 100 нм);

5) протеолипосомы — липосомы, в состав мембран которых включены белки.

Известно, что формирование и устойчивость мембран определяются поверхностными явлениями и

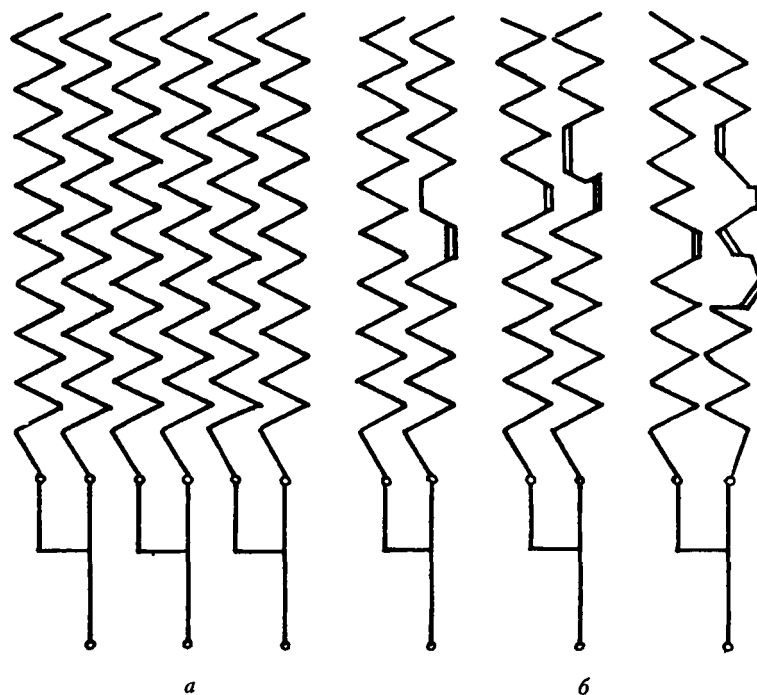


Рис. 2.9. Организация монослойных фосфолипидных мембран: *а* — монослой из ФЛ, содержащих насыщенные жирные кислоты, удельная плотность > 1 , площадь сечения двух углеводородных цепей в плоскости мембраны $2,1 \text{ нм}^2$, проницаемость мембраны низкая, расстояние между углеводородными цепями $0,42 \text{ нм}$; *б* — монослой из ФЛ, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, удельная плотность < 1 , площадь сечения двух углеводородных цепей в плоскости мембраны $4,2 \text{ нм}^2$, проницаемость мембраны высокая, расстояние между углеводородными цепями увеличено

Если $-\text{d}\sigma/\text{d}C$ — поверхностная активность при C , стремящемся к нулю, то для поверхностно-активных веществ $\text{d}\sigma/\text{d}C < 0$, $\Gamma > 0$ (липиды).

Под энергией *гидрофобных взаимодействий* подразумевают работу переноса липида из воды в органическую фазу. Известно, что энергия ГВ увеличивается по мере роста длины углеводородной цепи. ГВ также зависят от:

- 1) характера электростатического взаимодействия между NH^+ -группами и фосфатными группами (PO_4^-);
- 2) энергии гидратации (от 210 до 840 мкДж/моль);
- 3) типа электростатических взаимодействий.

Электростатические взаимодействия подразделяют на:

- латеральные (тангенциальные) — взаимодействие заряженных групп, расположенных в одном полуслое БЛМ;
- трансмембранные — взаимодействия заряженных групп, расположенных по разные стороны одной мембраны;
- межмембранные — взаимодействия заряженных групп, расположенных на поверхности двух соседних мембран.

2.2.2. ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ

Совокупность данных, полученных с помощью различных физико-химических методов, позволяет заключить, что в биологических и модельных мембранах (липосомах и БЛМ) липидный бислой может находиться в состоянии либо твердого двумерного кристалла, либо бимолекулярной жидкой пленки (жидкокристаллическое состояние). В дальнейшем мы будем говорить просто о твердом и жидком состояниях липидного бислоя в мембранах. В обоих случаях сохраняется бимолекулярная структура липидной фазы, а молекулы фосфолипидов имеют плотную гексагональную упаковку в плоскости мембраны, но ее плотность в твердом и жидком состоянии неодинаковая и зависит от структуры жирных кислот. Например, молекула фосфатидилхолина в твердом состоянии бислоя занимает площадь 0,46 — 0,48 нм², а в жидком — 0,6 — 0,8 нм². Соответственно изменяется и толщина бислоя: в жидком состоянии она меньше, чем в твердом. БЛМ в указанных состояниях различаются вязкостью липидной фазы и растворимостью в ней веществ. Молекулярную основу данных различий составляют конформации жирно-кислотных цепей. Отдельная жирно-кислотная цепь может принимать множество конформаций благодаря вращению вокруг одинарных С — С-связей. В липидном бислое за счет плотной упаковки молекул в норме реализуются преимущественно две плоские конформации углеводородной цепи — *транс*- и *цис*-конформации (рис. 2.10, а, б), но существуют и промежуточные (рис. 2.10, в; 2.11, в).

В твердом состоянии все молекулы фосфолипида обладают *транс*-конформацией углеводородных цепей жирных кислот, что определяет их ограниченную подвижность в БЛМ. В этом случае осуществляются лишь небольшие согласованные колебания или вращательные движения (прецессия) возле точки крепления жирной кислоты и полярной группы ФЛ. В жидком состоянии БЛМ возможны тепловые движения жирно-кислотных цепей, сопровождающиеся *транс-гош*-переходами. Важно отметить, что расположенные рядом *гош*-конформации могут образовывать полости в бислое (так называемые кинки), в которые и попадают молекулы, «захваченные» из раствора. Изменения конформации цепей вызывают движение такого кинка вместе с находящимися в нем молекулами вдоль цепи (поперек мембраны) или между цепями (в плоскости мембраны) (рис. 2.12).

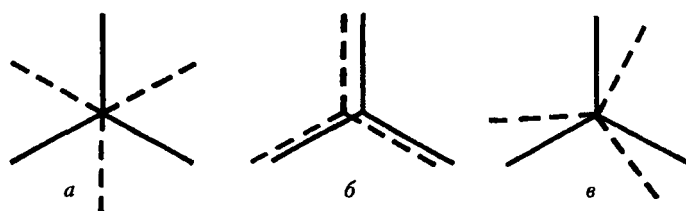


Рис. 2.10. Расположение СН-связей этана в *транс*- (а), *цис*- (б) и промежуточной (в) конформациях (проекция на плоскость, перпендикулярную С—С-связям)

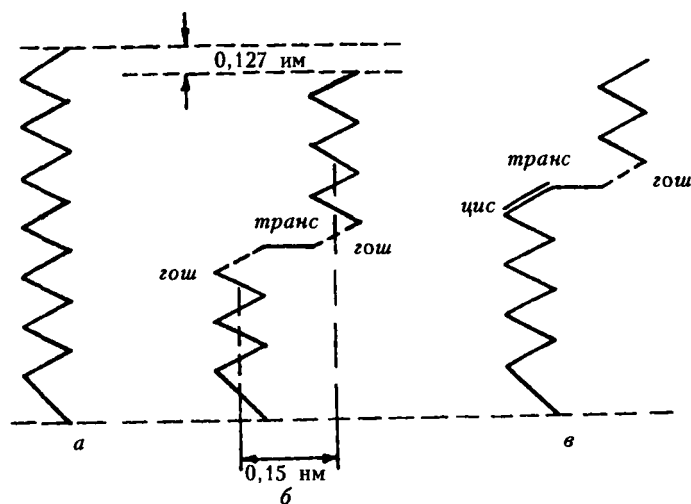


Рис. 2.11. Углеводородные цепи в *транс*-конфигурации (а), *гош-транс-гош*-конфигурации (б), *цис-транс-гош*-конфигурации (в)

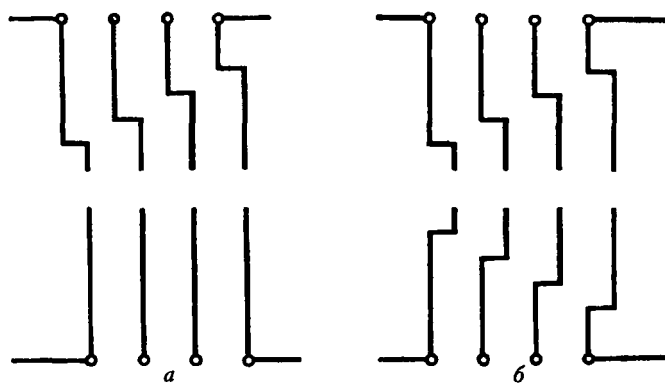


Рис. 2.12. Клик-блоки в углеводородных цепях мембран: а — в одном полуслое; б — в двух монослоях липидного бислоя

Гипотеза петли (кинка) предполагает, что плавление цепей ЖК при фазовом переходе обусловлено вращательной изомеризацией. Наименьшей энергией обладает *транс*-, а наибольшей — *цис*-конфигурация ЖК. Формирование кинка сопровождается уменьшением эффективной длины цепи на 0,13 нм. При этом часть цепи отодвигается на 0,15 нм, образуя свободный объем, в результате общий объем липида увеличивается на 0,025 — 0,050 нм³. Согласно современным представлениям структура кинка способна к диффузии, которая описывается соотношением $D = 0,5 \omega (\Delta L)^2$, где D — коэффициент диффузии; ω — частота скачка кинка; L — шаг одного скачка.

Образование одного кинка облегчает возникновение кинков в соседних цепях, стимулируя их чередование в липидах ПМ. Появление в ходе такого процесса так называемых кинк-блоков (нескольких кинков) приводит, как правило, к разупорядоченности структуры мембраны. Вероятно, трансмембранный перенос малых молекул через мембрану осуществляется внутри свободного объема кинк-блока.

Температура фазового перехода зависит от размера боковых цепей ЖК (чем длиннее цепь и меньше двойных связей, тем выше температура). Действительно, длинные цепи ЖК уменьшают текучесть мембран, а появление двойных связей приводит к ее повышению. Фазовый переход наблюдается, как правило, в интервале температур от 0,2 до 1,0 С°, при этом одна фаза (например, кристаллическая) возникает в матриксе другой фазы (например, жидкой) с образованием большого числа доменов новой фазы. Можно представить данный процесс схематически:



$$\Theta = C_A / (C_A + C_B),$$

где A — жидкая фаза; B — кристаллическая фаза; Θ — степень перехода из одной фазы в другую; C — доля молекул в каждой из фаз.

Тогда

$$K = K_1 / K_2 = \Theta / (1 - \Theta),$$

или после применения уравнения Вант-Гофа (при $\Theta = 0,5$ и $T = T_{\text{фп}}$)

$$\Delta H_{\text{ВГ}} / 4RT_{\text{фп}}^2 = (d\Theta / dT_{\text{фп}}).$$

Кооперативность фазового перехода (σ) может быть определена из соотношения

$$\sigma = (\Theta / H_{\text{ВГ}})^2,$$

а число молекул в кооперативной единице

$$N = 1 / (\sigma)^{1/2}.$$

В случае, когда $\Theta / H_{\text{ВГ}} = 1$, кооперативность в процессе фазового перехода в мембране отсутствует; при $\sigma \ll 1$ процесс кооперативен.

Межмолекулярные контакты в мембране осуществляются за счет

липид-липидных, липид-белковых и белок-белковых взаимодействий.

Липид-липидные взаимодействия зависят от:

- 1) энергии электростатических сил;
- 2) стерического фактора локализации в мембране фосфолипидных «головок» и «хвостов»;
- 3) энергии гидратации и образования водородных связей;
- 4) образования фосфолипидных доменов.

Липид-белковые взаимодействия определяются:

- 1) сорбцией и электростатическим взаимодействием белка и липида на поверхности монослоя;
- 2) внутримембранным встраиванием и взаимодействием белка и липида (аннулярный слой) в БЛМ.

Белок-белковые взаимодействия обусловлены поверхностной и внутримембранной ориентацией молекул белка (образование кластеров).

2.2.3. МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

Белки, входящие в состав мембран, как правило, гидрофобные глобулярные структуры, достаточно прочно связанные с мембранами за счет не только гидрофобных, но и электростатических взаимодействий. По степени влияния на структуру бислоя и силе взаимодействия с мембраной белки делятся на интегральные и периферические: первые пронизывают мембрану, их трудно выделить без разрушения целостности мембраны; вторые локализованы на поверхности липидного бислоя мембраны и легко экстрагируются. Основную роль в ориентации интегральных белков в мембране играют гидрофобные взаимодействия. Периферические белки удерживаются на мембране преимущественно электростатическими взаимодействиями. Молекулы периферических белков разрушаются протеолитическими ферментами (протеазами) полностью, а интегральных белков — частично; протеолизу подвергаются лишь те компоненты интегральных белков, которые вступают в контакт с гидрофильной средой.

В настоящее время идентифицировано более 30 мембранных белков с относительной молекулярной массой 10 000 — 240 000. Мембранные белки выполняют различные функции. Наиболее широко распространены белки-ферменты: интегральные (мембранные АТФ-азы) и периферические (ацетилхолинэстераза, кислая и щелочная фосфатазы). Рецепторы и белки, определяющие иммунную реакцию клетки (антигены), могут быть как интегральными, так и периферическими компонентами мембран. Часто рецепторы входят в состав более сложных мембранных комплексов, содержащих «белки-исполнители». Отметим, что структурные белки, в частности белки цитоскелета, в основном периферические (рис. 2.13).

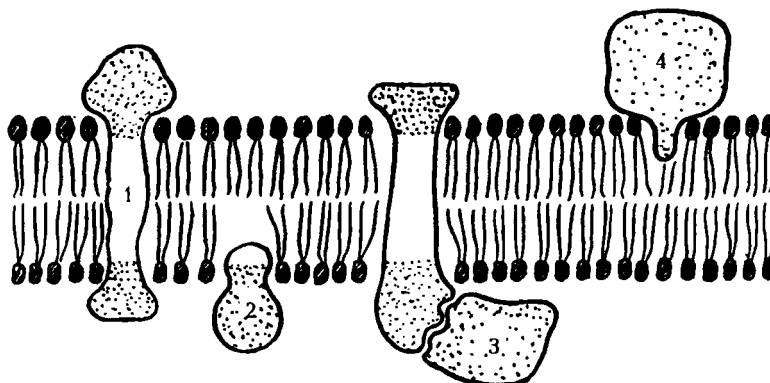


Рис. 2.13. Четыре способа ассоциации мембранных белков с липидным бислоем. Некоторые белки пронизывают бислой насквозь (1), некоторые удерживаются нековалентными взаимодействиями с другими мембранными белками (3). Окончательно не выяснено, существуют ли белки, лишь частично погруженные в бислой (2). Есть мембранные белки, к которым ковалентно присоединена одна или более цепей жирных кислот, помогающих белку «заякориваться» в том или другом монослое. Хотя большинство таких белков являются трансмембранными, некоторые могут ими и не быть (4)

Рассматривая характер липид-белковых взаимоотношений в мембране, необходимо отметить, что данные процессы протекают на фоне латеральной диффузии белков и липидов, а также «флип-флоп»-перехода липидов. Под латеральной диффузией понимают хаотическое тепловое перемещение белков и липидов в плоскости мембраны (скачкообразный последовательный обмен местами молекул белков и липидов). Этот показатель определяется рядом параметров, которые связаны следующими соотношениями:

$$R^{-1} = 2(3)^{1/2}D/A;$$

$$S^2 = 4Dt,$$

где R^{-1} — частота обмена молекул местами, c^{-1} ; D — коэффициент латеральной диффузии, m^2/c ; A — площадь молекулы фосфолипидов, m^2 ; S — расстояние, перескакиваемое молекулой при ЛД; t — время перескока, c .

Например, в мембранах, выделенных из саркоплазматического ретикулума, ЛД (при $40^\circ C$ и $D = 10^{-12} m^2/c$) характеризуется величиной $R^{-1} = 5,9 \cdot 10^7 c^{-1}$ и $A = 7 \cdot 10^{-19} m^2$.

Под «флип-флоп»-переходом фосфолипидов в мембране подразумевается перемещение молекул из одного монослоя в другой; процесс продолжается в течение 15 — 60 мин и является основой асимметричного распределения фосфолипидных молекул по разные стороны мембран. Явление асимметрии обеспечивает постоянство пространственного расположения липидов и структурную организацию липид-белковых комплексов.

2.3. ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА

Плазматическая мембрана представляет собой барьер с высокоизбирательной проницаемостью, который отделяет клетку от окружающей среды и одновременно контактирует с внутриклеточными оргanelлами (рис. 2.14, 2.15). Сама плазматическая мембрана есть сложное образование, состоящее из нескольких слоев. Периферическая зона ПМ у растительных и животных клеток различна. Непосредственно с ПМ соприкасается та область цитоплазмы (гиалоплазма), которая отличается малым содержанием оргanelл. У растительных и бактериальных клеток имеется клеточная стенка — толстая прочная оболочка, состоящая из нескольких слоев, включающих белки, полисахариды и другие специфические компоненты. Толщина оболочки различна, как и ее проницаемость, для низкомолекулярных веществ. В животных клетках эта структура обычно отсутствует.

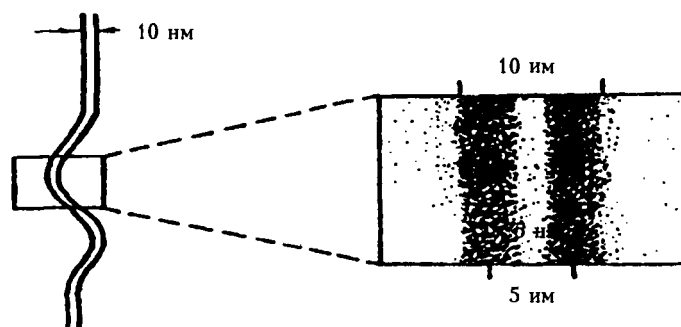


Рис. 2.14. Изображение клеточной мембраны на электронной микрофотографии

У одноклеточных организмов ПМ представляет собой однородный барьер, в то время как у ПМ клетки ткани возможны изменения структуры, связанные с наличием межклеточных контактов. Известно несколько видов межклеточных контактов. При плотном контакте мембраны клеток примыкают друг к другу достаточно близко, возможны и межклеточные соединения, посредством которых осуществляется обмен молекул и ионов. При щелевом контакте мембраны соседних клеток разделены межклеточным пространством шириной до 2 нм. Здесь при функционировании необходим перенос ионов и небольших молекул через межклеточное пространство. Иногда мембраны клеток разделены более широким пространством — от 15 до 35 нм. В данном случае наблюдают изменения примембранного слоя цитоплазмы и даже самой мембраны. Такой тип межклеточного контакта называется десмосомой (рис. 2.16).

Снаружи

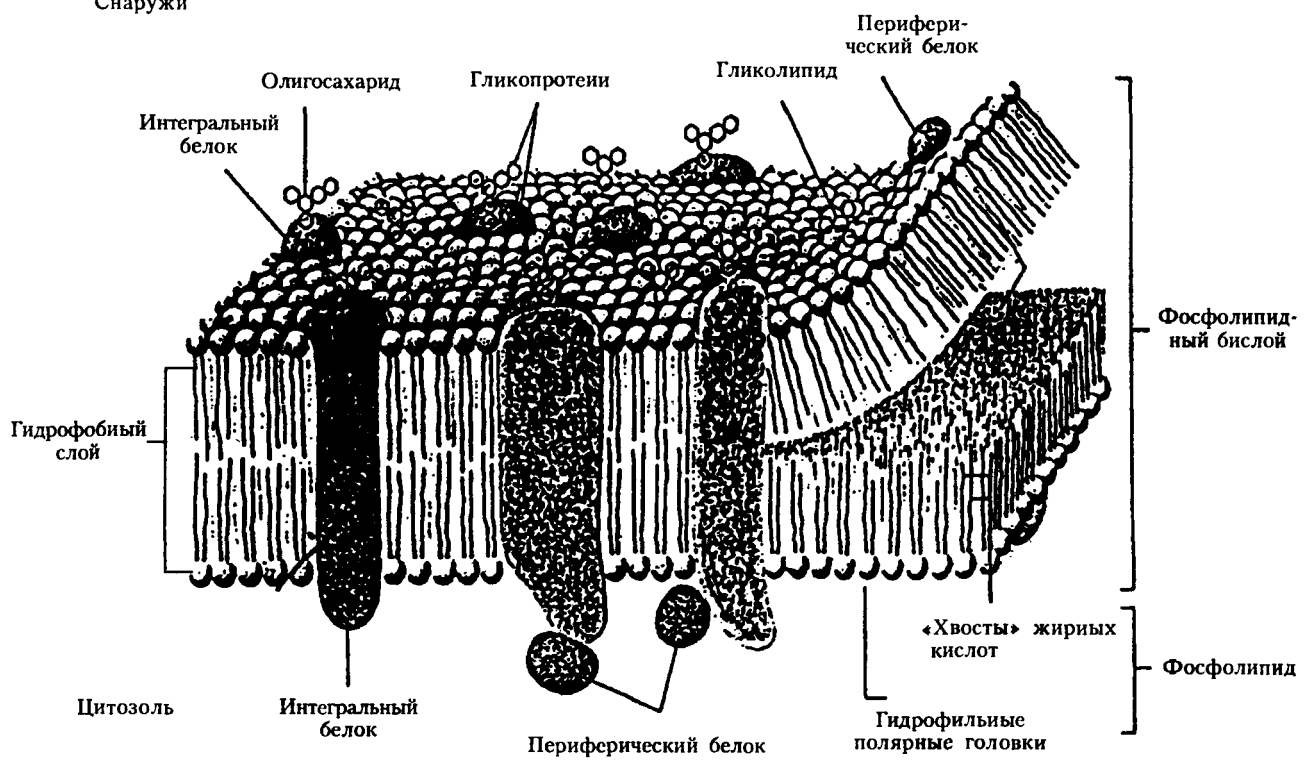
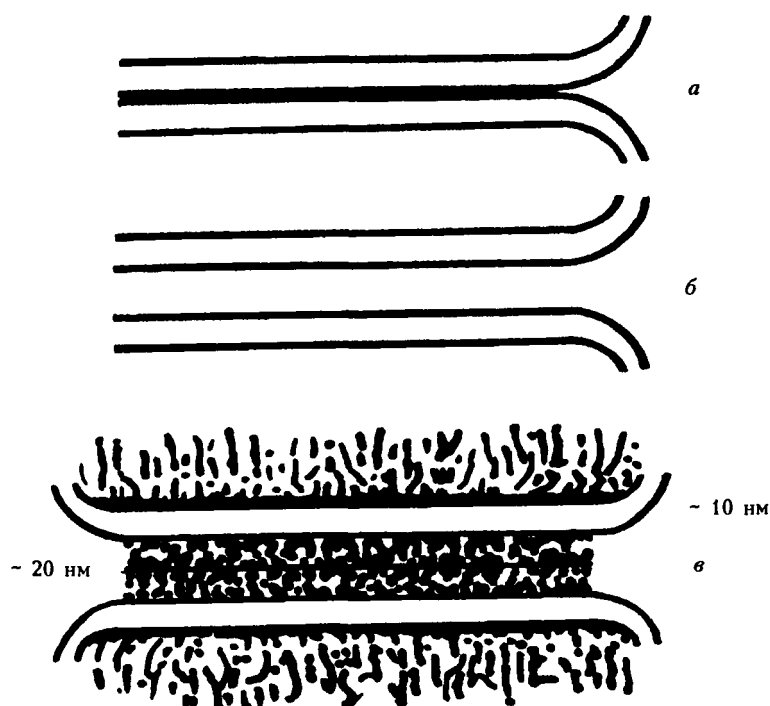


Рис. 2.15. Схематическая модель участка клеточной мембраны



Р и с. 2.16. Типы межклеточных контактов: *а* — плотный, *б* — контакт со щелью; *в* — десмосома

В ПМ постоянно происходит движение макромолекул, ее эластичность меняется. Однако связь механических изменений с функционированием мембраны исследована мало. Трудно также определить, какие механические изменения связаны с самой плазматической мембраной и какие — с гиалоплазмой.

В плазматических мембранах всех эукариотических клеток большинство белков, расположенных на поверхности клетки, и некоторые липидные молекулы наружного монослоя ковалентно связаны с олигосахаридными цепями. Углеводные цепи могут быть сложными. Функции их пока не установлены, но предполагается, что некоторые из олигосахаридных цепей участвуют в процессах межклеточной рецепции.

Функции плазматических мембран многообразны: механическая защита содержимого клеток; их электрическая изоляция от окружающей среды; участие в синтезе компонентов клеточных стенок и локализация рецепторов и поверхностных антигенов; поглощение света; адгезия и слияние; избирательное пропускание ионов и небольших молекул; проведение нервного импульса; экзоцитоз и эндоцитоз; осуще-

ствление пьезоэлектрического эффекта; функция «биологических часов». Большинство из перечисленных функций плазматической мембраны тесно связано с работой целой клетки. Ведущая роль именно плазматической мембраны заключается в обеспечении адгезии, экто- и эндоцитоза.

Адгезия клеток. Одна из важнейших функций плазматических мембран — обеспечение сцепления клеток друг с другом (адгезия). Соединение клеток возможно благодаря наличию на их поверхности специализированных структур — выростов. Осуществляется сцепление клеток разными способами: в одних случаях создается механическое сцепление по типу «выступ — гнездо», в других между молекулами, входящими в состав структур-выступов, устанавливается химическая связь. Существует предположение, что межклеточная жидкость содержит склеивающее вещество. Основой для такого типа контакта может быть органическая соль кальция, образующая связи с карбоксильными группами белков и липидов. Это предположение подтверждается тем, что с понижением концентрации кальция в межклеточной жидкости способность клеток к адгезии уменьшается.

Взаимодействие клеток существенно зависит от величины поверхностного заряда ПМ. Отрицательный заряд на поверхности клеток вызывает их взаимное отталкивание, сила которого определяется величиной электрокинетического потенциала. Если действием трипсина вызвать полную дезинтеграцию клеток тканей (например, куриного эмбриона), то через некоторое время можно наблюдать слияние однотипных клеток и образование агрегатов из клеток одной ткани. Если смешать клетки зародышей разных видов, то их последующая адгезия будет связана не с видовой специфичностью, а с тканевой принадлежностью. По-видимому, организация клеток в ткани обусловлена локализацией на клеточной поверхности специального механизма. Способность к адгезии у всех клеток различна: клетки злокачественных опухолей обладают более низкой способностью к адгезии, чем нормальные, что объясняется пониженным содержанием Ca^{2+} в раковых клетках и соответственно их высоким поверхностным зарядом. Повышение электрокинетического потенциала вызывает возрастание сил взаимного отталкивания, поэтому опухолевые клетки обладают более высокой подвижностью по сравнению с нормальными. Они легко отрываются от опухоли и уносятся с током тканевой жидкости, инициируя образование метастазов.

Экзоцитоз и эндоцитоз. Клетки выделяют секрет и поглощают макромолекулы посредством экзоцитоза и эндоцитоза. При экзоцитозе, когда везикулы сливаются с плазматической мембраной, их содержимое высвобождается наружу. Под термином «эндоцитоз» подразумеваются фагоцитоз и пиноцитоз — процессы, при которых твердые и жидкие материалы транспортируются из внеклеточного пространства внутрь клетки. При эндоцитозе локальные участки плазматической мембраны выпячиваются и отщепляются внутри клетки, формируя пу-

зырьки. При фагоцитозе формируются крупные пузырьки, при пиноцитозе — мелкие. Большинство эндоцитозных пузырьков в конце концов сливаются с первичными лизосомами. При этом образуются вторичные лизосомы, в которых переваривается большая часть макромолекулярного содержимого пузырьков. Основная же часть мембранных компонентов пузырьков удаляется из вторичных лизосом и возвращается в плазматическую мембрану. Оба процесса — экзоцитоз и эндоцитоз — представляют собой локальные ответы ПМ и цитоплазмы клетки при выполнении функционального запроса. Большинство клеток животных участвует в формировании эндоцитозных пузырьков, что вызывает поглощение внеклеточной жидкости и растворенных в ней веществ (жидкофазный эндоцитоз). Крупные внеклеточные частицы, такие, как обломки клеток или микроорганизмы, захватываются фагоцитами — специализированными клетками, имеющими на поверхности рецепторы различных типов и обеспечивающими фагоцитоз. У одноклеточных (например, амёбы) эндоцитоз непосредственно связан с питанием; внутриклеточные вакуоли, образующиеся в результате слияния эндоцитозных пузырьков и лизосом, можно рассматривать как примитивный пищеварительный аппарат (низкомолекулярные продукты поступают в цитоплазму, а непереваренные выбрасываются в клетки). У многоклеточных в результате фагоцитоза изолируются и уничтожаются проникающие в организм патогены.

При пиноцитозе клетки аккумулируют различные молекулы из внешней среды. Пиноцитозные пузырьки обычно очень малы и слабо различимы в световом микроскопе. Они присутствуют в клетке в очень большом количестве. Пиноцитоз присущ клеткам различных типов.

Глава 3

ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ КЛЕТКИ

Из множества присущих клеткам функций мы рассмотрим те, которые свойственны практически всем (или во всяком случае подавляющему большинству хорошо изученных биофизикой) типам клеток. Это проницаемость и транспорт ионов и веществ, биоэлектrogenез, рецепция и подвижность.

3.1. ПРОНИЦАЕМОСТЬ И ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

Одна из важнейших функций биологической мембраны заключается в обеспечении обмена ионов и молекул между клеткой и окружающей средой. С позиций термодинамики клетка — открытая система, непрерывно обменивающаяся веществом и энергией с окружающей средой. Способность биологических мембран пропускать через себя различные вещества называется проницаемостью. Данный раздел биофизики посвящен динамике входа веществ в клетку и выхода из нее, механизмам распределения веществ между клеткой и средой в состоянии покоя и при функционировании (работа каналов, переносчиков и насосов). Изучение проницаемости клеток имеет большое значение, поскольку с данной функцией связаны практически все процессы жизнедеятельности клетки: метаболизм, генерация и проведение биопотенциалов, секреция, рецепция и т. д. Изучение процессов проницаемости имеет также большое практическое значение для биологии, сельского хозяйства, медицины, фармакологии и токсикологии.

3.1.1. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ

Для исследования проницаемости клеточных мембран в настоящее время применяют ряд физико-химических методов: объемные (осмотические), индикаторные, методы аналитической и коллоидной химии, метод определения электропроводности, метод меченых атомов, регистрация флуоресценции, радиоспектроскопия и др.

Наиболее простые *осмотические методы* исследования проницаемости мембраны основаны на регистрации изменений объема клеток при помещении их в гипер- или гипотонические растворы. Когда клетки помещают в гипертонический раствор, то вследствие выхода из них воды объем их уменьшается, а по мере поступления вещества в клетку разность осмотического давления снижается и она восстанавливает свой первоначальный объем. По скорости восстановления объема клеток судят о скорости проникновения в них веществ. Для объективной оценки этих процессов существуют некоторые дополнительные процедуры: взвесь клеток центрифугируют и либо определяют суммарный объем взвеси с помощью гематокрита, либо оценивают динамику изменения светопропускания или показателя преломления клеток. К недостатку данного метода относится возможность применять его для работы с ограниченным кругом объектов (крупные клетки водорослей, эритроциты и т. п.). При исследованиях проницаемости таких веществ (например, сахара и аминокислоты) можно использовать лишь их высокие концентрации (при малых концентрациях веществ трудно определить изменение объема).

Индикаторные методы (с использованием флуоресцентных зондов) основаны на изменении окраски клеточного содержимого при поступлении определенных веществ. Суть метода заключается в том, что сначала в клетку вводят хромофор (индикатор), а затем помещают ее в раствор с исследуемым веществом и наблюдают изменение окрашивания. Недостатки данной группы методов связаны с тем, что малые концентрации красителей трудно обнаружить, а большие токсичны; кроме того, большая часть красителей в клетке, как правило, включается в метаболизм, что искажает результаты исследования. Очевидно, что осмотический и индикаторный методы позволяют получить только качественный ответ, но не используются для количественной оценки изменения проницаемости мембраны.

Весьма надежны в исследованиях проницаемости *химические методы*, основанные на непосредственном анализе состава внутриклеточного содержимого. Однако эти методы сложны, и число объектов, для которых они применимы, ограничено.

В некоторых случаях проницаемость определяют *методом кондуктометрии (электропроводности)*. Исследование электрических параметров (омическое и емкостное сопротивление) клеток и компонентов плазмы крови и других тканей проводят с помощью широкополостного синфазного моста переменного тока, что обеспечивает максимальную чувствительность и независимость плечевого коэффициента от частоты подаваемого электрического тока. Вспомогательные плечи моста образованы вторичными обмотками широкополостного высокочастотного трансформатора. Отношение вспомогательных плеч составляет 1:20. Амплитуда тестирующего сигнала не должна превышать 100 мВ, частотный диапазон — от 0,2 до 1 000 кГц.

Одним из наиболее адекватных способов исследования проницае-

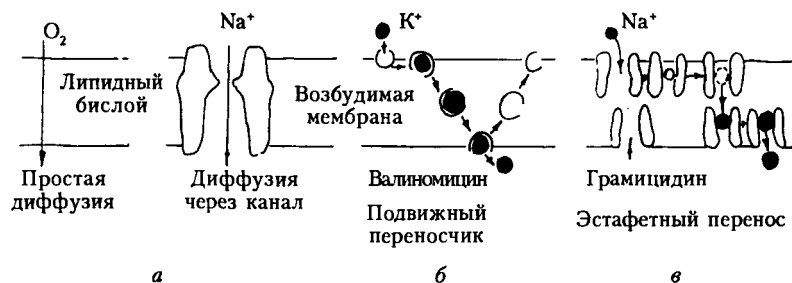
мости клетки является *метод меченых атомов*, который позволяет с помощью радиоактивных и стабильных изотопов исследовать перераспределение и транспорт ионов и различных веществ. Исследуемое вещество «метят», включая в его молекулы радиоактивные атомы. Если данное вещество представлено атомами или ионами, то их можно заменить радиоактивными или стабильными изотопами данного элемента. После поступления меченого вещества в клетку оно регистрируется с помощью счетчиков радиоактивных частиц. Поскольку радиоактивность клетки пропорциональна количеству поступившего в нее вещества, данный метод дает количественные результаты. При наблюдении выхода вещества из клеток в среду предварительно вводят меченое вещество путем микроинъекции или выращивания объекта исследования в среде, содержащей меченое вещество. Затем определяют выходящие из клетки потоки данного вещества. Данный метод точный и пользуется большой популярностью. Он позволяет вводить в клетку исследуемое вещество в низких концентрациях, не нарушающих ее жизнедеятельность, изучать проницаемость не только молекул чужеродных клетке или ядовитых веществ, но и соединений, входящих в состав клеток и межклеточной жидкости организма. С помощью изотопного метода удастся дифференцировать потоки вещества из среды в клетку и обратно. Особая ценность его в том, что он удобен для исследования входа и выхода веществ в нативных условиях.

Для работы со стабильными изотопами в биофизике широко используется метод масс-спектрометрии.

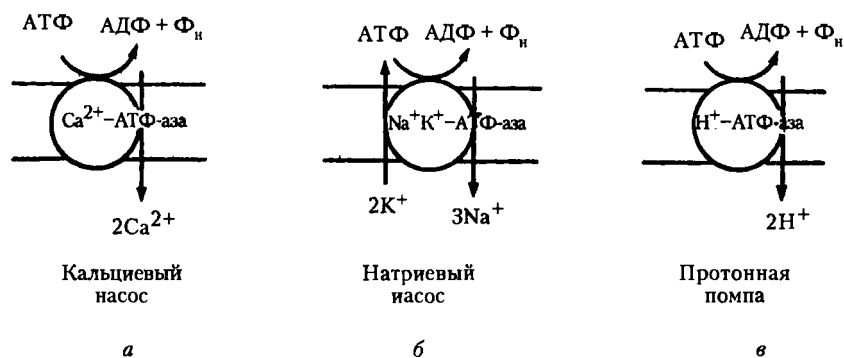
Большая часть имеющихся на сегодня сведений о механизмах движения ионов через биологические мембраны, генерации биоэлектрических потенциалов, распространении возбуждения была получена именно с помощью метода меченых атомов.

3.1.2. ПАССИВНЫЙ И АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

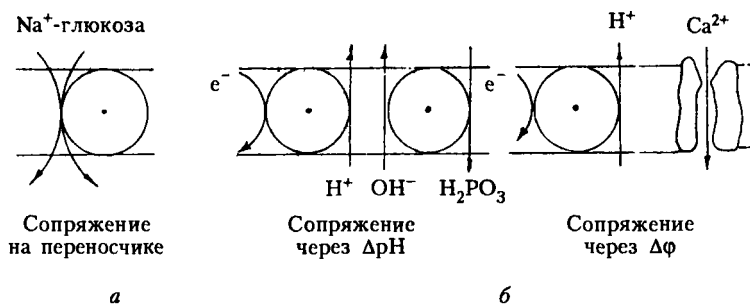
Поступление нейтральных молекул и ионов в клетку осуществляется за счет пассивного и активного транспорта. Пассивный транспорт не связан прямо с затратой химической энергии; он осуществляется в результате диффузии веществ в сторону меньшего электрохимического потенциала. Активный транспорт происходит при затрате химической энергии АТФ или переносе электрона по дыхательной цепи митохондрий. Большое значение для жизнедеятельности клеток имеет явление сопряженного транспорта веществ и ионов, которое заключается в том, что перенос одного вещества (иона) против электрохимического градиента обусловлен одновременным переносом другого вещества (иона) в направлении снижения электрохимического градиента. Схематически совокупность данных процессов представлена на рис. 3.1 — 3.3.



Р и с. 3.1. Пассивный перенос ионов через мембраны: *a* — все биологические мембраны; *б* — возбудимые цитомембраны нервных и мышечных волокон; *в* — модельные мембраны в присутствии ионофорных антибиотиков



Р и с. 3.2. Активный перенос ионов при работе транспортных АТФ-аз: *a* — мембраны саркоплазматического ретикулума; *б* — цитоплазматические мембраны; *в* — энергосопрягающие мембраны митохондрий, хлоропластов и бактерий



Р и с. 3.3. Сопряженный транспорт ионов и веществ через мембраны: *a* — апикальная мембрана клеток эпителия; *б* — внутренняя мембрана митохондрий; e⁻ — поток электронов по дыхательной цепи

3.1.2.1. Пассивный транспорт

Различают следующие виды пассивного транспорта веществ в клетках и тканях: диффузия, осмос, фильтрация.

Диффузия

Диффузия — основной механизм пассивного транспорта веществ, обусловленный наличием концентрационного градиента.

Различают несколько видов диффузии:

- простая диффузия, когда диффундирующее вещество движется по градиенту через мембрану, не образуя комплекса или проникая через канал;

- ограниченная диффузия, когда ион, проходящий через мембрану, подвергается воздействию заряженных групп белков, находящихся в канале и ограничивающих скорость поступления вещества в клетку;

- облегченная диффузия, осуществляемая с помощью так называемых переносчиков — белков или молекулярных комплексов, обладающих специфическим сродством к определенным веществам.

Простая диффузия — это самопроизвольный физический процесс проникновения вещества из области высокой в область меньшей его концентрации в результате теплового хаотического (броуновского) движения молекул. Математическое обоснование процесса диффузии впервые дал А. Фик. Согласно первому закону Фика поток диффузии прямо пропорционален градиенту концентрации dC/dx :

$$J = -D (dC/dx),$$

где J — количество молей вещества, перенесенного за единицу времени, моль $\cdot$ см⁻² $\cdot$ с⁻¹; D — коэффициент диффузии, см²/с⁻¹; C — концентрация; x — координата.

Таким образом, поток вещества при диффузии — это количество вещества (в молях), диффундирующего за единицу времени через данную площадь. Градиент концентрации — изменение концентрации вещества на единицу длины в направлении диффузии. Знак «минус» в правой части уравнения означает, что диффузия происходит из области большей концентрации вещества в область меньшей. Коэффициент диффузии зависит от природы вещества, температуры и характеризует его способность к диффузии. Для низкомолекулярных неэлектролитов коэффициент диффузии $D = 10^{-5}$ см²/с.

Диффузия осуществляется в следующих основных случаях:

- перенос ионов или вещества в перемешиваемых слоях вблизи мембраны;

- транспорт неэлектролитов (газов) через мембрану.

Обычно при исследовании проницаемости клеточной мембраны концентрационный градиент определить трудно, поэтому для описания диффузии вещества через нее пользуются более простым уравнением:

$$J = -D (C_{\text{вн}} - C_{\text{нар}})/h = P (C_{\text{нар}} - C_{\text{вн}}),$$

где $C_{\text{вн}}$, $C_{\text{нар}}$ — количество вещества соответственно по разные стороны мембраны, моль; P — коэффициент проницаемости, аналогичный коэффициенту диффузии, но зависящий не только от природы вещества и температуры, но и от свойств мембраны.

В общем случае нестационарной диффузии концентрация вещества в любой точке может меняться со временем (второй закон Фика):

$$dC/dt = D \frac{d^2C}{dx^2}.$$

Профиль концентрации, достигаемый к моменту времени t , характеризуется параметром $\bar{x}$:

$$\bar{x}^2 = 4Dt.$$

В стационарном состоянии, когда $dC/dt = 0$, выполняется условие $dC/dx = \text{const}$, и в данном случае профиль изменения концентрации вещества линеен.

Проникновение растворенных частиц, обладающих электрическим зарядом, через клеточную мембрану зависит от ее концентрационного и электрического градиентов. Поэтому при противоположно направленном электрическом градиенте перенос ионов может осуществляться в направлении, противоположном концентрационному градиенту. При наличии этих двух движущих сил транспорт ионов осуществляется по электрохимическому градиенту.

Облегченная диффузия имеет большое значение для функционирования клетки. Установлено, что скорость проникновения в клетку глюкозы, глицерина, аминокислот и некоторых других веществ не имеет линейной зависимости от их концентрации. Причем при определенных концентрациях скорость их проникновения значительно выше, чем при простой диффузии. Эта особенность объясняется тем, что в данном случае наблюдается не простая, а облегченная диффузия, механизм которой заключается в следующем. Вещество самостоятельно диффундирует через мембрану, но скорость диффузии намного возрастает, если молекулы этого вещества (А) образуют комплекс с молекулами переносчика (Х), который хорошо растворяется в липидах. На поверхности мембраны молекулы А соединяются с молекулами Х и в виде комплекса АХ проникают в клетку. Далее молекулы А освобождаются, а молекулы переносчика диффундируют к наружной поверхности мембраны и связываются с новыми молекулами А. Диффузия с участием переносчика, как и простая, происходит до тех пор, пока концентрация по обе стороны мембраны не станет одинаковой. Если количество вещества в среде повысить так, что при этом израсходуются все молекулы вещества Х, то скорость диффузии при дальнейшем повышении концентрации вещества А увеличиваться не будет. В общем случае кинетика облегченной диффузии подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментэна:

$$J = J_{\max} S_{\text{нар}} / K_m + S_o,$$

где $J_{\max}$ — максимальный поток; $S_{\text{нар}}$ — наружная концентрация переносимого вещества; K_m — константа Михаэлиса — Ментена.

Данный тип диффузии осуществляется с помощью как подвижных, так и фиксированных в мембране переносчиков. На рис. 3.4 представлена схема, иллюстрирующая процесс облегченной диффузии, а на рис. 3.5 показана зависимость скорости простой и облегченной диффузии от концентрации транспортируемых молекул. В ионном канале цепь фиксированных переносчиков может выстилать изнутри пору канала и молекула проникающего вещества в этом случае передвигается от одного участка цепи к другому. Участие переносчика в осуществлении данного механизма диффузии подтверждается конкуренцией между веществами при их проникновении в клетку. Так, поступление глюкозы в мышечные волокна уменьшается при введении в среду арабинозы или маннозы. Данная конкуренция обусловлена тем, что при добавлении в среду этих сахаров в равной мере используются молекулы переносчика и это затрудняет транспорт глюкозы. Если переносимое вещество образует прочный комплекс с переносчиком, то соединение последнего с другими веществами исключается и перенос одного из веществ будет осуществляться максимально быстро. Предполагается, что данный механизм лежит в основе действия известных ингибиторов транспорта пентоз и гексоз — флоридзина и флоретина.

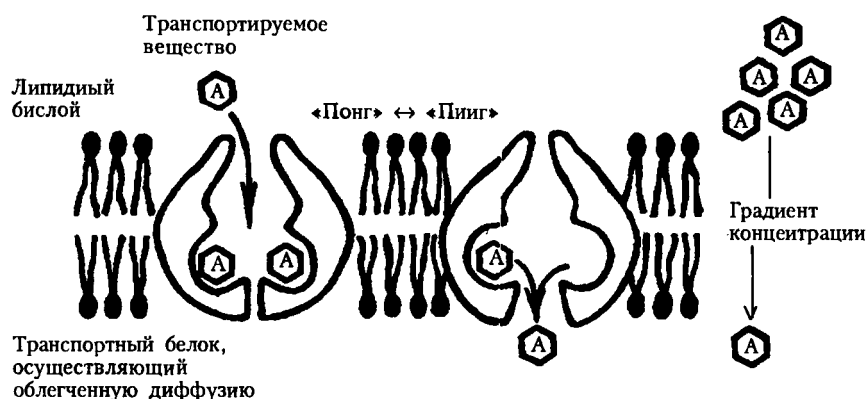
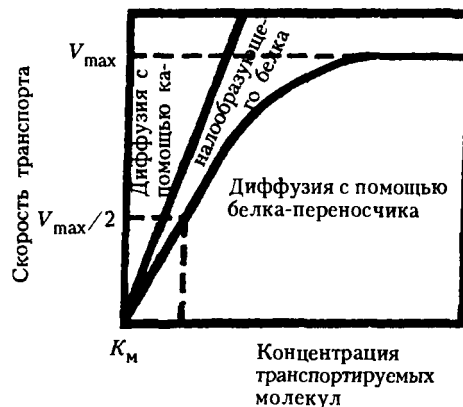


Рис. 3.4. Схема одного из вариантов облегченной диффузии. Белок может существовать в двух различных конформационных состояниях: «понг» — когда участки для связывания переносимого вещества А открыты с наружной стороны бислоя; «пинг» — когда те же участки открыты с другой стороны. Этот процесс полностью обратим, но при более высокой концентрации вещества А с наружной стороны бислоя с белком-переносчиком будет связываться большее количество молекул в первом состоянии, что приведет к транспорту вещества А по градиенту его концентрации

Рис. 3.5. Кинетика диффузии с помощью каналообразующего белка и при участии белка-переносчика. В первом случае скорость всегда пропорциональна концентрации транспортируемого вещества, во втором она достигает максимума ($V_{\max}$) при насыщении белка-переносчика. Концентрация, при которой скорость составляет половину максимального значения, принимается равной константе связывания K_m молекул транспортируемого вещества данным переносчиком



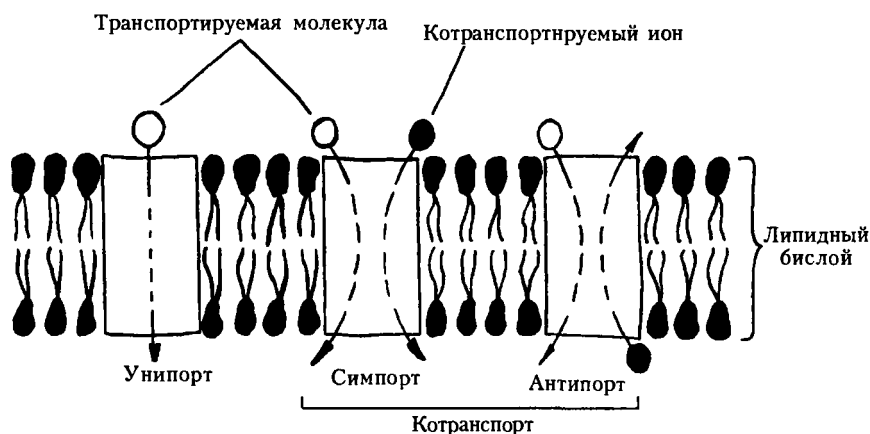
В настоящее время природа молекул-переносчиков, облегчающих диффузию, неясна, хотя ряд авторов предполагают, что это комплексы, растворимые в липидах клеточной мембраны. Особенности кинетики проникновения веществ с помощью переносчиков указывают на ее сходство с каталитическим процессом, аналогичным ферментативной реакции. Поэтому облегченную диффузию принято также считать каталитической, где роль фермента-катализатора играет вещество, облегчающее диффузию. Как и ферменты, эти переносчики не могут вызывать процессы, невозможные по термодинамическим условиям, т. е. перенос вещества против градиента, но ускоряют проникновение веществ через мембрану по сравнению с обычной диффузией.

Разновидностью облегченной диффузии является так называемая **обменная диффузия**, при которой переносчик образует соединение с диффундирующим веществом и перемещается с ним от одной поверхности мембраны к другой, где молекула переносчика освобождается, ее место занимает другая молекула того же вещества и комплекс переносится обратно. При работе переносчиков в случае обменной диффузии концентрация вещества по обе стороны мембраны не изменяется. Существование обменной диффузии было доказано методом меченых атомов на эритроцитах, митохондриях и др.

Рассматривая функции белков-переносчиков в процессе диффузии, как правило, отмечают 2 основных способа переноса веществ:

— *унипорт* — перенос, в котором белки переносят растворенное вещество с одной стороны мембраны на другую;

— *котранспорт* — перенос, когда транспорт одного вещества зависит от одновременного (или последовательного) переноса другого вещества в том же направлении (*симпорт*) или в противоположном (*антипорт*) (рис. 3.6). Так, поступление сахаров в бактериальные клетки осуществляется посредством симпорта протонов и молекул сахара, а по принципу антипорта работает Na, Ca-обменник.



Р и с. 3.6. Схема работы транспортных белков, функционирующих по принципу унипорта, симпорта и антипорта

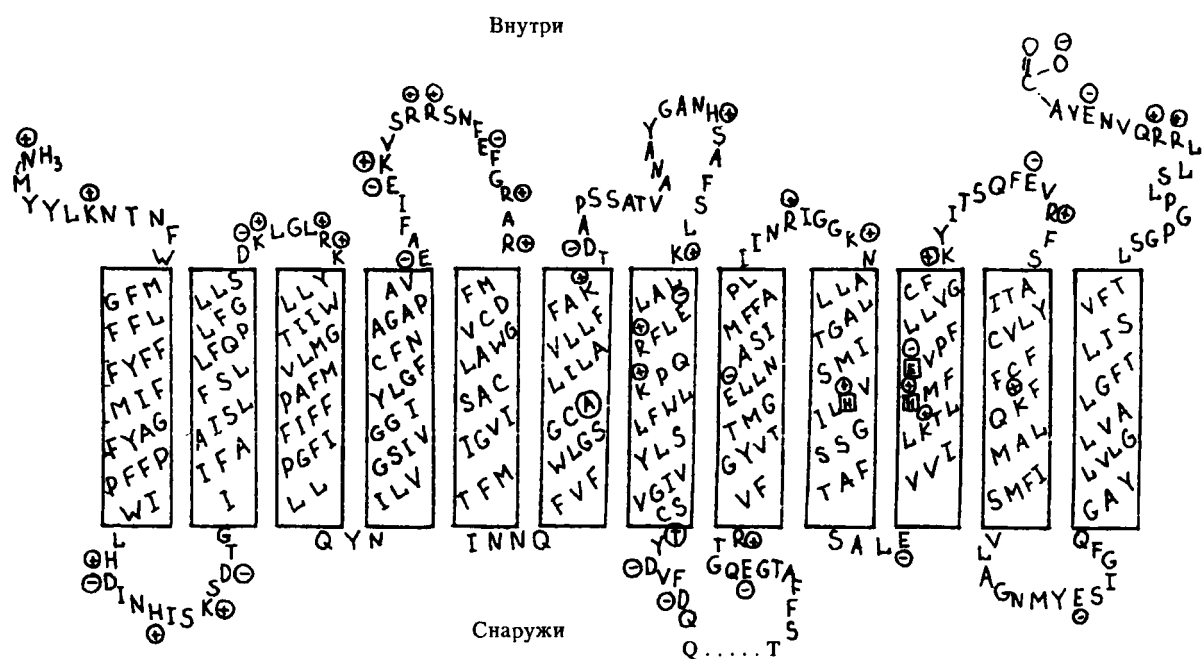
В качестве примера симпорта можно привести переносчик глюкозы из мембран эритроцитов, а также лактопермеазу из *E. Coli*. Переносчик глюкозы охарактеризован наиболее полно из всех белков, катализирующих диффузию D-глюкозы через мембрану. Очищенный переносчик из эритроцитов представляет собой гликопротеины с относительной молекулярной массой, равной 55 000. Он может находиться в мембране в виде димера. Если судить по данным об аминокислотной последовательности, то переносчик должен иметь 12 трансмембранных α -спиральных участков. Переносчик легко встраивается в фосфолипидные везикулы.

Ингибиторами переносчиков глюкозы являются флоретин и цитохалазин, которые связываются с ним в стехиометрии 1 : 1.

Между переносчиком глюкозы из клеток млекопитающих и некоторыми транспортными системами бактерий наблюдается значительная гомология. Гомология существует также с переносчиками, осуществляющими симпорт H^+ -арабинозы и H^+ -ксилозы. Переносчик глюкозы из мембраны эритроцитов не транспортирует H^+ и не способен к транспорту против градиента глюкозы.

Одной из основных структур, ответственных за перенос лактозы через биологические мембраны, является лактопермеаза. Последнюю можно изучать в цитоплазматических мембранных везикулах. Этот белок имеет относительную молекулярную массу, равную 46 500. Функциональной единицей в мембране является мономер. Хотя имеются данные, указывающие на существование димерной формы. Полагается, что лактопермеаза имеет 12 или 14 трансмембранных α -спиралей. Впервые модель строения лактопермеазы предложена Кабаком (рис. 3.7).

Особенности транспорта лактозы с участием лактопермеазы достаточно хорошо изучены.



Р и с. 3.7. Аминокислотная последовательность Р⁺-лактопермеазы из E. Coli. Аминокислотные остатки, заключенные в кружки, определяют субстратную специфичность (специфичность связывания сахара), а остатки, заключенные в квадратики, участвуют в сопряжении протонирования и транспорта лактозы

1. Пермеаза имеет одно или более мест связывания для протона и одно для лактозы. Эти места бывают поочередно обращены к переплазматической и цитоплазматической сторонам мембраны. Соответствующий конформационный переход является лимитирующей стадией процесса. Максимальная скорость транспорта равна $25 - 50 \text{ с}^{-1}$. При наличии трансмембранного протонного электрохимического потенциала ($\Delta \mu_{\text{H}^+}$) K_m для лактозы составляет 80 мкмоль ; место связывания протона характеризуется высоким pK_a , поэтому большую часть времени протонировано. При $(\Delta \mu_{\text{H}^+}) = 0$ значение K_m для лактозы гораздо выше — $15 - 20 \text{ ммоль}$.

2. Транспорт лактозы обязательно сопровождается транспортом H^+ со стехиометрией $1 : 1$.

3. Конечным результатом транспорта является перенос через бислой положительного заряда. Следовательно, важную роль в установлении равновесия и скорости транспорта играют трансмембранный электрический потенциал ($\Delta \Psi$) и разность протонного химического потенциала ($\Delta \mu_{\text{H}^+}$). В бактериальных мембранах транспорт веществ, в частности мальтозы, может осуществляться через специализированные структуры — порины. Порины образуют поры, которые функционируют как молекулярные сита, опосредуя диффузию небольших гидрофильных молекул через наружную мембрану грамотрицательных бактерий (рис. 3.8). Относительная молекулярная масса поринов варьирует от $28\,000$ до $48\,000$. В мембране они присутствуют в виде тримеров.

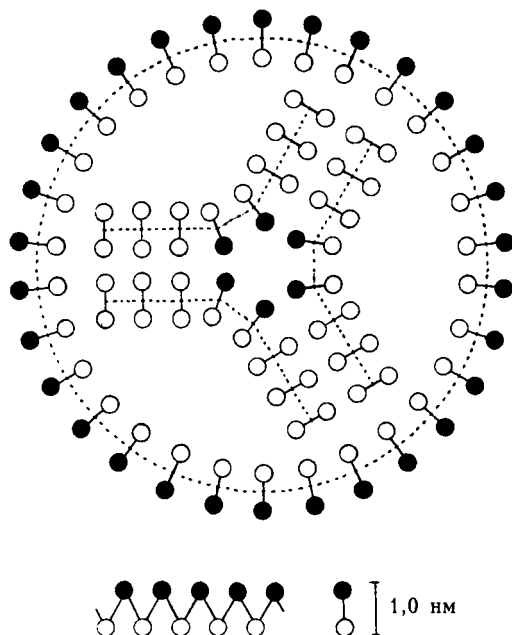


Рис. 3.8. Модель поринового тримера (вид сверху); каждая субъединица содержит пору, внутренняя поверхность которой образована остатками гидрофильных аминокислот. Каждая «гантелька» — это β -цепь из чередующихся гидрофильных (светлые кружки) и гидрофобных (темные кружки) остатков. Сплошные линии — границы между отдельными субъединицами

Наиболее полно к настоящему времени изучены 4 вида поринов из *E. Coli*. Их характерная черта — образование наполненного водой трансмембранного канала. Порины прочно связаны с липополисахаридами и с пептидогликаном. Однако эти соединения не являются необходимыми для функционирования поринов. Образованные последними каналы различаются как по размерам, так и по селективности. Селективность определяется наличием внутри или около входа в канал заряженных аминокислотных остатков. Электронно-микроскопические исследования показали, что порины могут образовывать один большой канал или три независимых. Главной функцией поринов, и особенно порина Lamb, является стимуляция накопления мальтозы в клетке.

В 1960-х гг. были обнаружены *ионофоры* — небольшие гидрофобные молекулы, способные растворяться в липидных бислоях и повышать их проницаемость для ионов. Многие ионофоры синтезируются микроорганизмами и обладают свойствами антибиотиков (транспортные антибиотики). Различают два класса ионофоров — подвижные переносчики ионов и каналообразующие ионофоры. Ионофоры первого класса переносят ионы через углеводородную область мембраны, и их активность связана с собственной диффузией через мембрану. К этой группе принадлежат валиномицин, нигерицин, нонактин, кальциевые ионофоры — A_{23187} и иономицин (рис. 3.9). Ко второй группе транспортных антибиотиков относятся каналообразователи, формирующие канал, который пронизывает мембрану. В начале транспорта ион входит в него на одной стороне мембраны, диффундирует по нему и выходит на другой. Стимуляция транспорта ионов по этому механизму не связана с движением (латеральная диффузия) самого антибиотика-каналообразователя в мембране. К этой

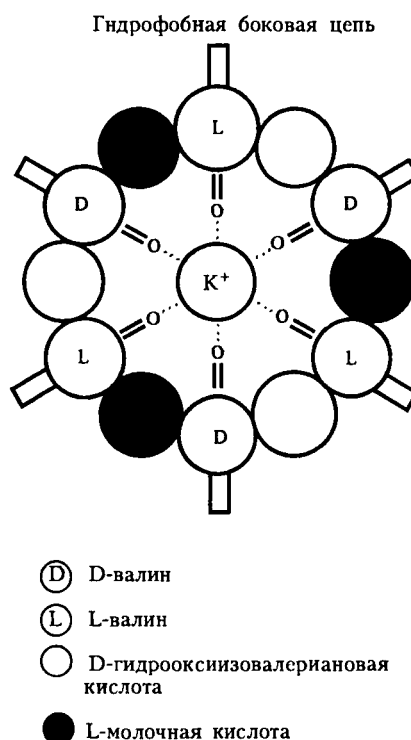


Рис. 3.9. Молекула валиномицина, связанная с расположенным в центре кольцевой структуры ионофора ионом K^+ с помощью атомов кислорода

группе относятся грамицидин А, полиеновые антибиотики (нистатин, амфотерицин В, аламетицитин и др.).

Очень широкое применение в биологии и медицине нашел ионофор валиномицин — полимер, повышающий проницаемость мембраны для ионов калия. Он обладает кольцеобразной структурой с последовательно трижды повторяющимися четырьмя остатками (см. рис. 3.9). Наружные группы циклической молекулы валиномицина контактируют с гидрофобной областью липидного бислоя, а за счет внутренних групп полярной части молекулы один ион калия связывается с шестью атомами кислорода. Важно, что валиномицин связывает ионы К предпочтительнее, чем ионы Na. Это обусловлено тем, что дегидратация иона К требует меньшей затраты энергии, чем дегидратация иона Na (на 67 кДж/моль). Примечательно, что молекула валиномицина обладает трансмембранной подвижностью и процесс присоединения иона К ступенчатый. В ходе связывания иона молекулы воды гидратной оболочки постепенно вытесняются кислородными атомами антибиотика, что снижает активационный барьер связывания и высвобождения иона. Поэтому валиномицин присоединяет и высвобождает ион K^+ многократно (до 1 000 ионов за 1 с).

Среди каналобразующих белков наиболее хорошо изучен транспортный антибиотик грамицидин А — полипептид, состоящий из 15 аминокислотных остатков. Он образует трансмембранный канал при наличии двух молекул. Этот димер имеет спиральную структуру и формирует канал (диаметр 0,4 нм), окруженный полярными группами пептидов, а карбоксильные группы образуют кратковременные координационные связи с катионом в момент его прохождения по каналу.

Грамицидиновые каналы катионселективны: при оценке их избирательной проводимости была обнаружена такая последовательность проводимости для одновалентных катионов: $K^+ > Cs^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Tl^+ > Li^+$. Проводимость плоской БЛМ, содержащей небольшое количество грамицидина А, непостоянна: для ионов Na она меняется во времени ступенчато, что объясняется спонтанным образованием каналов. В зависимости от состава липидов и других условий время жизни грамицидинового канала составляет от 30 мс до 60 с. В течение 1 с по одному каналу может пройти 10^7 ионов, в то время как скорость транспорта с подвижным переносчиком составляет 1 000 ионов за 1 с.

Осмоз и фильтрация

Для клеточных мембран характерна полупроницаемость, т. е. способность пропускать одни вещества (в частности, воду) и не пропускать другие. Молекула воды проходит сквозь клеточные стенки в результате различий гидростатического давления и осмоса. **Осмоз** — это процесс перемещения молекулы воды через полупроницаемую мембрану из области меньшей концентрации растворенного вещества в

область большей. Сила, вызывающая движение растворителя, называется *осмотическим давлением*. Осмотическое давление раствора зависит от количества растворенных ионов и температуры. В соответствии с уравнением Вант-Гоффа осмотическое давление (π) раствора прямо пропорционально концентрации (C) растворенного вещества и абсолютной температуре раствора (T):

$$\pi = iRTC,$$

где i — изотонический коэффициент, зависящий от степени диссоциации электролита и показывающий, во сколько раз увеличивается количество растворенных частиц при диссоциации молекул; для неэлектролитов $i = 1$, для электролитов $i > 1$; R — газовая постоянная.

Гидравлическая проводимость мембраны в данном случае определяется из соотношения

$$J = L_p (P - \pi),$$

где P — гидростатическое давление в клетке; L_p — гидравлическая проводимость; J — поток воды.

Предполагается, что осмотическое давление обусловлено воздействием на мембрану молекул растворителя. Число молекул растворителя, достигающих мембраны со стороны раствора, меняется, так как часть площади поперечного сечения мембраны занята частицами растворенного вещества. Исходя из этого можно считать, что осмос представляет собой диффузию молекул растворителя. Скорость осмотического переноса воды через мембрану можно найти из уравнения

$$dm/dt = -KS (P_{\text{вн}} - P_{\text{нар}}),$$

где dm/dt — количество воды, проходящей через мембрану площадью S за единицу времени; K — коэффициент проницаемости; $P_{\text{вн}}$, $P_{\text{нар}}$ — осмотическое давление соответственно по одну и другую сторону мембраны.

Обычно вода проникает в клетку до тех пор, пока не выравняется осмотическое давление между клеткой и средой. Перенос воды может также осуществляться путем фильтрации, происходящей главным образом при наличии градиента гидростатического давления. **Фильтрация** — это процесс проникновения жидкости через поры какой-либо перегородки под действием гидростатического давления. Скорость фильтрации находят из уравнения Пуазейля, описывающего течение жидкости по капилляру под давлением:

$$dV/dt = \pi r^4 (P_{\text{вн}} - P_{\text{нар}}) / 8 l \psi,$$

где dV — объем фильтруемой жидкости; r — радиус каждой поры; $P_{\text{вн}}$, $P_{\text{нар}}$ — давление соответственно на конце и в начале поры; l — длина поры; ψ — вязкость жидкости.

Поступление воды в клетку связано с набуханием последней и

растяжением ее стенки. Поэтому при исследовании осмоса учитывают модуль объемной упругости клетки (ϵ), определяемый по закону Гука:

$$dP = \epsilon dV / V,$$

где V — объем клетки. Величину ϵ находят с помощью микрокапиллярного зонда и датчика тургорного давления по сдвигу P при инъекции в клетку порции жидкости известного объема. Величину L_p находят по скорости изменения тургорного давления в гидростатических и осмотических опытах. Коэффициенты отражения для разных веществ определяют по отношению сдвига P тургорного давления к вызвавшему этот сдвиг изменению осмотического давления среды:

$$\sigma = (P - P_{\min}) / \pi.$$

Фильтрация и осмос играют большую роль в процессе обмена воды между кровью и тканью. Осмотическое давление крови человека равно 760 — 780 кПа.

Механизмы транспорта ионов и веществ в клетку

Несмотря на различия молекулярной структуры и физико-химических свойств веществ, поступающих в клетку, существуют только два основных пути их проникновения через клеточную мембрану:

- за счет растворения в липидах мембраны;
- через каналы клеточной мембраны, которые соединяют цитоплазму клетки с внешней средой.

Еще в 1895 г. Е. Овертон (Е. Overton) доказал зависимость проникающей способности веществ от их растворимости в липидах. Аналогичные данные были получены Р. Колландером (R. Collander), который установил, что растворимость вещества в оливковом масле пропорциональна проницаемости его в клетку. Важным фактором, влияющим на проницаемость веществ через мембрану, является размер их молекул. Так, вещества с одинаковым коэффициентом растворимости, но отличающиеся размерами и формой (стерический фактор) проникают в клетку с различной скоростью. Из двух одинаковых по размеру, но разных по растворимости в липидах веществ, например пропиленгликоля и мочевины, первый в 20 раз быстрее проникает в клетку, поскольку лучше растворяется в липидах.

В связи с проведенными исследованиями Е. Овертон сформулировал следующие эмпирические законы:

- проницаемость клеточных мембран для органических молекул уменьшается по мере повышения в последних количества функциональных групп (гидроксильных, карбоксильных и аминных);
- проницаемость клеток для органических молекул возрастает по мере роста в последних числа метиловых, этиловых и фенильных групп.

Существуют, однако, вещества, поведение которых не подчиняется

указанным закономерностям. Так, вода, обладая растворимостью, аналогичной растворимости тиомочевина, проникает в клетку в 200 раз быстрее. Такими же свойствами обладают метанол и формамид. Эти факты Р. Колландер объяснил тем, что плазматическая мембрана пронизана порами, которые могут пропускать только мелкие молекулы. Таким образом, в настоящее время рассматривают два пути диффузии молекул (например, воды):

- гидрофильный, когда молекула воды проходит сквозь поры, сформированные интегральными белками мембраны;
- связанный с возникновением кинков — лабильных структур в углеводородной области мембраны.

Как уже упоминалось, функцию ионных каналов можно сравнить с функцией ферментов. Например, для переноса ионов К из водной среды в липидный матрикс мембраны необходима энергия, составляющая 250 кДж/моль. Однако энергетический барьер, который должен преодолеть ион К при транспорте через плазматическую мембрану, реально составляет только 20 кДж/моль. Это объясняется тем, что ионная проницаемость клеточных мембран обеспечивается ионными каналами, представляющими собой интегральные белки. Для большинства ионных каналов характерны явления избирательности, насыщения (при увеличении концентрации ионов) и блокирования. При функционировании конформационные изменения молекул, формирующих структуру и окружение канала, переводят их из закрытого состояния в открытое и наоборот. Активация канала обусловлена либо сдвигом величины мембранного потенциала, либо взаимодействием участка молекулы канала с определенными химическими веществами, либо специфическим фосфорилированием белков.

В первом случае каналом управляет электрическое поле мембраны. Структура, реагирующая на изменение напряженности поля, переносит электрический заряд (т. е. имеет заряженные группировки) и называется сенсором напряжения. Во втором случае управление осуществляют связанные с каналом рецепторы, взаимодействующие с определенным химическим веществом, что способствует открыванию канала. В третьем случае взаимодействие химического вещества с рецептором мембраны вызывает появление в клетке вторичного посредника — цАМФ или диацилглицерин, активирующего соответствующие протеинкиназы, которые фосфорилируют белки ионных каналов. При этом происходит переход каналов в открытое состояние (данный тип регуляции достаточно хорошо изучен для Са-каналов). Через различные каналы за 1 с может проходить от 10^6 до 10^9 ионов.

Одной из важных особенностей каналов клеточных мембран является их способность отличать ионы различного знака и химической природы (селективность). Выяснение природы селективности — основной ключ к пониманию молекулярных механизмов электрической активности клеток. Для объяснения селективной проницаемости ионов было выдвинуто несколько гипотез. Одна из них, принадлежа-

шая Л. Михаэлису (L. Michaelis), состоит в том, что каналы, заполненные водой, обладают суммарным отрицательным зарядом, который препятствует переносу в них анионов. С другой стороны, в 1941 г. Е. Дж. Конвей (E. J. Conway) и П. Дж. Бойль (P. J. Boyle) на основании данных о проницаемости скелетных мышечных волокон у амфибий для ионов K и Cl пришли к выводу, что поры не заряжены и проницаемость мембраны зависит только от диаметра ионов в гидратированном состоянии. В настоящее время их теория «сита» для гидратированных ионов представляет в основном исторический интерес, так как не согласуется со многими экспериментальными данными. Так, например, известно, что радиусы ионов K, Rb и Cs в гидратированном виде одинаковы, а проницаемость для иона K значительно больше, чем для ионов Rb и Cs.

В связи с проблемой селективности каналов определенный интерес представляет гипотеза Л. Дж. Муллинза (L. J. Mullins) о механизмах ионной проницаемости биологических мембран, учитывающая размер пор мембраны. В данном случае считается, что ион лишь тогда способен пройти через пору, когда его собственный радиус, суммированный с размером одного слоя гидратированной ионной воды, будет соответствовать радиусу поры. Стенки поры, взаимодействуя с проникающим ионом, как бы дополняют гидратную оболочку, что способствует переходу иона из водного раствора в мембрану. В отличие от предыдущих эта точка зрения предполагает наличие пор различной величины.

Итак, различия между каналами и переносчиками заключаются в том, что:

- у названных транспортных систем разная пропускная способность: канал пропускает около 10^7 ионов в 1 с, а переносчик — около 10^4 ионов в 1 с;
- проводимость, обусловленная переносчиками, сильнее зависит от вязкости липидного бислоя и температуры, чем проводимость каналов;
- разная проводимость в зависимости от концентрации транспортируемого иона.

В настоящее время для объяснения высокой проницаемости мембран часто используют положения электростатической теории, электродиффузионной теории и теории абсолютных скоростей реакции. Постулируется возможность описания переноса иона через мембрану с помощью определения величины так называемого активационного барьера (т. е. энергии, необходимой для обеспечения транспорта иона).

Согласно электростатической теории энергия переноса иона определяется по формуле

$$E = Nz^2e^2 / 8\pi\epsilon_0 r (1/\epsilon_m - 1/\epsilon_b),$$

где $N = 6 \cdot 10^{23}$ моль⁻¹; z — заряд иона; $e = 1,6 \cdot 10^{-19}$ Кл; $\epsilon_0 = 8,8 \times 10^{-12}$ Ф/м; ϵ_m , ϵ_b — диэлектрическая проницаемость соответственно мембраны и воды.

Так как в воде энергия иона понижена (электрическое поле иона экранируется диполями воды), а в мембране высокая, то скорость переноса иона зависит от ее величины (энергетический барьер). Ионифоры понижают величину барьера за счет образования комплекса с ионом и увеличения эффективного радиуса этого комплекса (валиномицин — K^+) при сохранении заряда иона, а также за счет образования пор с относительно высокой величиной диэлектрической постоянной (большей, чем у мембраны).

Г. Эйзенман (G. Eisenman) применил данную теорию для описания транспорта иона в канале, учитывая как энергетику самого переносчика, так и наличие заряженных анионных группировок в поре канала. Если энергия заряженной группировки незначительна, то ее хватает лишь для дегидратации проникающих ионов с большим ионным радиусом (например, цезия). В случае, когда анионная группировка создает сильное электрическое поле, дегидратация и образование комплекса наблюдаются для ионов, имеющих малый кристаллический радиус (Li^+ , Na^+ , K^+).

Теория электродиффузии постулирует положение о том, что транспорт иона через мембрану определяется его электрохимическим потенциалом:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln C + zFE,$$

где μ — электрохимический потенциал; μ_0 — стандартный электрохимический потенциал; T — температура; E — потенциал.

Пассивный транспорт в данном случае осуществляется в направлении снижения электрохимического потенциала. При равновесии, когда $\mu_1 = \mu_2$, выполняется соотношение

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_{\text{вн}}}{C_{\text{нар}}}.$$

В мембранах с толщиной менее 10 нм потенциал меняется линейно в зависимости от расстояния до нее. В случае, когда $dE/dx = \text{const}$, поток через мембрану (J) описывается уравнением

$$J = zFEP(C_{\text{нар}} - C_{\text{вн}} \exp(zFE/RT)) / RT(1 - \exp(zFE/RT)),$$

где P — коэффициент проницаемости.

Тогда диффузия через мембрану ионов K , Na , Cl ($J = 0$) приводит к созданию мембранного потенциала, величина которого определяется градиентами и проницаемостью мембраны для этих ионов.

Для определения направленности и возможности осуществления пассивного транспорта есть несколько критериев, один из них — соотношение Уссинга, или критерий пассивного транспорта: согласно электродиффузионной теории, если ионы движутся пассивно и независимо, то односторонние потоки в мембране связаны уравнением

$$J_i/J_0 = C_0/C_i \exp(zE).$$

Следует отметить, что проблема избирательной проницаемости для ионов остается пока одной из малоисследованных в мембранологии.

3.1.2.2. Активный транспорт

Под **активным транспортом** в биофизике клетки понимают перенос неэлектролитов и ионов против химического или электрохимического градиента. Активный транспорт непосредственно связан с энергетическими затратами и, как и пассивный, подчиняется кинетике насыщения. Отличие активного транспорта от пассивного заключается именно в наличии стадии, сопряженной с трансформацией энергии. В настоящее время принято говорить о первично-активном и вторично-активном транспорте.

Первично-активным называется транспорт, осуществляемый транспортными АТФ-азами за счет энергии гидролиза АТФ. Вторично-активный транспорт — это процесс, источником энергии для которого служит градиент ионов, возникший, например, в ходе первично-активного транспорта. Типичный пример первично-активного транспорта — активный транспорт ионов с помощью АТФ-аз. Функция насосов заключается в переносе ионов через мембрану против электрохимического градиента за счет энергии гидролиза АТФ. В соответствии с этим **АТФ-азы** — ионные насосы, обладающие аденозинтрифосфатфосфогидролазной активностью. Все транспортные АТФ-азы прокариотических и эукариотических клеток можно разделить на три типа: Р, V и F.

Общим свойством АТФ-аз *P-типа* является способность образовывать ковалентный фосфорилированный интермедиат (P_n) в активном центре. К ним относятся Na, K-, Ca- и H-АТФ-азы плазматических мембран. Ранее АТФ-азы Р-типа называли ферментами E_1/E_2 -типа. Однако номенклатуру изменили, потому что существуют и другие ферменты, не имеющие отношения к транспорту ионов (например, миозинная АТФ-аза), которые также могут находиться в конформациях E_1 и E_2 .

Ионотранспортирующие АТФ-азы *V-типа* относятся к мембранно-связанным структурам. Они обнаруживаются в вакуолях дрожжей и тонопластах растений, лизосомах, секреторных гранулах и т. д. АТФ-азы V-типа широко распространены, но изучены недостаточно. Им присущи 3 основных свойства: они являются переносчиками протона; в ходе каталитического цикла образуют ковалентный фосфорилированный интермедиат; представляют собой высокомолекулярные мультисубъединичные комплексы.

АТФ-азы *F-типа*, выделенные из мембран бактерий, хлоропластов и митохондрий, содержат как водорастворимую часть F_1 , состоящую из

нескольких субъединиц и обладающих каталитической активностью (способны катализировать и синтез, и гидролиз АТФ), так и гидрофобную часть F_0 , участвующую в транслокации H^+ .

Кинетику потока ионов при активном транспорте (J) можно описать уравнением

$$J = J_{\max} ([C]_1/K_1 + [C]_1 - [C]_2/K_2 + [C]_2,$$

где $J_{\max} = C_0 P/2$; P — коэффициент проницаемости комплекса ионопереносчика; $[C]$ — концентрация ионов по разные стороны мембраны; K — константа диссоциации комплекса.

При $J = 0$ (максимальная работа равна нулю) получаем соотношение

$$[C]_1/[C]_2 = K_1/K_2,$$

из которого следует, что предельная концентрация иона, которую может создать насос, определяется отношением констант диссоциации комплекса данного иона с переносчиком, а активный транспорт иона осуществляется в направлении более низкой константы его связывания ферментом.

Na, K-АТФ-аза

Na, K-АТФ-аза — одна из наиболее важных и широко распространенных транспортных систем в клетках животных и растений, обеспечивающая перенос через клеточную мембрану ионов Na и K. Активный их транспорт имеет огромное физиологическое значение: в состоянии покоя на него затрачивается более 30 % энергии клетки; транспорт ионов Na и K необходим для поддержания электрической возбудимости нервных и мышечных клеток, а также регуляции Na/Ca-обмена.

Фермент, расщепляющий АТФ, впервые открыл Дж. Скоу (J. Skou) в 1957 г. в мембранной фракции нервов краба. В дальнейшем этот фермент, называемый также транспортной или плазматической Na, K-АТФ-азой, был обнаружен во всех животных и растительных тканях. Na, K-АТФ-аза — это липопротеиновый комплекс, функции которого связаны с конформационными перестройками белковых молекул. Сведения об относительной молекулярной массе Na, K-АТФ-азы весьма разноречивы (от 100 000 до 500 000), что связано с разными методами выделения и степенью очистки фермента. В среднем общая относительная молекулярная масса фермента составляет 270 000. Таким образом, Na, K-АТФ-аза — многокомпонентная система, тетрамер, составленный из двух α - и двух β -субъединиц. Субъединица α больше субъединицы β . Компонента α осуществляет гидролиз АТФ и связывание стероидов (их относительная молекулярная масса 95 000 — 100 000), а β -субъединица, относительная молекулярная масса которой составляет 40 000, содержит углеводные группы. Обе субъединицы

связаны поперечными мостиками. Предполагается, что α -субъединицы контактируют между собой, а β -субъединицы пространственно разделены. Каждая α -субъединица пронизывает мембрану насквозь. Углеводные цепи β -субъединиц расположены на наружной стороне мембраны (рис. 3.10, 3.11).

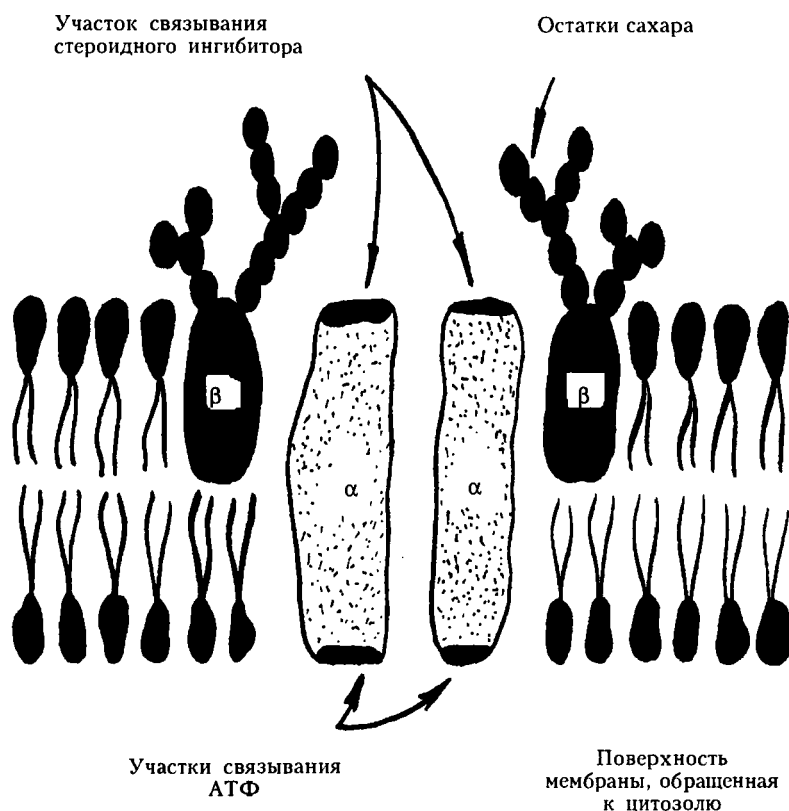


Рис. 3.10. Схематическое изображение субъединичной структуры Na, K-насоса (α - и β -субъединицы)

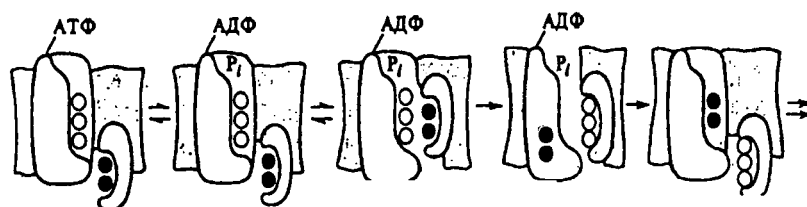
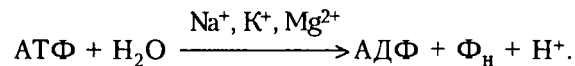


Рис. 3.11. Схема работы Na, K-АТФ-азы

Na, K-АТФ-аза «откачивает» ионы натрия из клетки и «закачивает» ионы калия в нее за счет энергии гидролиза молекул АТФ. Фермент проявляет максимальную активность при наличии в среде ионов Na, K и Mg. Процесс описывается следующей суммарной реакцией:



Дж. Скоу предположил, что Na, K-АТФ-аза является интегральным белком, а расщепление АТФ обеспечивает энергией активный транспорт ионов Na и K. Гипотеза была подтверждена следующими экспериментальными данными: уровень ферментативной активности коррелировал с числом транспортируемых ионов; как Na, K-АТФ-аза, так и Na-насос прочно связаны и одинаково ориентированы в плазматической мембране; изменение соотношения ионов Na и K в клетке оказывает одинаковое действие на АТФ-азную активность и скорость транспорта этих ионов; сердечные гликозиды (дигитоксин и оубаин) являются специфическими ингибиторами Na, K-АТФ-азы и Na-насоса. В 1960 г. П. Колдвеллом (P. Caldwell) было доказано, что источником энергии для функционирования натриевого насоса служит гидролиз АТФ. А. Ходжкин (A. Hodgkin) в экспериментах на гигантском аксоне кальмара подтвердил наличие АТФ-зависимого выведения ионов. В гигантский аксон вводили радиоактивный изотоп Na и исследовали динамику выхода ионов. После блокирования синтеза АТФ откачка натрия прекращалась, но полностью возобновлялась после введения в аксон АТФ (рис. 3.12). Такого же эффекта можно добиться при инъекции в аксон беспозвоночных аргининфосфата, а в экспериментах с нервами позвоночных — креатинфосфата (рис. 3.13). В опытах на телях эритроцитов было

также доказано, что для активации АТФ-азы и транспорта ионов Na и K через мембрану требуется определенное соотношение концентрации ионов Na и K внутри клетки и только наличие в ней АТФ служит эффективным субстратом для активации Na, K-АТФ-азы.

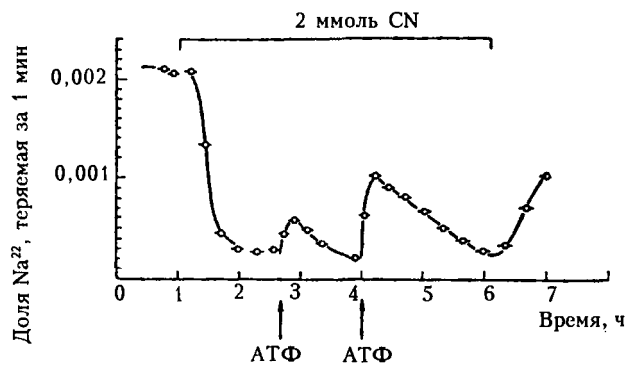


Рис. 3.12. Влияние введения АТФ на выход натрия из аксона, отравленного цианидом. После первого введения концентрация АТФ в аксоне повысилась до 1,2 ммоль, а после второго — до 6,2 ммоль

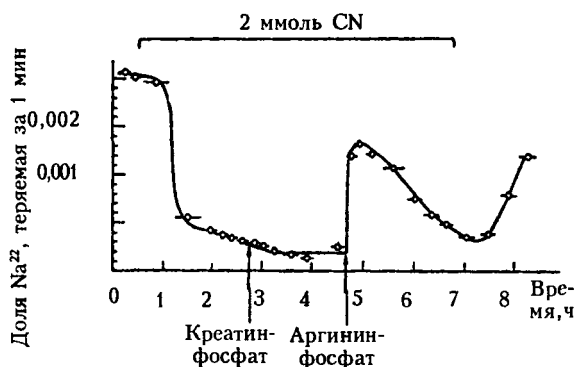
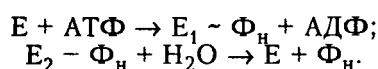


Рис. 3.13. Влияние последовательного введения креатинфосфата и аргининфосфата на выход натрия из аксона, отравленного цианидом. Средняя концентрация креатинфосфата сразу же после введения была равна 15,3 ммоль, а средняя концентрация аргининфосфата — 15,8 ммоль

Оуабаин и другие стероидные ингибиторы подавляют активность АТФ-азы при экстраклеточном воздействии на эритроциты. Каким же образом АТФ обеспечивает активный транспорт ионов Na и K? В присутствии ионов Na и Mg АТФ фосфорилирует Na, K-АТФ-азу. Участком фосфорилирования служит остаток аспартата фермента. В присутствии иона K происходит гидролиз фосфорилированного промежуточного продукта E — Φ_n . Для процесса дефосфорилирования не требуется ни ион Na, ни ион Mg:



В процессе функционирования насос принимает по крайней мере две разные конформации — E_1 и E_2 . Всего же в транспорте ионов Na, K и сопряженном с ним гидролизе АТФ участвуют не менее четырех конформационных форм фермента: E_1 ; $E_1 \sim \Phi_n$; $E_2 - \Phi_n$; E_2 (рис. 3.14).

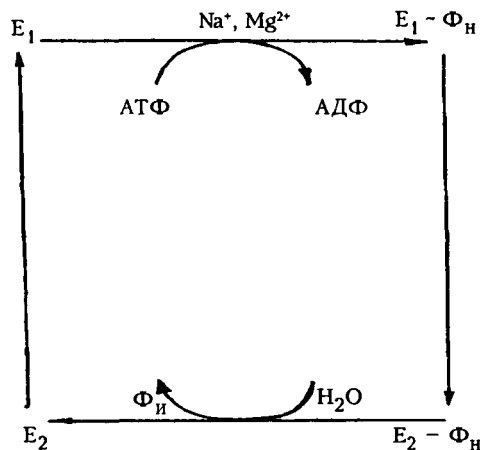


Рис. 3.14. Схема работы Na, K-АТФ-азы во время активного транспорта

Несмотря на большое количество данных о структуре Na, K-насоса, механизм его действия изучен недостаточно. Особый интерес вызывает модель, в соответствии с которой к структуре белка предъявляются следующие требования:

— в молекуле белка должна быть полость такой величины, чтобы в ней помещались небольшие молекулы или ионы;

— белок должен существовать в двух конформациях, причем в одной полость должна быть открыта со стороны, обращенной внутрь клетки, а в другой — со стороны, обращенной наружу. Эти конформации должны иметь разное сродство к транспортируемым компонентам.

С помощью схемы, представленной на рис. 3.15, можно проследить всю последовательность конформационных превращений фермента, переноса ионов и обеспечение этих процессов за счет энергии АТФ. Справедливость такой модели подтверждается двумя экспериментами, показавшими, что ионы натрия «запускают» фосфорилирование, а ионы калия — дефосфорилирование. Оба эти процесса стабилизируют первую и вторую конформационные формы фермента. Перемещение нескольких атомов молекулы белка на 0,2 нм может изменить ориентацию полости и сродство к ионам Na и K. Отметим, что при гидролизе одной молекулы АТФ происходит перенос трех ионов натрия и двух ионов калия. Следовательно, работа насоса генерирует электрический ток через мембрану. Максимальное число оборотов АТФ-азы составляет 100 с^{-1} .

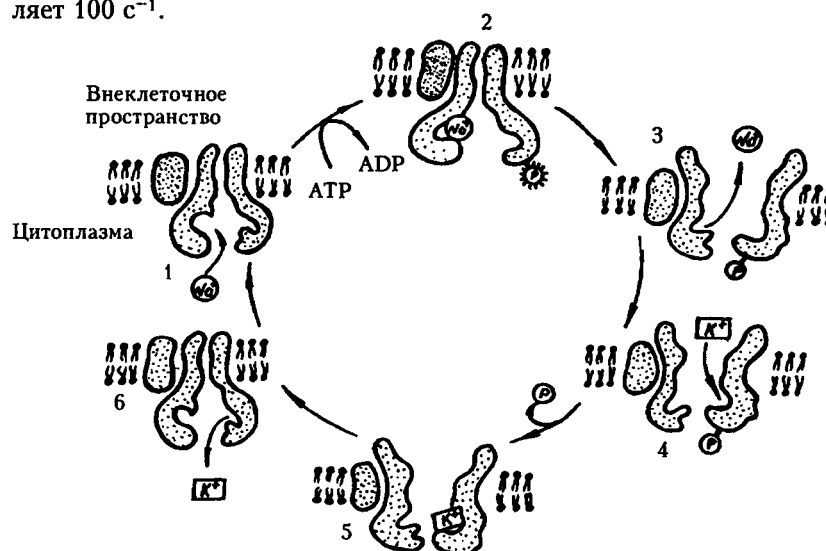


Рис. 3.15. Модель функционирования Na, K-АТФ-азы.

Связывание Na (1) и последующее фосфорилирование (2) АТФ-азы со стороны цитоплазмы индуцируют в белке конформационные изменения, в результате которых Na^+ переносится через мембрану и высвобождается в межклеточное пространство (3). Затем связывание K^+ на внешней поверхности (4) и последующее дефосфорилирование (5) возвращают белок в первоначальную конформацию; при этом K^+ проходит через мембрану и высвобождается в цитоплазму (6). Эти изменения аналогичны переходам типа «пинг» — «понг».

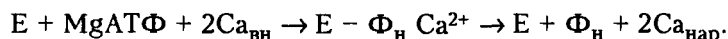
Особенно важно то, что действие Na, K-АТФ-азы обратимо, и в модельной системе фермент может синтезировать АТФ из АДФ и P_H .

Гипотетически такой синтез может происходить лишь в условиях резкого увеличения ионных градиентов, что возможно лишь при инкубации эритроцитов в среде с высокой концентрацией натрия и низкой концентрацией калия.

Ca-АТФ-аза

Существуют два типа Са-АТФ-аз: одна из этих ферментативных систем обеспечивает выброс Ca^{2+} из клетки в межклеточную среду (Са-насос плазматических мембран), другая — аккумуляцию ионов Са из цитоплазмы во внутриклеточное депо (Са-насос внутриклеточных мембран). Примером первого типа может служить Са-насос эритроцитов, второго — Са-насос саркоплазматического ретикулума. Они оба способны создавать более чем 1 000-кратный градиент Ca^{2+} на своих мембранах, регулируя в клетке уровень иона Са, который обуславливает многие стороны жизнедеятельности клетки. Са-АТФ-аза активируется низкими концентрациями Ca^{2+} с $K_a = 10^{-7}$ ммоль/л, а высокий уровень Ca^{2+} (1 — 5 ммоль/л) тормозит ее активность.

Очищенный фермент не теряет своей активности в среде с фосфолипидами или детергентами, обладающими сходным гидрофильно-липофильным коэффициентом и характеризующими распределение вещества между полярной и неполярной фазами. Структурной единицей фермента является мономер с относительной молекулярной массой 100 000 — 150 000, способный объединяться в олигомерные комплексы в мембране. Каждый мономер содержит два Ca^{2+} -связывающих центра и один АТФ-связывающий, способный к обратимому фосфорилированию от АТФ в среде с Ca^{2+} и Mg^{2+} и от Φ_n — в среде с Mg^{2+} . Обнаружены два вида ферментов, превращение которых сопровождается переносом Ca^{2+} с одной стороны мембраны на противоположную, а в обратную сторону осуществляется перенос двух протонов. Ниже представлена суммарная схема процесса:



Из схемы видно, что стехиометрия транспорта Ca^{2+} /АТФ равна 2, причем Са-насос может использовать энергию многих других субстратов для транспорта Ca^{2+} , хотя и с разной молекулярной активностью. Оуабаин и олигомицин — специфические ингибиторы Na, К-АТФ-азы, и АТФ-азы митохондрий не блокируют Са-АТФ-азу. Она ингибируется рутениевым красным, ванадатом и рядом SH-реагентов (мерсапилом, N-этилмалеимидом и др.).

К, Н-АТФ-аза

К, Н-АТФ-аза слизистой оболочки желудка и кишечника нечувствительна к оуабаину, ионам Na и бикарбонату, но ингибируется фото-

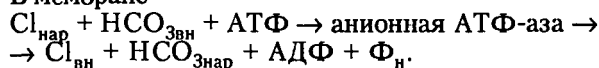
ридом, дициклогексилкарбодиамидом, N-этилмалеимидом, Zn^{2+} и Ba^{2+} , а оптимальный pH равен 7,5. В процессе гидролитического цикла фермент образует фосфорилированный интермедиат, который быстро распадается под влиянием иона K и более стабилен при его отсутствии. В замкнутых мембранных препаратах наблюдается активация K, H-АТФ-азы валиномицином, что свидетельствует о наличии «замаскированных» (недоступных для ионов K) центров. Количество замкнутых везикул, ориентированных K-центрами внутрь, может составлять от 30 до 100 %. Фермент K, H-АТФ-аза специфичен по отношению к субстрату. Он гидролизует АТФ с высокой скоростью: очищенные препараты обладают активностью до 110 мкмоль АТФ на 1 мг белка в 1 ч (при 37 °C); гуанозинтрифосфат и цитидинтрифосфат гидролизуются со скоростью, в 7 — 9 раз меньшей, а инозинтрифосфат не гидролизуются вообще. K, H-АТФ-аза — олигомерный белок. В очищенных препаратах фермента выделяются два пептида с относительной молекулярной массой 84 000 — 100 000, а также минорные белковые компоненты. Активность фермента зависит от липидного окружения и физико-химического состояния бислоя. Стехиометрия транспорта составляет $4H^+/1ATP$. С. И. Бонтинг (S. I. Bonting) предполагал участие ферментной системы в регуляции уровня повышенной кислотности желудочного сока. Вероятно, аналогичные K, H-АТФ-азы функционируют в мембранах бактерий.

В 1965 г. была обнаружена другая аниончувствительная АТФ-аза в микросомах слизистой желудка лягушек. Гидролиз АТФ этой системой активизировался двумя анионами (бикарбонатом и хлоридом) и сопровождался их транспортом через мембрану. Тиоцианат, ингибирующий транспорт анионов, подавлял и АТФ-азную активность. Предполагается, что обнаруженная активность отражает процесс, который протекает в клетках, секретирующих соляную кислоту.

В цитоплазме



В мембране



Таким образом, в секретирующих клетках может накапливаться соляная кислота, а вне их — бикарбонат-ион, регулирующий pH среды.

Аниончувствительные АТФ-азы обнаружены в выделительной ткани, поджелудочной железе, клетках мозга и асцитных клетках. Они найдены как в митохондриальной фракции, так и во фракции ПМ. Анионные АТФ-азы этих двух фракций различались по чувствительности к олигомицину, кверцетину, ауровертину D.

В табл. 3.1 приводятся важнейшие свойства мембранных АТФ-аз, транспортирующих различные катионы. В транспорте органических веществ участвуют и другие механизмы. Создаваемый активным транспортом электрохимический градиент ионов Na обеспечивает энергией транспорт аминокислот и сахаров в животных клетках. Многие актив-

ные транспортные процессы непосредственно не зависят от гидролиза АТФ, но сопряжены с потоком ионов по электрохимическому градиенту, т. е. являются вторично-активным транспортом. Во многих животных клетках ионы Na и глюкоза связываются со специфическим транспортным белком и одновременно проникают в клетку.

Таблица 3.1

Транспортные АТФ-азы

Фермент	Тип клеток	Локализация	Функция
Na, K-АТФ-аза	Большинство животных и растительных клеток	Плазматическая мембрана	Поддерживает высокую внутриклеточную концентрацию K
H-АТФ-аза	Обкладочные клетки слизистой желудка	Плазматическая мембрана	Секретирует H ⁺ в желудочный сок
H-АТФ-аза	Животные и растительные клетки, бактерии	Внутренняя мембрана митохондрий, внутренняя мембрана хлоропластов, плазматическая мембрана	Участвует в окислительном фотосинтетическом фосфорилировании АДФ до АТФ
Ca-АТФ-аза	Животные клетки	Плазматическая мембрана	«Выкачивает» Ca ²⁺ из клеток, способствуя их накоплению в цитозоле
		Саркоплазматический ретикулум	Способствует накоплению Ca ²⁺ в цистернах саркоплазматического ретикулума, вызывая расслабление мышц

Мембранный липидный бислой непроницаем для значительного количества полярных молекул, для транспортировки которых в плазматических мембранах имеется большое число специфических транспортных белков, формирующих транспортные пути через липидный бислой. Они называются белками-переносчиками. Последние облегчают диффузию растворенного вещества через бислой. Другие белки испытывают ряд конформационных изменений, вызываемых гидролизом АТФ или связыванием ионов, в результате чего способны работать как насосы, транспортируя ионы против электрохимического градиента.

Хемиосмотическая теория Митчелла

На возможность создавать высокие концентрации протонов в клетках при протекании реакции окисления впервые обратил внимание в 50-х гг. XIX в. Р. Дэвис (R. Davies) при обсуждении вопроса о механизме секреции кислоты клетками желудка. Допустим, реакции, о

которых шла речь, протекают так, что электроны удаляются из раствора, тогда окисление любой органической молекулы приведет к появлению в этом растворе протонов (рН раствора понизится). П. Митчелл (P. Mitchell) в 1961 г. предложил идею хемиосмотического энергетического сопряжения в дыхательной цепи. Для понимания принципа хемиосмотического сопряжения необходимо знать следующие положения:

- внутренняя мембрана митохондрии, где происходят окислительно-восстановительные реакции дыхания, непроницаема для протонов (точнее, протон диффундирует через двойной фосфолипидный слой очень медленно по сравнению со скоростью потребления кислорода). В то же время мембрана хорошо проницаема для воды и благодаря электролитической диссоциации запас протонов в водных растворах неограничен;

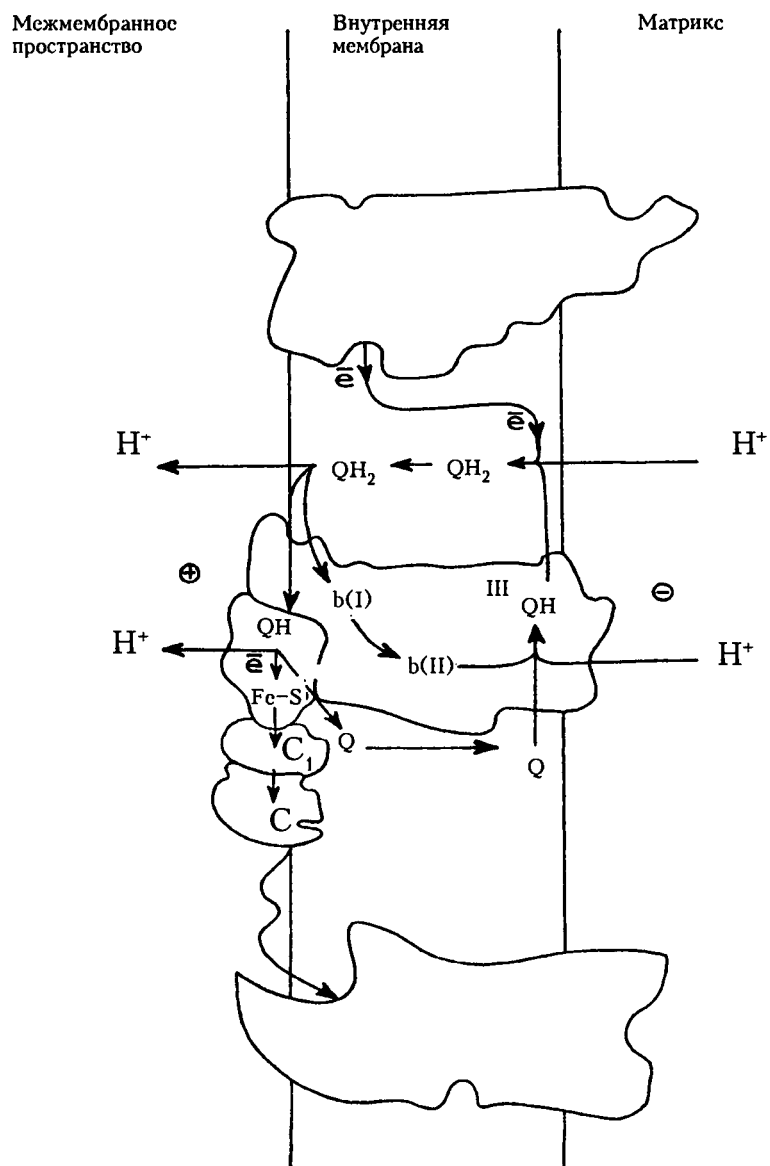
- внутренняя мембрана митохондрии асимметрична: одни компоненты дыхательной цепи контактируют с матриксом (например, активный центр комплекса), другие расположены внутри мембраны (например, убихинон), третьи контактируют с межмембранным пространством (например, цитохром c);

- разрушение мембраны не препятствует окислению НАД·Н кислородом и даже ускоряет дыхание. Энергетическое сопряжение (синтез АТФ) при этом полностью прекращается: происходит разобщение процессов переноса электронов и запаса энергии. Для разобщения необходимо полностью разрушать мембрану, достаточно, сохраняя ее структуру, добавить вещества, резко повышающие проницаемость мембраны для протонов.

Для того чтобы понять принцип хемиосмотического сопряжения, предложенного Митчеллом, рассмотрим в качестве примера химический генератор, применяющийся в технике. Представим себе сосуд, разделенный перегородкой, проницаемой для воды и непроницаемой для каких-либо ионов. В перегородку вмонтирован проводник электричества (металл), торцевые поверхности которого, обращенные к раствору, покрыты каким-нибудь катализатором. При подаче в один отсек H_2 , а в другой O_2 на поверхности перегородки будет происходить следующий процесс: в одном отсеке $H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$. Протоны останутся в растворе, так как перегородка непроницаема для ионов. Электроны по проводнику перейдут на противоположную поверхность, и тогда $O + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O + OH^-$.

Суммарный результат процесса контролируемого окисления водорода кислородом заключается в том, что перегородка окажется заряженной и возникнет градиент концентрации протона. Именно за счет тока протонов работает молекулярный механизм, синтезирующий АТФ.

Каждый из трех комплексов, составляющих дыхательную цепь, работает так, что перенос электронов по его простетическим группам сопровождается переносом протонов через сопрягающую мембрану (рис. 3.16).



Р и с. 3.16. Механизм трансформации энергии окисления убинона цитохромом c в энергию $\Delta \mu_{H^+}$ при работе комплекса III дыхательной цепи. Восстановленный убинон (QH_2) реагирует с железом гема b_1 и восстанавливает его, освобождая протон в водную фазу и превращаясь в полувосстановленную форму. Электрон от гема $b(I)$ переносится через мембрану к железу гема $b(II)$

3.2. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ

Биоэлектрические явления — это клеточные процессы, сопровождающиеся перераспределением и транспортом электрических зарядов, обусловленные присутствием в клетках фиксированных (заряженные группы белков и фосфолипидов) и подвижных (свободные ионы и электроны) электрических зарядов.

В настоящее время принято классифицировать биоэлектрические явления на следующие типы:

- биоэлектрический потенциал — электрический потенциал плазматической мембраны клетки (мембранный потенциал), источником которого являются электрохимические градиенты различных ионов. Условно различают биоэлектрический потенциал покоя — стационарная разность электрического потенциала между цитоплазмой и внеклеточной жидкостью в состоянии функционального покоя клетки и потенциал действия — быстрые изменения мембранного потенциала при функционировании (возбуждение нервных, мышечных и некоторых железистых клеток, а также клеток водорослей и проводящих пучков высших растений);

- окислительно-восстановительный потенциал (редокс-потенциал) — разность потенциалов, возникающая в процессе окислительно-восстановительной реакции переноса электронов от донора к акцептору;

- электрокинетический потенциал (электрокинетические явления) — разность потенциалов, возникающая в системе при механическом движении фаз. В данном типе различают:

- а) электрофорез — движение дисперсной фазы по отношению к дисперсионной среде в электрическом поле (например, дрожжевых клеток или форменных элементов крови в жидкой среде при помещении их в постоянное электрическое поле);

- б) электроосмос — движение жидкости через пористую перегородку под влиянием внешнего электрического поля (например, аномальный осмос в почках);

- в) потенциал течения — потенциал, возникающий между жидкой фазой и стенками сосуда при движении жидкости (ток крови по артериям и венам);

- г) потенциал оседания (седиментации) — потенциал, который возникает в гетерогенной среде под влиянием силы тяжести между верхними и нижними слоями системы.

3.2.1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ БИОПОТЕНЦИАЛОВ

3.2.1.1. Физико-химические процессы формирования мембранного потенциала

Формирование мембранного потенциала обусловлено совокупностью электрических процессов на границе раздела фаз: трансмембранным потенциалом и потенциалом мембраны, а также явлениями, определяющими формирование двойного электрического слоя вокруг мембраны и поверхностного заряда.

Теория двойного электрического слоя была разработана в исследованиях Г. Гуи (H. Guй) и Р. А. Чапмена (R. A. Chapman) в 1910 году. Она постулирует, что распределение ионов в области заряженной поверхности мембраны определяет:

- электростатическое притяжение (связывание);
- тепловое движение ионов (отталкивание).

В случае теплового движения ионов их концентрация вблизи поверхности мембраны соответствует закону Больцмана:

$$C_x = C_{\text{нар}} \exp(-zFE/RT),$$

где R — газовая постоянная; T — абсолютная температура.

Профиль потенциала в области двойного слоя рассчитывается по уравнению Пуассона — Больцмана:

$$d^2 E/dx^2 = -F/\epsilon \epsilon_{\text{нар}} z C_{\text{нар}} \exp(-zFE/RT).$$

Поверхностный заряд мембраны не может быть измерен, и, как правило, регистрируют параметр, близкий к нему, — дзета-потенциал, который возникает при движении слоя гидратированных ионов и пропорционален поверхностному заряду мембраны.

Трансмембранный потенциал клетки определяется из уравнения Нернста:

$$E = RT/F \ln C_{\text{вн}}/C_{\text{нар}}.$$

Межфазовый скачок потенциала возникает только в случае, когда коэффициенты распределения катионов и анионов различны. Величина данного потенциала определяется соотношением

$$E = RT/F \ln A_{\text{вн}}/A_{\text{нар}},$$

где $A_{\text{вн}}$, $A_{\text{нар}}$ — коэффициенты распределения иона соответственно между мембраной и окружающей средой.

Понятие «биоэлектрические потенциалы» довольно общее и констатирует только различия величины потенциала между экстраклеточной и внутриклеточной средой. Однако в клетке существует совокупность различных биоэлектрических потенциалов, не только между ее внутренним содержимым и окружающей средой, но и между возбуж-

денным и невозбужденным участками одной и той же клетки или органа. Возникновение разности потенциалов обусловлено неравномерным распределением ионов между клеткой и окружающей средой.

Для объяснения механизма неравномерного распределения ионов по обе стороны мембраны Ф. Доннан (F. Donnan) предложил модель, в которой два раствора разделены мембраной, проницаемой для воды и электролитов, но непроницаемой для крупных молекул (рис. 3.17). В наружный отсек «а» помещают раствор электролита хлористого калия, во внутренний отсек «б» — протениата калия. В отсеке «б» хлор отсутствует и по градиенту концентрации проникает в него. Исходно растворы были электронейтральными. В отсеке «б» электронейтральность поддерживается тем, что движение ионов хлора сопровождается движением ионов калия. К моменту равновесия в отсек «б» проникает x ионов калия и x ионов хлора, в результате содержание ионов калия в нем составляет $C + x$, а ионов хлора — x ; в отсеке «а» эти показатели равны $C - x$. Ф. Доннан показал, что при равновесии произведения концентрации ионов, способных к диффузии, по обе стороны мембраны равны:

$$[K^+]_b [Cl^-]_b = [K^+]_a [Cl^-]_a,$$

Состояние системы, при котором выполняется это условие, называется доннановским равновесием.

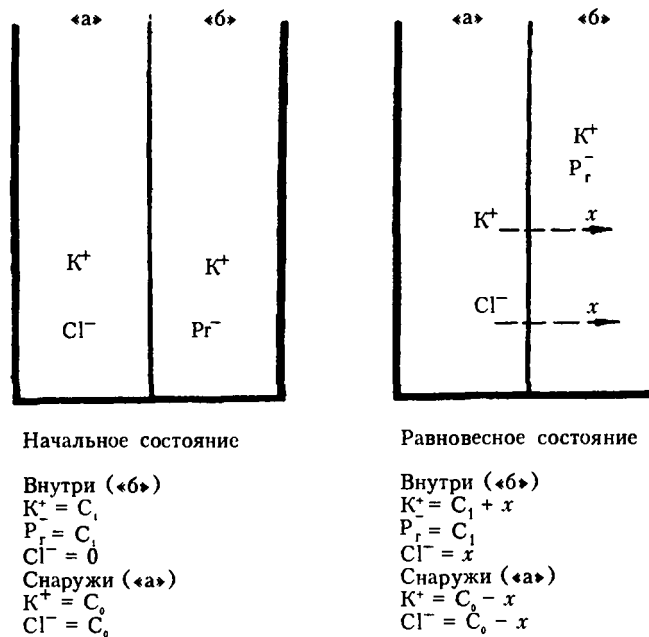


Рис. 3.17. Доннановское равновесие. Мембрана, разделяющая растворы, непроницаема для ионов белка (Pr^-), но пропускает остальные ионы

После простых преобразований определим величину x как равновесную концентрацию ионов, прошедших через мембрану и способных к диффузии. Разумеется, для этого необходимо знать начальный уровень ионов по обе стороны мембраны:

$$x = C_{\text{нар}}^2 / (C_{\text{вн}} + 2C_{\text{нар}}).$$

Напомним, что равновесие Доннана выведено при условии электронеutrальности обоих растворов. Однако если с одной стороны мембраны раствор электролита более концентрирован, чем с другой, то возникает поток воды и создается избыточное гидростатическое или осмотическое давление. В растительной клетке осмотическое давление выше, чем в окружающей среде, но от разрыва ее предохраняет плотная клеточная стенка. Такой защитный механизм вполне пригоден для неподвижных растений, но не подходит для животных клеток. В процессе эволюции был выработан другой механизм: недостаток электролитов в наружной среде компенсируется присутствием соли — NaCl. Мембрана малопроницаема для ионов Na, поэтому Na^+ , содержащийся в окружающей клетку среде, является основным фактором, уравновешивающим осмотическое давление внутриклеточных анионов.

Диффузия ионов через мембрану создает разность электрических потенциалов. При диффузии молекулы вещества направляются по концентрационному градиенту — «вниз по склону». Можно вычислить скорость транспорта вещества (так называемый поток) или работу, необходимую для предотвращения его переноса. В данном случае рассматривается выход ионов K из клетки. Работа A_x будет равна:

$$A_x = 2,3 RT [\text{K}^+]_{\text{нар}} / [\text{K}^+]_{\text{вн}}.$$

Здесь обозначение A_x принято потому, что движение иона по концентрационному градиенту обусловлено химической силой. По мере развития диффузии ионов калия из клетки ионы хлора проникают в клетку также по концентрационному градиенту. Противоположные заряды притягиваются, что заставляет ионы калия стремиться в клетку вслед за ионами хлора. На преодоление этой электрической силы требуется работа A_z ,

$$A_z = FE,$$

где F — постоянная Фарадея (количество электрических зарядов в 1 моле вещества), Кл/моль; E — разность электрических потенциалов, возникающая вследствие разделения зарядов по обе стороны мембраны, В.

Когда в системе устанавливается равновесие, то суммарный поток вещества (в данном случае калия) становится равным нулю и сила «выталкивания» иона из клетки уравновешивается противоположно направленной электрической силой ($A_z = A_x$).

Диффузионный потенциал E часто определяют с помощью уравнения Нернста

$$E = 2,3 \frac{RT}{F} \lg \frac{[\text{K}^+]_{\text{нар}}}{[\text{K}^+]_{\text{вн}}}.$$

Американский нейробиолог Г. М. Шеперд (G. M. Shepherd) считал, что если читатель из всей биофизики клетки хочет запомнить только одно уравнение, то пусть это будет уравнение Нернста, необходимое для понимания совокупности электрических процессов в клетке.

В качестве примера определим E_K для аксона кальмара при комнатной температуре (18 °C). В этом случае $2,3 RT/F$ составляет 58 мВ, концентрация ионов калия в паружной и внутренней среде равна соответственно 40 и 400 ммоль. Тогда

$$E = 58 \lg 40/400 = -58 \text{ мВ},$$

где E — потенциал, при котором поток данного иона через мембрану прекращается (равновесный потенциал). Потенциал E часто называют мембранным, поскольку он формируется на мембране.

После физико-химического вступления перейдем к рассмотрению механизма формирования собственно биоэлектрических потенциалов — потенциала покоя и потенциала действия.

3.2.1.2. Потенциал покоя

Как отмечалось выше, в возникновении биоэлектрических потенциалов решающая роль принадлежит потенциалам, обусловленным несимметричным, неравномерным распределением ионов между клеткой и средой. Гипотезу механизма возникновения потенциалов в живой клетке впервые предложил Дж. Бернштейн (J. Bernstein) в 1912 г. Он рассматривал протоплазму как свободный раствор электролитов и считал, что мембрана в состоянии покоя проницаема лишь для ионов K и непроницаема для ионов Na. В этих условиях возникает разность электрических потенциалов.

В последующие годы предпринималось множество попыток проверить гипотезу Бернштейна, однако это оказалось возможным лишь после того, как были разработаны методы измерения регистрации внутриклеточных потенциалов, исследовано содержание и состояние ионов в протоплазме и прослежены с помощью меченых атомов и микроэлектродов потоки ионов через мембрану. Для мембранной теории генерации биопотенциалов исключительно важное значение имел факт, что большая часть ионов K в протоплазме находится в свободном состоянии, т. е. протоплазма в соответствии с предположением Бернштейна представляет собой свободный раствор этих ионов. А. Ходжкин (1965) и Р. Кейнс (R. Keynes, 1982), используя радиоактивный изотоп (^{42}K), доказали, что в гигантском аксоне кальмара не менее 90 % внутриклеточного калия свободно диффундирует и перемещается в протоплазме под действием электрических сил так же, как и во внешней среде. Так, например, в скелетных мышцах коэффициент активности ионов K, измеренный с помощью микроэлектродов, оказался близким к коэффициенту активности этих ионов в водном растворе. Концентрация ионов K внутри клетки в 10 — 20 раз выше, чем снаружи. Избыток положи-

тельных зарядов ионов К внутри клеток компенсируется в основном органическими анионами (аспарагиновой, уксусной, пировиноградной и другими органическими кислотами). Содержание неорганических анионов в клетках сравнительно небольшое, но их вклад значителен.

Итак, между внутренней и наружной поверхностями клеточной мембраны гигантского аксона кальмара существует разность электрических потенциалов — потенциал покоя, которую можно измерить с помощью микроэлектрода, введенного в клетку. Обычно микроэлектроды делают из тонких стеклянных трубочек (диаметром 0,5 — 2,0 мкм), заполненных концентрированным (2 — 4 моль) раствором KCl. Сопротивление такого электрода высоко и составляет 10^6 — 10^8 Ом (рис. 3.18).

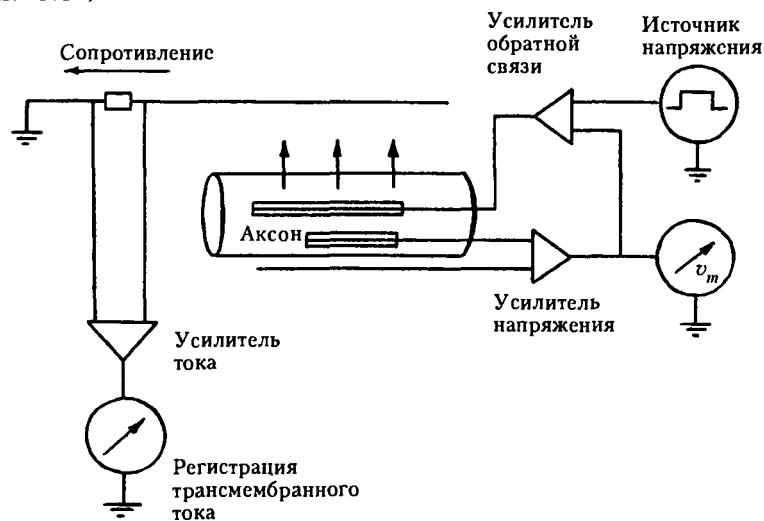
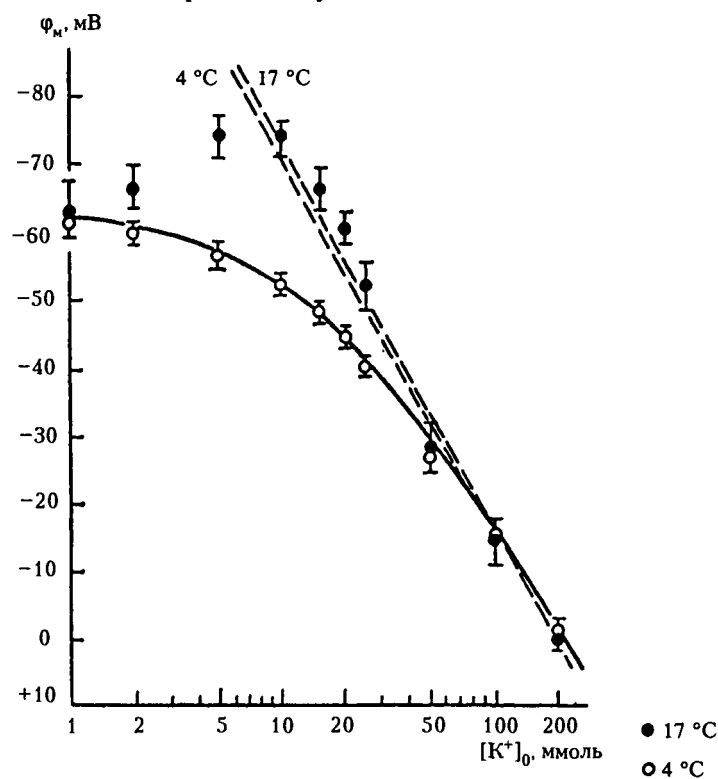


Рис. 3.18. Схема экспериментальной установки для исследования аксона кальмара методом фиксации потенциала. Потенциал мембраны устанавливается на определенном уровне с помощью источника напряжения. Для его регистрации используют усилитель, соединенный с усилителем обратной связи. С помощью последнего через мембрану пропускают ток, компенсирующий ионные токи при данном значении фиксированного потенциала; этот ток измеряют на сопротивлении

Механизмы, способствующие возникновению биопотенциалов, в основном были изучены на крупных клетках — гигантских аксонах кальмара, клетках водоросли *Chara*, гигантских нейронах пиявки *Hirudo* и др. Размеры этих клеток велики и составляют от 5 мкм до 1 мм, что важно для надежной регистрации ПП. На базе большого экспериментального материала было установлено, что цитоплазма клетки в состоянии покоя всегда имеет отрицательный потенциал по отношению к потенциалу межклеточной жидкости. ПП у различных клеток состав-

ляет от -50 до -125 мВ. В частности, потенциал покоя гигантского аксона кальмара меняется в пределах от -50 до -75 мВ, мышечных волокон сердца лягушки — от -61 до -82 мВ. Самый высокий потенциал покоя обнаружен у клеток водоросли *Nitella* — от -100 до -125 мВ.

Калиевый механизм возникновения потенциала покоя подтверждают данные, полученные при варьировании экстраклеточной концентрации калия (рис. 3.19). При изменении наружной концентрации калия наблюдается закономерное изменение величины потенциала покоя в широких пределах в соответствии с уравнением Нернста. В частности, когда концентрация калия в среде соответствовала его уровню в клетке, потенциал покоя равнялся нулю.



Р и с. 3.19. Зависимость потенциала покоя гигантского аксона кальмара от концентрации K^+ в среде. Величины K^+ представлены в логарифмическом масштабе. При 4°C потенциал покоя ($\circ$) подчиняется не уравнению Нернста ($- - -$), а уравнению Гольдмана (—). При 17°C , когда работает система активного транспорта Na^+ и K^+ , потенциал покоя ($\bullet$) ближе к рассчитанному по уравнению Нернста, чем при 4°C , когда Na , K -АТФ-аза неактивна

В состоянии покоя клеточная мембрана проницаема не только для ионов K, но и (в некоторой степени) для ионов Na и Cl. Таким образом, ПП клеток представляет собой результат суммы электродвижущих сил, генерируемых этими тремя ионами. Проникновение иона Na из окружающей среды внутрь клетки по концентрационному градиенту несколько уменьшает ПП. Диффузия через мембрану ионов Cl, содержание которых в межклеточной жидкости большинства тканей выше, чем в клетках, вызывает некоторое увеличение мембранного потенциала. Следовательно, для более точного вычисления ПП необходимо введение дополнительной поправки на диффузию ионов не только K, но и Na и Cl. Уравнение Нернста позволяет выразить мембранный потенциал только приблизительно, и хотя получаемые величины близки к реальным, для более точного расчета применяют так называемое обобщенное уравнение Гольдмана:

$$E_m = 58 \lg \frac{P_K [K^+]_{\text{нар}} + P_{Na} [Na^+]_{\text{нар}} + P_{Cl} [Cl^-]_{\text{вн}}}{P_K [K^+]_{\text{вн}} + P_{Na} [Na^+]_{\text{вн}} + P_{Cl} [Cl^-]_{\text{нар}}},$$

где P_K , P_{Na} , P_{Cl} — коэффициенты проницаемости для соответствующих ионов; $[K^+]_{\text{нар}}$, $[Na^+]_{\text{нар}}$, $[Cl^-]_{\text{нар}}$, $[K^+]_{\text{вн}}$, $[Na^+]_{\text{вн}}$, $[Cl^-]_{\text{вн}}$ — концентрация ионов соответственно вне и внутри клетки.

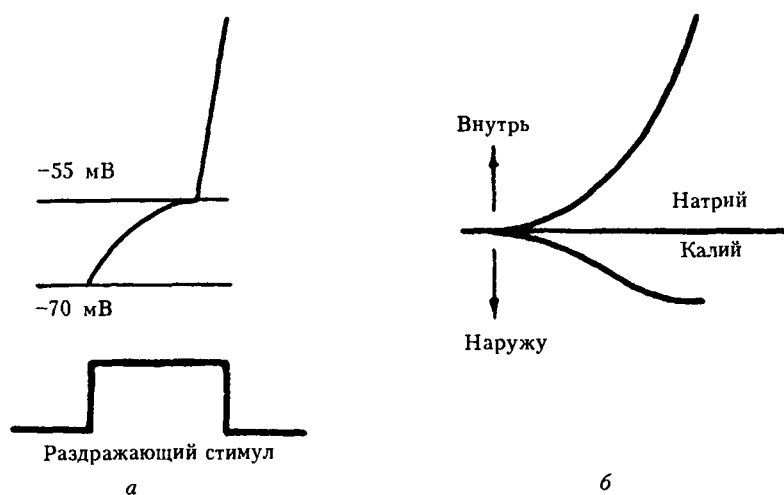
Одним из достоинств уравнения Гольдмана является то, что с его помощью можно определить мембранный потенциал не только в покое, но и при возбуждении клетки. При этом необходимо знать коэффициент проницаемости для ионов. Если мембрана проницаема только для одного вида ионов (например, K), то $P_{Na} = P_{Cl} = 0$. Уравнение Гольдмана в данном случае примет вид уравнения Нернста. На основании экспериментальных и расчетных результатов А. Ходжкин и Б. Катц показали, что для аксона кальмара в состоянии покоя отношение коэффициентов проницаемости

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45 \text{ (или } 100 : 4 : 45\text{)}.$$

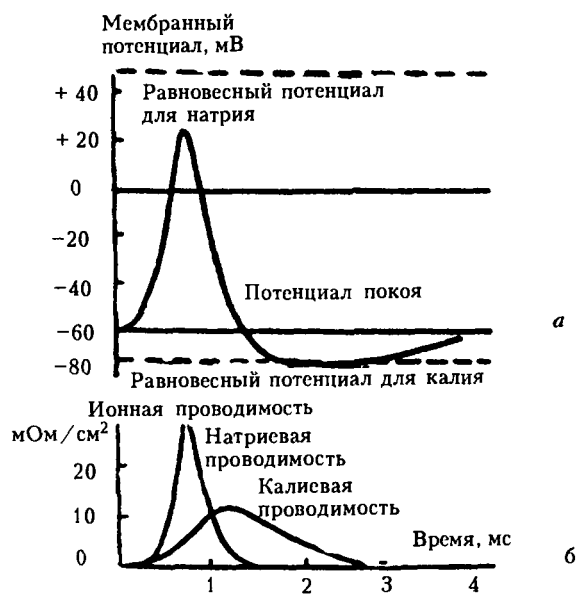
3.2.1.3. Потенциал действия

Мембранный потенциал нервного волокна обычно составляет от -70 до -90 мВ. При деполяризации аксолеммы сначала возникает местный (локальный) процесс градуального изменения уровня ПП, который переходит в потенциал действия, или распространяющийся потенциал, при сдвиге МП в сторону деполяризации на $15 - 20 \%$ (рис. 3.20, 3.21).

Потенциал действия — это кратковременный регенеративный электрический потенциал, распространяющийся вдоль аксона или мышечного волокна и возникающий в соответствии с законом «все или ничего». Критическая (пороговая) деполяризация мембраны ведет к увели-



Р и с. 3.20. Схема возникновения потенциала действия: *а* — переход местного процесса в распространяющийся; *б* — направление движения ионов натрия и калия



Р и с. 3.21. Теоретически рассчитанные кривые распространяющегося потенциала действия (*а*) и изменения проводимости мембраны для ионов натрия и калия (*б*)

чению проницаемости для натрия (g_{Na}), что обеспечивает появление восходящей фазы высоковольтной части ПД (пика, или спайка).

При длительной деполяризации натриевая проницаемость снижается, а калиевая (g_K) возрастает, что обеспечивает нисходящую фазу ПД. К. С. Коул (K. S. Cole) и Г. Дж. Кертис (H. J. Curtis) в 1938 г. с помощью метода фиксации МП доказали, что при развитии потенциала действия наряду с изменением проницаемости происходит кратковременное увеличение электропроводности клеточной мембраны. По их данным, сопротивление мембраны аксона кальмара изменяется от 1 000 Ом/см² в состоянии покоя до 25 Ом/см² в момент возбуждения, а у клетки водоросли — от 1 МОм/см² до 500 Ом/см². Повышение электропроводности мембраны при возбуждении объясняют увеличением ее проницаемости для ионов. При генерации ПД происходит деполяризация мембраны — падение уровня мембранного потенциала, а затем смена знака цитоплазматического заряда мембраны. При этом наружная поверхность мембраны обладает уже отрицательным суммарным зарядом, а внутренняя — положительным. В целом амплитуда ПД может достигать 100 — 120 мВ.

Усиление потока положительно заряженных ионов натрия, направленного внутрь клетки, уравнивает концентрационный градиент, и поступление ионов Na в клетку прекращается. Избыточный отрицательный заряд на внутренней стороне мембраны исчезает, что обеспечивает перезарядку мембраны. Это изменение проницаемости мембраны для ионов отмечается в первой фазе потенциала действия — фазе деполяризации. По данным А. Ходжкина, в это время отношение коэффициентов проницаемости мембраны аксона кальмара составляет $R_K : R_{Na} : R_{Cl} \sim 1 : 20 : 0,45$. При сравнении его с приведенным выше аналогичным соотношением в состоянии покоя видно, что для ионов K и Cl в первой фазе возбуждения проницаемость не изменилась, а для ионов Na она увеличилась в 500 раз за короткий промежуток времени (0,5 — 1 мс). Затем возрастает проницаемость мембраны для ионов K, и усиливается диффузия этих ионов из клетки. Интенсификация потока ионов K, направленного из клетки наружу, приводит к уменьшению мембранного потенциала, что в свою очередь снижает проницаемость мембраны для ионов Na, и продолжается до тех пор, пока потенциал покоя не восстановится. После этого проницаемость для ионов K падает до исходной величины, а наружная поверхность мембраны снова приобретает положительный потенциал за счет вышедших в среду положительно заряженных ионов K. Фаза, в течение которой мембранный потенциал возвращается к уровню потенциала покоя, называется реполяризацией, она всегда более продолжительна, чем деполяризация. Таким образом, реполяризация мембраны возбудимой клетки осуществляется не в результате обратного перемещения ионов Na, а вследствие выхода из клетки эквивалентного количества ионов K. В ряде случаев проницаемость мембраны для ионов K после окончания возбуждения остается повышенной, что формирует фазу так называемой гиперполяризации.

Следовательно, формирование ПД обусловлено двумя ионными потоками через биологическую мембрану. Поток ионов Na внутрь клетки приводит к перезарядке мембраны, а противоположно направленный поток ионов калия — к восстановлению исходного потенциала покоя. Потоки приблизительно равны по величине, но сдвинуты во времени, благодаря чему и становится возможным генерация ПД.

Р. Кейнс показал, что в гигантском аксоне за время одного ПД в клетку поступает $3,7 \text{ пмоль Na}^+$ на 1 см^2 поверхности волокна. Примерно такое же количество ионов K выходит из клетки. Исходя из общего содержания ионов K и Na в клетке и их расхода на один ПД, А. Ходжкин подсчитал, что при экономном использовании энергии градиентов нервные клетки способны генерировать сотни тысяч импульсов без подзарядки своих мембранных «концентрационных батарей».

Поскольку процесс возбуждения скоротечен, т. е. занимает короткие интервалы времени, а между деполяризацией, проницаемостью и ионным током существуют положительные обратные связи, развитие ПД носит взрывоподобный характер. В связи с этим для изучения механизма возбуждения был разработан адекватный метод — метод фиксации мембранного потенциала (см. рис. 3.18).

Метод фиксации потенциала позволяет непосредственно регистрировать ионные токи, текущие через мембрану при заданном уровне мембранного потенциала. Впервые он был применен К. С. Коулом, затем А. Ходжкиным, А. Ф. Хаксли (A. F. Huxley) и Б. Катцем (B. Katz). Сущность метода состоит в том, что мембранный потенциал на ограниченном участке мембраны смещают до некоторой новой величины и удерживают его с помощью электронной схемы с обратной связью, тем самым автоматически подавляя развитие ПД. Ток, протекающий через этот участок под влиянием приложенного напряжения, далее усиливается и фиксируется. Когда ПД распространяется по нервному волокну, через каждый его участок протекают токи, меняющиеся во времени, что сильно усложняет процесс регистрации. При использовании данного метода в гигантский аксон кальмара вводили металлическую проволоку, нивелируя таким образом различия в процессах, происходящих вдоль аксолеммы. В условиях фиксации потенциала ток, проходящий через мембрану I_m , представляет собой сумму двух токов — I_i , переносимого ионами через проводящие пути (g_{Na} , g_K , g_{Cl}), и емкостного тока I_c , заряжающего или разряжающего электрическую емкость мембраны.

Метод фиксации потенциала позволяет быстро смещать мембранный потенциал и удерживать его на новом уровне. С помощью этого метода А. Ходжкин и А. Ф. Хаксли показали, что при деполяризации мембраны Na- и K-каналы ведут себя неодинаково: проводимость мембраны для ионов Na возрастает достаточно быстро, достигая максимума, затем она снижается (инактивация), а проводимость мембраны для ионов K увеличивается медленнее, но удерживается в течение всего периода деполяризации нерва.

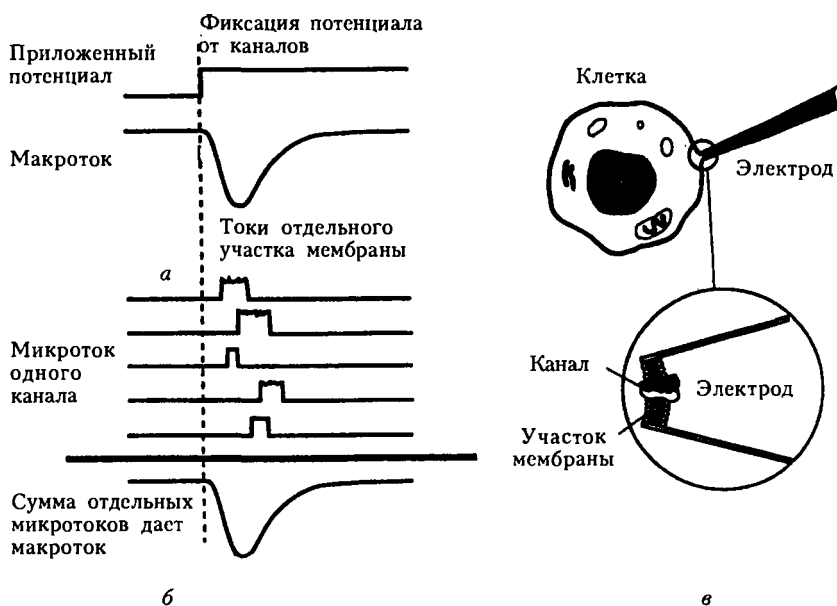
При изучении работы ионных каналов в условиях фиксации потенциалов нередко возникает необходимость введения в клетку веществ, взаимодействующих с ионными каналами или меняющих ионный состав внутриклеточной среды. В связи с этим был разработан *метод внутриклеточной перфузии* гигантского аксона кальмара, который заключается в удалении аксоплазмы и замещении ее раствором заданного состава. Перфузированный гигантский аксон кальмара сохраняет электрическую возбудимость и генерирует ПД. Результаты опытов на перфузированном аксоне подтвердили предположения о механизмах возникновения ПП и ПД. Внутриклеточная перфузия применяется и при работе с другими гигантскими нервными и мышечными волокнами беспозвоночных животных.

При изучении свойств ионных каналов мембраны тела (сомы) нервной клетки также широко используют метод фиксации потенциала, особенно при исследовании гигантских униполярных нейронов моллюсков. Форма их тела приближается к сферической (диаметр достигает 200 — 800 мкм); от тела отходит один отросток. В опытах используют принцип точечной фиксации потенциалов. В тело нейрона вводят два микроэлектрода, один из которых служит для измерения мембранного потенциала, второй — для пропускания тока. Для мембраны нейрона характерно наличие нескольких популяций потенциалзависимых ионных каналов, поэтому токи, текущие через различные типы ионных каналов, во время деполяризации мембраны, как правило, суммируются. Для их разделения необходимо изменить состав внутриклеточной среды. С этой целью был разработан специальный метод перфузии изолированных нейронов, заключающийся в следующем. К изолированной клетке подводится пипетка, которая плотно примыкает к мембране клетки. Затем мембрана разрушается, тем самым открывается доступ к внутреннему содержимому клетки, что создает возможность для внутриклеточной перфузии и одновременной фиксации потенциалов. Данный метод позволяет из токовых кривых, отражающих суммарную картину движения электрических зарядов через мембрану, выделить компоненты, характеризующие транспорт кальция.

Метод фиксации МП и перфузии применяют при изучении ионных каналов мембраны тела нервных клеток моллюсков, нейробластомы, нейронов спинальных ганглиев млекопитающих, ооцитов, миокардиоцитов, мышечных (гладкомышечных) клеток.

В последние годы получил широкое распространение *метод фиксации потенциалов на микрофрагменте клеточной мембраны* («пэчклямп»). Он позволяет регистрировать токи одиночных ионных каналов (рис. 3.22). Впервые эти токи были зарегистрированы Э. Неером (E. Neher) и Б. Сакманном (B. Sakmann) в 1976 г. Размер микрофрагмента мембраны находится на грани разрешения светового микроскопа. Основой для создания метода послужило обнаружение контакта (в определенных условиях) клеточной мембраны с кончиком стеклянной микропипетки (гигаомный контакт), в результате которого образуется

электрически изолированный участок мембраны. Контакт мембраны с микропипеткой механически очень прочен: участок мембраны можно либо изолировать, либо разрушить и проникнуть таким образом в клетку. Важным условием образования гигаомного контакта между пипеткой и клеточной мембраной является освобождение клеточной поверхности от соединительной ткани. При методе «пэтч-клямп» используют ферментативно-диспергированные клетки или клеточные культуры.



Р и с. 3.22. Макротоки (а) и микротоки (б) при регистрации методом «пэтч-клямп» (в)

Полный цикл потенциала действия

Заключая раздел, посвященный генерации ПД, отметим, что спайк, который был рассмотрен достаточно подробно, есть лишь часть цикла развития и генерации потенциала действия. Полный цикл ПД более сложен и имеет значительно большую протяженность во времени (рис. 3.23). За быстропротекающим спайком следуют более медленные и небольшие по амплитуде изменения уровня мембранного потенциала — следовая гиперполяризация и следовая деполяризация. Они совпадают по времени с повышением и понижением уровня возбудимости клетки.

В структуру ПД входят локальный потенциал, спайк и следовые потенциалы. Локальные потенциалы подразделяются на:

- локальный потенциал при генерации ПД;
- возбуждающий постсинаптический потенциал;

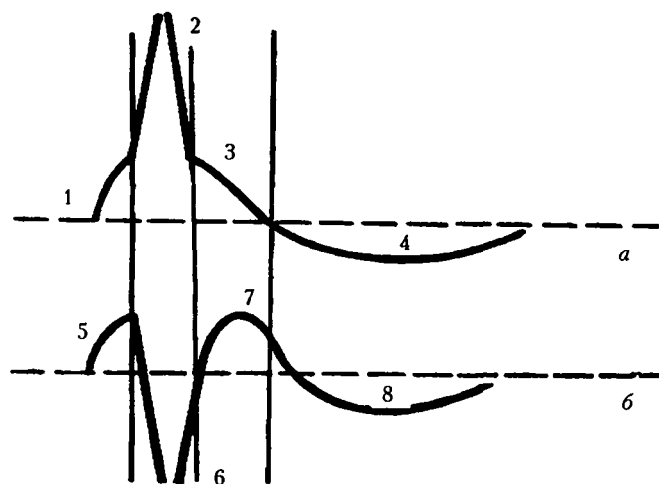


Рис. 3.23. Потенциал действия (а) и цикл изменений возбудимости (б) в нерве: 1 — местный процесс; 2 — спайк (пиковый потенциал); 3 — отрицательный следовой потенциал; 4 — положительный следовой потенциал; 5 — период латентной суммации; 6 — рефрактерный период; 7 — период экзальтации; 8 — субнормальный период; пунктирной линией обозначены уровень потенциала покоя (а) и исходный уровень возбудимости (б)

- ингибиторный постсинаптический потенциал;
- генераторный рецепторный потенциал.

При развитии локального потенциала, так же как и при ПД, наблюдается снижение сопротивления и возбудимости плазматической мембраны клетки; различия заключаются в отсутствии в случае локального ответа порога абсолютной рефрактерности и распространении по закону «все или ничего».

В табл. 3.2 приведены временные характеристики ПД для миелиновых нервных волокон холоднокровных и теплокровных животных.

В отличие от спайка следовые потенциалы очень изменчивы. Считается, что изменения следовой части ПД отражают метаболические процессы, протекающие в возбудимом образовании во время возбуждения и (главным образом) после него, т. е. во время восстановления исходного состояния мембранного потенциала.

При генерации ПД в растении, так же как и в нервной клетке, возникают ионные токи: под влиянием деполяризации увеличивается проницаемость мембраны для ионов кальция в результате активации кальциевых каналов. Вход кальция активирует хлорные каналы, что сопровождается выходом ионов хлора и деполяризацией плазматической мембраны растительной клетки. Возникает восходящая фаза ПД. Деполяризация приводит к активации К-каналов, выходу ионов калия и в результате к реполяризации плазматической мембраны растительной клетки.

Т а б л и ц а 3.2

**Характеристика потенциала действия в нервах холоднокровных
и теплокровных животных, мс**

Фаза потенциала действия	Земноводные	Млекопитающие
Местная реакция	0,04	Не зарегистрирована
Спайк	2	0,4 – 0,5
Абсолютная рефрактерность	2	0,4 – 1,0
Следовая негативность (3 – 5 % от амплитуды спайка)	20 – 30	12 – 20
Следовая позитивность (0,2 % от амплитуды спайка)	100	40 – 60

3.2.2. РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ

С генерацией ПД связан один из важнейших клеточных процессов — проведение возбуждения, т. е. процесс, обеспечивающий координацию и связь между различными клетками. Безусловно, для организма связь между органами и тканями (передача информации, координация протекающих в организме процессов и управление ими) имеет существенное значение. В настоящее время различают три типа связи (передачи) информации между клетками:

- прямая, когда сигнал передается непосредственно от клетки к клетке и изменение состояния одной клетки в ответ на воздействие ведет к изменению функционирования других клеток (химический и механический синапс);

- гуморальная, когда в межклеточную среду организма поступают продукты обмена веществ или секреты; сигнал адресован «всем, всем» (по образному выражению А. А. Ухтомского) и достигает эффекта достаточно медленно;

- нервная, когда по нервным волокнам передаются импульсы, которые обеспечивают высокую скорость и распознаваемость сигнала; эволюционно это достигается не сразу, например, в диффузной нервной системе в реакции на раздражение участвует весь организм, но быстрота распространения сигнала уже высока.

Все виды связи существуют в организме одновременно и совершенствуются с эволюцией. Для высших беспозвоночных и позвоночных животных особенно важен последний вид связи. С ПД часто отождествляют нервный импульс. *Нервный импульс* — единица распространяющегося возбуждения, средство передачи информации из одного участка организма в другой; в физико-химическом аспекте — это временное перемещающееся обратимое изменение мембранного потенциала нервной клетки.

В норме по нервным волокнам распространяются не одиночные

импульсы, а их ряды и залпы различной частоты и длительности — ритмическое возбуждение. Кодирование передаваемой по нервным волокнам информации осуществляется за счет разной конфигурации рядов импульсов (различная частота следования, постоянный или меняющийся ритм, продолжительность рядов и т. п.) (рис. 3.24). В нервной системе волокна служат согласующим звеном, и их функция заключается в передаче заданной информации без искажений, с высокой скоростью и лабильностью.

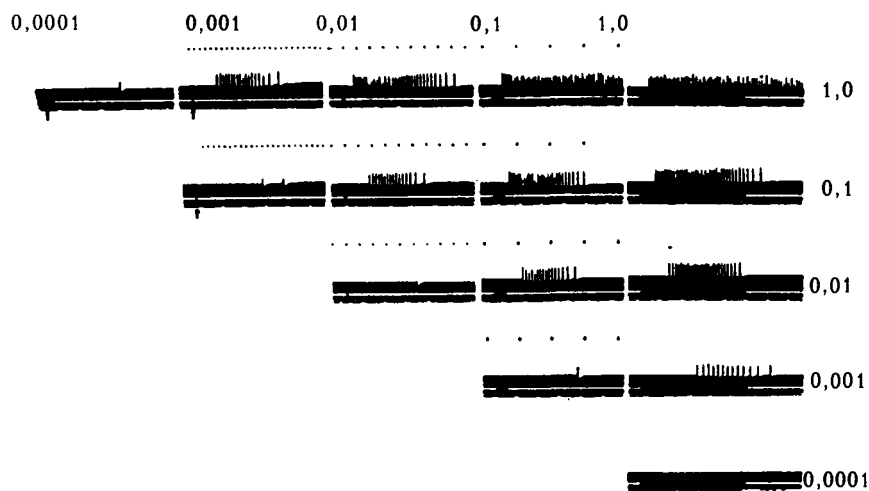


Рис. 3.24. Импульсы в зрительном нервном волокне. Цифры сверху — длительность вспышки света от 0,0001 до 1,0 с; цифры справа — относительная интенсивность вспышки; период освещения глаза указан разрывом белой линии; отметка времени (0,2 с) показана точками

Прежде чем остановиться на сути этих закономерностей распространяющегося возбуждения, ознакомимся с механизмом проведения ПД по нервным волокнам.

3.2.2.1. Проведение потенциалов действия (теория местных токов)

Теория местных токов, объясняющая процесс распространения ПД по мышечным и нервным волокнам, была предложена Л. Германном (L. Hermann) во второй половине XIX в. Согласно этой теории между возбужденным и невозбужденным участками волокна возникают токи (как и между интактным и поврежденным участками). Ток, выходящий из данного участка мембраны нервного волокна, служит своеобразным раздражителем для соседнего участка, затухая в месте его инициации (рис. 3.25). Теория местных токов сохраняет свое значение и сегодня, когда разработаны представления о мембранах и их роли в физиологических процессах.

Проведение ПД возможно благодаря кабельным свойствам нервных волокон. Кабелем называют проводник электричества, окруженный изолятором и погруженный в проводящую среду. При подаче сигнала создается разность потенциалов между « жилой » кабеля и окружающей средой. Так как изоляция кабеля неидеальна, то ток вытекает в окружающую среду. Сигнал проходит по кабелю независимо от того, что находится на другом его конце, где этот конец расположен, как он изолирован. Чтобы сигнал прошел по всей длине кабеля без затухания, необходима надежная изоляция. Эта проблема впервые возникла у инженеров при прокладке трансатлантического телеграфного кабеля.

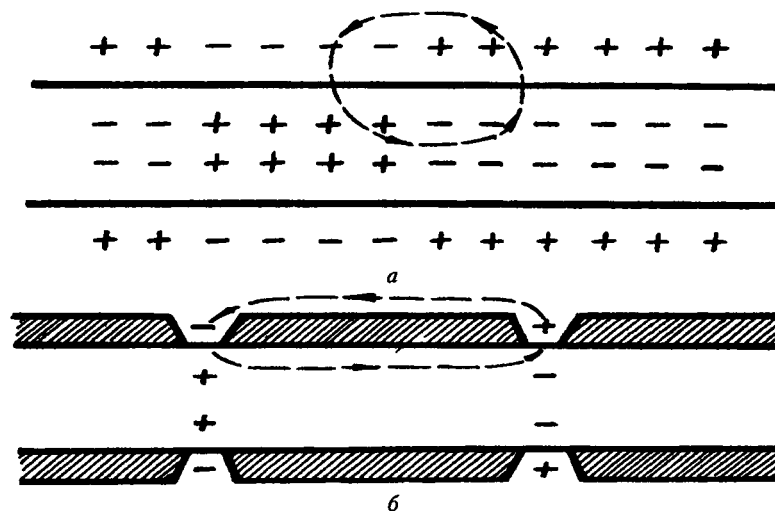


Рис. 3.25. Механизм проведения нервного импульса: *a* — непрерывное проведение в немиелиновом волокне; *б* — сальтаторное (скачкообразное) проведение в миелиновом волокне от одного перехвата Ранвье к другому

Нервное волокно можно с полным основанием сравнить с кабелем: мембрана имеет высокое сопротивление (от 500 до 10 000 Ом/см²) и большую емкость (1 — 5 мкФ/см²). Она разделяет два раствора с низким сопротивлением — окружающую среду и аксоплазму, которую лишь условно можно называть раствором. По существу, ПД при распространении возбуждения возникает бесконечное число раз, создавая цепь возбужденный участок — аксоплазма — невозбужденный участок — внешняя среда. Согласно теории местных токов скорость распространения возбуждения должна зависеть от сопротивления среды, окружающей волокно (сопротивление аксоплазмы практически постоянно), что было подтверждено А. Ходжкиным. Он определял скорость проведения ПД, помещая нервные волокна в среды с разным сопротивлением (в морскую воду и масло). В экспериментах с гигантским

аксоном было показано, что разница в скорости проведения ПД волокна, находящегося в морской воде и масле, весьма заметна: в последнем скорость проведения значительно ниже.

3.2.2.2. Факторы, определяющие скорость проведения потенциала действия

На примере распространения ПД можно проследить связь между физическими параметрами возбудимых клеток и рядом физиологических процессов. При сдвиге мембранного потенциала (потенциала покоя) до критического уровня местный процесс формирования локального ответа переходит в распространяющийся. Скорость проведения ПД определяется несколькими факторами, в частности диаметром волокна и степенью его изоляции от внешней среды (миелинизация).

При проведении возбуждения в каждом последующем участке первого волокна ПД возникает вновь; скорость его появления и дальность распространения локальных изменений определяют скорость проведения ПД (v). В немиелиновом волокне v находят по формуле

$$v = S\lambda/\tau,$$

где S — фактор надежности; λ — пространственная константа; τ — временная константа.

Временная константа характеризует длительность нарастания и падения изменений мембранного потенциала и зависит от сопротивления и емкости мембраны:

$$\tau = R_m C_m,$$

где R_m — сопротивление мембраны; C_m — емкость мембраны.

Пространственная константа характеризует протяженность распространения надпороговой деполяризации:

$$\lambda = (R_m/R_i)^{1/2},$$

где R_m — сопротивление мембраны; R_i — сопротивление внешней среды.

На рис. 3.26 показано соотношение λ и l (l — расстояние от места раздражения, мм, на котором местный градуальный потенциал снижается до $1/l$ своей исходной величины). С λ и l связана скорость распространения ПД. Так, для гигантского аксона кальмара $\lambda \approx 5$ мм, а скорость проведения ПД равна 25 м/с; для скелетной мышцы лягушки $\lambda = 2$ мм, а скорость проведения — от 3 до 7 см/с.

Для перехода местного процесса — локального ответа возбудимой мембраны в распространяющийся уровень деполяризации должен иметь величину, характерную для данной возбудимой клетки. Раздражителем служит ПД, который вызывает деполяризацию соседнего участка волокна. Фактор надежности этого процесса определяют как соотношение между амплитудой ПД и критическим уровнем деполяризации мембраны. Например:

$$S = \text{ПД} / (\text{ПП} - \text{МП}_{\text{кр}}) = 120 / (70 - 55) = 8.$$

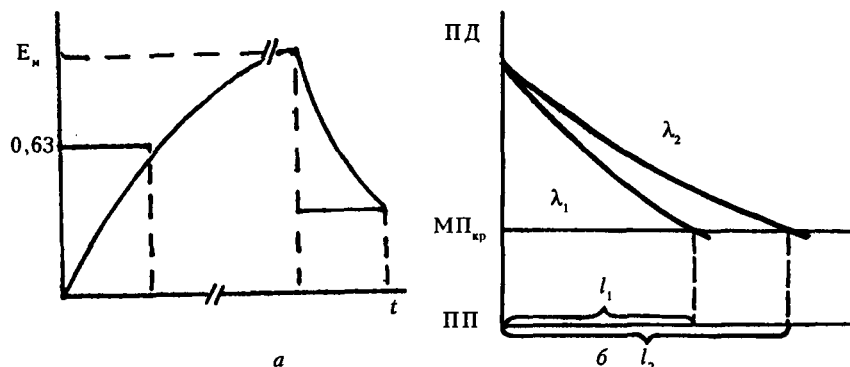


Рис. 3.26. Факторы, определяющие скорость проведения потенциала действия: *a* — временная константа характеризует время нарастания и спада мембранного потенциала, зависит от сопротивления и емкости мембраны; *б* — пространственная константа (λ) характеризует дальность (l) распространения надпороговой деполяризации

Скорость проведения ПД в немиелиновых волокнах может быть повышена лишь за счет увеличения диаметра волокна, т. е. поперечного сечения, и, следовательно, уменьшения сопротивления. В большинстве первых волокон беспозвоночных животных диаметром от 0,5 до 20,0 мкм скорость проведения не превышает 4 — 5 м/с, что вполне достаточно для животных с малоподвижным образом жизни. Однако и здесь встречаются исключения; в первую очередь это относится к некоторым видам головоногих моллюсков — кальмарам и каракатицам. В норме по тонким волокнам нервных стволов кальмара или каракатицы идут редкие импульсы (не выше нескольких в секунду или один в несколько секунд). Однако образ жизни этих моллюсков предусматривает и стремительные рывки (нападение на добычу или уход от опасности). В таком случае требуются быстрая передача сигнала, высокая скорость проведения ПД.

Для выполнения функции проведения возбуждения в экстремальных условиях жизни животного у головоногих моллюсков в ходе эволюции произошло слияние нескольких десятков и даже сотен тонких волокон, в результате чего образовались гигантские аксоны диаметром до 1 мм. Проведение РВ в таком аксоне требовало рационального энергообеспечения. Действительно, при проведении ПД через 1 см² мембраны аксона выходит 4 мкмоль калия. С учетом того что диаметр волокна составляет 500 мкм, при одном ПД теряется $1/10^6$ всего калия аксоплазмы. Другими словами, гигантский аксон способен провести $5 \cdot 10^5$ ПД без «перезарядки» калиевой «батареи» за счет энергии АТФ.

Сказанное свидетельствует о том, что проведение одиночного ПД не нуждается в экстренном энергообеспечении. Проведение РВ в толстых волокнах (обладающих высоким соотношением поверхность —

объем) требует значительных затрат АТФ. Действительно, при диаметре волокна 1 мкм и при аналогичном выходе калия потеря соответствует $1/10^3$ части калия аксоплазмы. Очевидно, гигантское волокно в большей мере приспособлено к проведению залпов импульсов высокой частоты с большой скоростью. Оно обладает значительным запасом прочности, так как залпы высокой частоты в аксоне коротки и возникают достаточно редко (стремительные броски животного). Так, в норме частота проводимых ПД в гигантском аксоне составляет 3 – 6 имп./мин, а при броске возрастает приблизительно в 10 000 раз.

Таким образом, на примере аксона кальмара показаны связь структуры и функций нервного волокна, а также зависимость характеристик возбудимых образований от образа жизни животных. Однако гигантский аксон скорее исключение, чем правило. Путь повышения скорости проведения ПД путем наращивания диаметра аксона не мог быть перспективным для позвоночных животных, образ жизни которых постоянно требует более высоких скоростей распространения нервного импульса. Согласно теории местных токов повышение скорости проведения ПД может быть достигнуто не только за счет падения внутреннего сопротивления (увеличение поперечного сечения волокна), но и вследствие повышения сопротивления мембраны, окружающей аксон. Эту функцию в процессе эволюции выполняет миелин (табл 3.3).

Таблица 3.3

Характеристика волны возбуждения в нерве краба и лягушки

Параметр	Нерв холодильной конечности травяного краба	Седалищный нерв лягушки
Длительность высоковольтной части (пика, или спайка) потенциала действия, мс	3 – 4 (общий ствол)	2 – 3 (общий ствол) 0,6 – 0,9 (волокна А)
Скорость проведения, м/с	5,3 (быстрые волокна)	47 (волокна А)
Следовая негативность (после стимуляции 1 мин)	2 – 3 мин	1,5 с
Теплопродукция покоя, Дж/г в 1 ч	0,69	0,25
Начальное тепло на 1 имп., Дж/г	$3 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$
Потребление O_2 в покое, $см^3/г$ в 1 мин	$143 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$
Потребление O_2 на 1 имп., $см^3/г$	$23 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$

* Данные для одного импульса определяли при пересчете результатов, полученных при более или менее продолжительной ритмической стимуляции нерва.

Для миелиновых нервов характерно сальтаторное проведение. Поскольку сопротивление в миелиновых сегментах значительно выше,

чем в межмиелиновых перехватах, ПД генерируется именно в последних и распространяется скачкообразно от перехвата к перехвату. Обсуждая факторы, определяющие скорость проведения ПД в миелиновых волокнах, как правило, учитывают расстояние между перехватами (L), соотношение между диаметром волокна (D) и его осевого цилиндра (d):

$$L/D = d/D (\ln D/d)^{1/2}.$$

Увеличение расстояния между перехватами обычно сопровождается усилением миелинизации: отношение $D/d = 1/0,6$, скорость проведения потенциала действия $v = d \cdot 6$, время «перескока» с перехвата на перехват — 0,07 мс. Эта величина практически одинакова у всех миелиновых волокон, хотя отношение L/D может варьировать.

Если в немиелиновых волокнах скорость проведения пропорциональна $D^{1/2}$, то в миелиновых — D . Таким образом, эволюция нервной системы отработала два механизма повышения скорости распространения ПД: увеличение диаметра нервного волокна и усиление миелинизации, повышающее кабельные свойства волокна (см. табл. 3.3).

Известно, что длина и площадь перехвата Ранвье меняются даже при незначительном изменении функционального состояния нервного волокна (например, при длительном РВ). Если перехват между миелиновыми сегментами возрастает, то сопротивление падает и процесс «перескока» ПД облегчается, что снижает суммарный порог и увеличивает скорость проведения возбуждения.

3.2.3. ИОННЫЙ КАНАЛ

В настоящее время считается доказанным, что возбудимость нервных и мышечных клеток, генерация и распространение ПД связаны с функционированием специализированных мембранных белков — ионных каналов. Ионные токи, проходящие через каналы, являются непосредственной причиной возникновения ПД. Между изменениями мембранного потенциала и величинами ионных токов в мембране существует характерная зависимость: сдвиг мембранного потенциала при стимуляции приводит к изменению ионной проводимости мембраны и соответственно величины и направления ионных токов.

При переходе возбудимой клетки от состояния покоя к функционированию ионные каналы претерпевают комплексные конформационные изменения. Хотя и существует несколько представлений о численности конформационных состояний канала (теория одиночного канала-поры или теория канала — агрегата протоканалов), но последовательность изменений конформации (на примере Na-канала) можно представить как комплекс следующих состояний: закрытое — активированное — инактивированное.

В настоящее время рассматриваются две основные структурно-функциональные модели ионного канала:

1) ионный канал имеет единственную пору. Подсостояния канала (промежуточные состояния канала при прохождении цикла от состояния покоя до состояния инактивации) возникают благодаря флуктуации эффективного диаметра поры;

2) одиночный канал — это ансамбль (агрегат) протоканалов (одиночных пор), расположенных в мембране параллельно друг другу. Все протоканалы взаимосвязаны, функционируют синхронно, что проявляется как работа одного канала. Подсостояния канала следующие:

- при активации протоканалов подсостояния кратны и квантованы;

- величина электрического скачка проводимости активированного протоканала составляет несколько пикосименсов;

- переход канала между подсостояниями проводимости является кооперативным процессом;

- при активации протоканалов подсостояния проводимости могут распадаться на независимые группы (олигомеры) вплоть до мономеров;

- свойства канала (селективность, потенциалзависимость) идентичны во всех кооперативных подсостояниях;

- при распаде совокупности протоканалов на олигомеры свойства проводимости меняются;

- реагенты на S—S-группы белков способствуют формированию олигомеров, а реагенты на SH-группы восстанавливают синхронность работы всех протоканалов канала;

- двухвалентные катионы (Ca и Ba) синхронизируют переходы протоканалов между подсостояниями.

Согласно теории Ходжкина — Хаксли активация ионного канала последовательно проходит ряд состояний: в ответ на положительный сдвиг мембранного потенциала субъединицы канала переходят в активную конформацию, затем взаимодействуют друг с другом; после взаимодействия трех (в случае Na-канала) субъединиц данный канал переходит в активное состояние (открывается), пропуская ионы натрия в клетку. Дальнейшие изменения конфигурации субъединиц переводят канал в инактивированное состояние. Предполагается, что каждый переход может совершаться в обоих направлениях, но на практике большая часть каналов проходит полный цикл — от состояния покоя до инактивации и обратно. Механизмы активного и инактивированного канала представлены на рис. 3.27, 3.28.

В соответствии с теорией Ходжкина — Хаксли проводимость натриевого (g_{Na}) и калиевого (g_K) канала может быть описана следующими уравнениями:

$$g_{Na} = g_{Na}^* m^3 h;$$

$$dm/dt = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m;$$

$$dh/dt = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h;$$

$$g_K = {}^*g_K n^4,$$

$$dn/dt = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n,$$

где ${}^*g_{Na}$ — максимальная проводимость канала; m — вероятность активации канала; h — вероятность инактивации канала; α, β — потенциал-зависимые константы скорости прямой и обратной реакции процесса активации канала; *g_K — максимальная проводимость канала; n — вероятность активации канала.

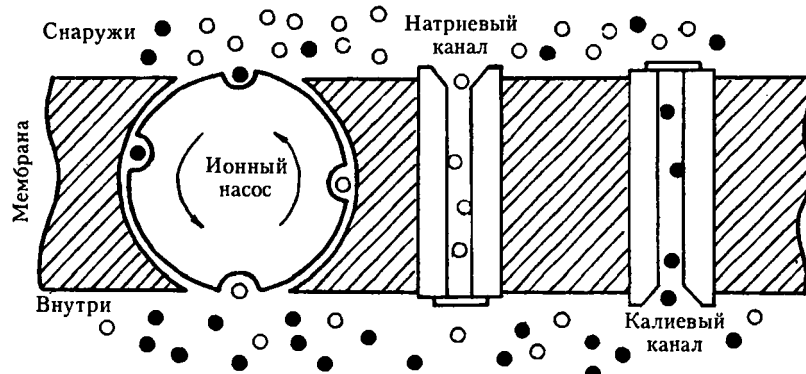


Рис. 3.27. Схематическое изображение ионных каналов в плазматической мембране. На схеме натриевый и калиевый каналы-поры показаны с закрытыми «воротами». При открывании каналов ионы движутся по градиенту («вниз по склону»). Канал-насос переносит ионы натрия (о) и калия (•) против градиента («вверх по склону»)

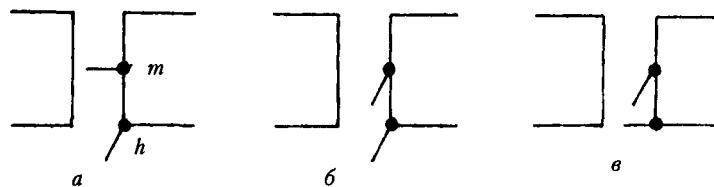


Рис. 3.28. Схематическое изображение положения активационных (m) и инактивационных (h) «ворот» натриевых каналов: a — в состоянии покоя; b — при активации; v — при инактивации

Физические принципы при моделировании транспорта иона через канал

В настоящее время при оценке физических параметров, регулирующих проникновение иона через канал, постулируется следующее:

— поступление иона в канал сопровождается заменой воды гидратной оболочки на полярные группы селективного фильтра канала (гидратация иона);

— взаимодействие иона с зарядами, выстилающими пору канала, определяется профилем энергии барьера (W):

$$W = \frac{e^2}{2a(1/\epsilon_k - 1/\epsilon_c)} - \frac{e^2}{(a+c)\epsilon_k},$$

где a — радиус иона; ϵ_k — диэлектрическая проницаемость канала; ϵ_c — диэлектрическая проницаемость среды; c — радиус анионной группы;

— при прохождении через канал ион долго задерживается в «потенциальной яме», «перескок» возможен только в пустую «потенциальную яму», второй ион не может находиться в занятой «потенциальной яме»;

— «перескоки» между «потенциальными ямами» осуществляются под действием тепловых флуктуаций. Вероятность «перескока» зависит от величины приложенного электрического поля.

В рассматриваемой модели предполагается, что при активации канала происходит переход от неактивного состояния канала (число неактивных каналов — N_n) к активному (число активных каналов — N_a). Тогда если $N = N_n + N_a$, а a и b — константы соответственно прямой и обратной реакции активации канала, то

$$dN/dt = aN_n - bN_a = aN - aN_a = aN - (a+b)N_a.$$

При сдвиге МП, приводящем к открыванию всех каналов, кинетика перехода будет соответствовать выражению

$$N_a(t) = N[1 - \exp(-t/\tau)],$$

где τ — характерное время, $\tau = 1/(a+b)$.

В рассмотренной модели проводимость возрастает по экспоненте до стационарного уровня.

3.2.4. ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ

Ионные каналы — это белковые молекулы, окруженные заряженными липидами, которые активно участвуют во всех мембранных процессах. На поверхности клеточной мембраны находятся фиксированные заряженные группы белков и липидов, участвующие в формировании трансмембранного потенциала. В комбинации с диффузионным потенциалом потенциал заряженных групп влияет на проницаемость мембраны и функционирование ионных каналов. Количественное описание поверхностных потенциалов и их изменений основывается на модели, разработанной Г. Гуи и Р. А. Чапменом (рис. 3.29, 3.30).

Регистрируемый с помощью микроэлектродов клеточный мембранный потенциал (E_m) складывается из суммы поверхностных потенциалов обеих сторон мембраны и потенциала покоя:

$$E_m = E_{нар} + E_{вн} + \text{ПП},$$

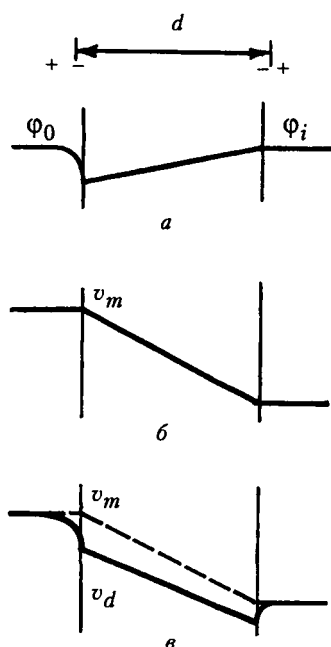
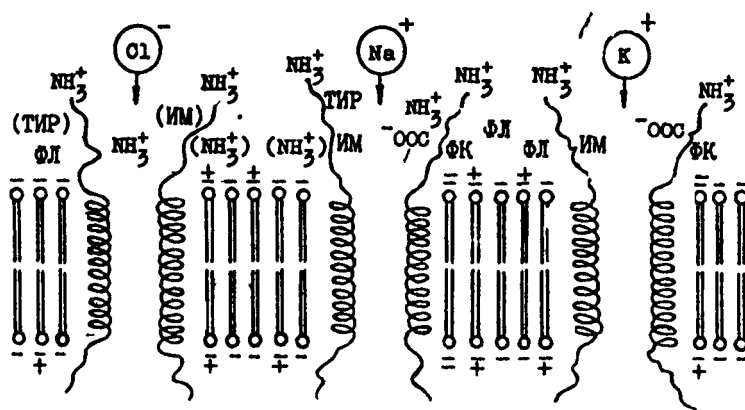


Рис. 3.29. Распределение потенциала в системе раствор — мембрана — раствор: *a* — в отсутствие градиента концентрации проникающего иона и при наличии фиксированного заряда на мембране; *b* — в отсутствие фиксированного заряда на мембране и при наличии градиента концентрации проникающего иона; *v* — отрицательные фиксированные заряды и градиент концентрации проникающего иона. Здесь v_m — разность потенциалов между растворами; ϕ_0 — потенциал внешней поверхности мембраны; ϕ_i — потенциал внутренней поверхности мембраны; v_d — разность потенциалов на мембране; d — толщина мембраны



Аксоплазма

Рис. 3.30. Схема распределения поверхностного заряда на мембране, участвующего в регуляции ионной проводимости нервного волокна. ФК — фосфатидная кислота; ИМ — имидазол; ТИР — тирозин; ФЛ — фосфолипиды; ^-OOC — ионизированные карбоксильные и фосфатные группы фосфолипидов

где $E_{\text{нар}}$, $E_{\text{вн}}$ — потенциал соответственно наружной и внутренней поверхности мембраны.

Известно, что модуляции поверхностного заряда мембраны влияют на характер активации потенциалзависимых каналов, т. е. меняют их вольт-амперные характеристики. Изменения E_m , зависящие от трех указанных выше компонентов, в целом влияют и на порог возбудимости клетки. Фиксированные заряды, формирующие поверхностный заряд, принадлежат мембранным белкам и липидам. На мембранах и в примембранных слоях существуют отрицательно и положительно заряженные группы. Так, при исследовании нервных волокон лягушки были выявлены 3 типа зарядов, причем 2 из них обусловлены кислотными группами белков и фосфолипидов ($\text{C}=\text{O}$), а третий — основными NH -группами. При низком pH кислотные группы нейтрализуются, основные заряжаются положительно. При высоком pH основные группы нейтрализуются, а кислые заряжаются отрицательно.

В модели Гуи — Чапмена рассматривается находящаяся в растворе электролита плоская поверхность мембраны с равномерно распределенными зарядами. На ионы, содержащиеся в растворе электролита в примембранном слое, действуют электростатические силы, наличие которых создает двойной электрический слой. Тепловое движение ионов регулирует диффузию ионов в двойном примембранном слое. Модель Гуи — Чапмена предусматривает экранирование поверхностного заряда ионами, находящимися в растворе электролита. Эффективность экранирования поверхностных зарядов двухвалентными ионами выше, чем одновалентными.

Важно, что изменения порога при генерации ПД нервных и мышечных клеток обычно зависят от экстраклеточной концентрации двухвалентных катионов и pH . Изменения поверхностного заряда при увеличении концентрации двухвалентных катионов приводят к гиперполяризации мембраны, и порог повышается. Такое действие двухвалентных катионов называют стабилизирующим. Согласно расчетам Г. Эйзенмана, при поверхностном потенциале 116 мВ и наружной концентрации ионов при $\text{Ca } 10^{-3}$ моль/л их примембранная концентрация составляет примерно 10 моль/л, т. е. в 10 000 раз больше, чем в растворе.

Воротные механизмы в ионных каналах

Активация потенциалзависимых каналов связана с перемещением в мембране подвижных зарядов, что создает воротный ток. Параллельно с ним возникает ионный ток, обусловленный прохождением ионов через канал. Для разделения этих токов используют блокаторы ионных каналов, не влияющие на воротные токи, или ионы, не проникающие через каналы. Воротные токи Na -каналов впервые были зарегистрированы К. Армстронгом (С. Armstrong), Р. Кейнсом, Ф. Безаниллой (F. Bezanilla) и Е. Рохасом (E. Rojas) в исследованиях на внутриклеточно перфузируемом гигантском аксоне кальмара. Для подавления

Na-тока применяли блокатор Na-каналов тетродотоксин. Вместо ионов Na использовали крупные непроницающие катионы, а калий заменяли цезием. В этих условиях был выявлен воротный (или так называемый асимметричный) ток.

Рассмотренная ранее модель активации потенциалзависимого канала предполагает, что его открыванию предшествует перемещение воротных заряженных частиц (связанных с мембраной). Ток воротных частиц не зависит от величины и направления градиента проникающих ионов и сохраняется в присутствии блокаторов (тетраэтиламмония и др.). Ток смещения воротных заряженных частиц асимметричен, т. е. проявляется только при деполяризации мембраны нервного волокна. Так как кинетика воротного тока может быть представлена в виде соотношения $N_a(t) = N[1 - \exp(-t/\tau)]$, то воротный ток

$$I_v = dN_a/dt = -N \exp(-t/\tau).$$

Тогда доля открытых каналов может быть определена из следующего соотношения (рис. 3.31):

$$N_a / N = \frac{a}{a+b} = \frac{1}{1+b/a}.$$

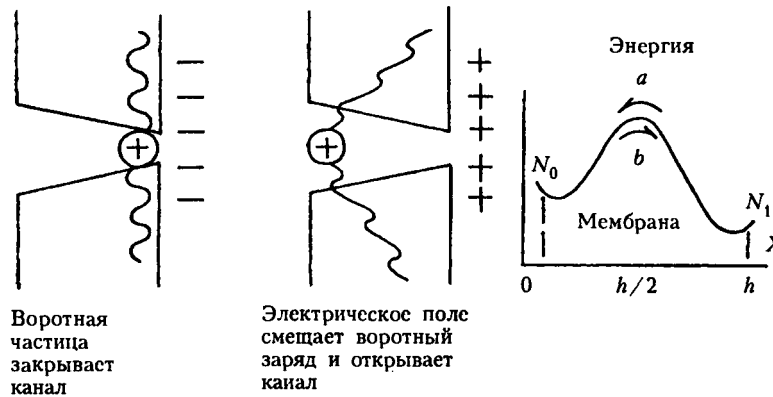


Рис. 3.31. Схема воротных механизмов в ионных каналах

Электрический потенциал мембраны влияет на перенос воротных частиц так же, как и на перенос транспортируемого иона, т. е.

$$a = a_a \exp(zE/2), \quad b = b_a \exp(zE/2).$$

В итоге

$$N_a / N = \frac{1}{1 + k_a \exp(-zE)}, \quad \text{если } k_a = b_a / a_a.$$

Ток через мембрану, содержащую N каналов, равен $I = iNp$, где i — ток через один канал, $i = g(E - E^*)$; p — вероятность открытого состояния канала, $p = N_a/N$.

Через открытый канал протекает ток, пропорциональный его проводимости (g). Если мембранный потенциал E равен равновесному потенциалу E^* , то тока нет; при $E > E^*$ ток выходит из клетки, а при $E < E^*$ ток направлен внутрь. Например, для натриевого канала $E^* = 50$ мВ. Таким образом, для возбудимых мембран характерны вольт-амперные характеристики с участком отрицательного наклона (отрицательного сопротивления).

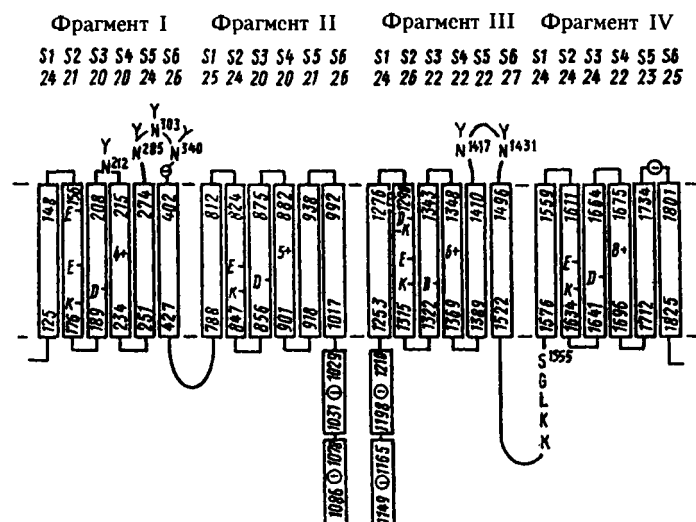
3.2.5. ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫЕ КАНАЛЫ

3.2.5.1. Потенциалзависимый натриевый канал

Понятие «ионный канал» в современной мембранологии означает интегральный мембранный белок (или гликопротеид), находящийся в липидном бислое мембраны и осуществляющий перенос ионов с одной стороны мембраны на другую за счет электрохимического градиента. Во многих случаях канал структурно связан с другими мембранными белками и компонентами цитоскелета. Протеиновый комплекс канала может состоять из нескольких тысяч аминокислот, организованных в одну или несколько полипептидных цепей с несколькими сотнями ковалентно связанных полисахаридных цепей на наружной поверхности. Гидрофильные аминокислоты «выстилают» внутренность поры, а гидрофобные контактируют с липидным бислоем.

Молекулярная структура (полная аминокислотная последовательность) установлена пока для небольшого числа ионных каналов (в частности, для Na- и Ca-каналов) и нескольких типов рецепторов, в частности для ацетилхолинового рецептора. Наиболее полные сведения о первичной структуре каналов можно получить с помощью методов молекулярной биологии — расшифровка аминокислотной последовательности белков по нуклеотидной последовательности комплементарной ДНК и др. Группа японских ученых-биохимиков установила первичную структуру Na-канала, выделенного из плазматических мембран электрической пластинки угря. В структуре белка обнаружены четыре гомологичных домена, содержащих по пять гидрофобных, амфифильных и один характерный сегмент с большим положительным зарядом (гомологичные домены расположены последовательно) (рис. 3.32).

Ионная пора образуется при свертывании гомологичных доменов в цилиндрическую структуру так, что внутри цилиндра остаются гидрофильные участки амфифильных сегментов (они образуют стенки поры), а снаружи — гидрофобные участки, контактирующие с липидами мембран. Сведения о функциях ионных каналов получены лишь в



Р и с. 3.32. Модель укладки последовательности аминокислот Na-канала в мембране. Блоками показаны трансмембранные сегменты S1 — S6 четырех повторяющихся фрагментов I — IV. Номера сегментов и число образующих их аминокислотных остатков объединенной структуры приведены по краям блоков. Функционально важные остатки сегментов обозначены в однобуквенном коде. Вилками показаны общие для структур участки N-гликозилирования (Asn-X-Ser-(Thr)), где X — любая аминокислота, за исключением Pro). S¹⁵³⁵ — единственный общий для всех структур участок фосфорилирования с АМФ-зависимой протеникиназой (Lys(Arg)-Lys (Arg)-X(X)-Ser(Thr)). Знаки «+» и «-» обозначают доминирующий заряд выделенных участков цепи

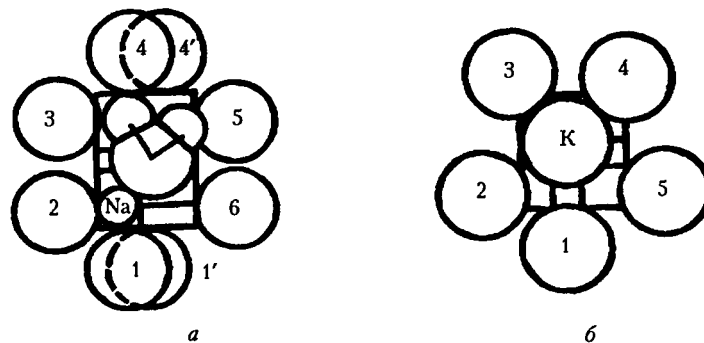
результате исследований ионных потоков при воздействии на каналы различными физико-химическими и фармакологическими агентами. Практически вся информация о свойствах Na-каналов выявлена при изучении гигантского аксона кальмара и перехватов Ранвье. Так, В. К. Чандлер (W. K. Chandler) и Г. Мевес (H. Meves) установили, что проницаемость Na-каналов для катионов щелочных металлов меняется следующим образом:



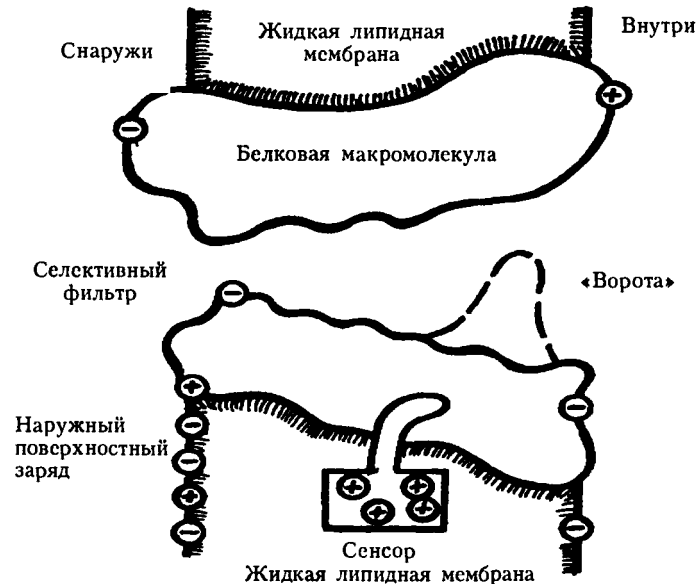
Если принять проницаемость канала для Na⁺ за единицу, то для лития, натрия, калия, рубидия и цезия она будет равна соответственно 1, 1; 1, 0; 0, 083; 0, 025; 0, 016.

Данные, полученные при анализе проницаемости Na-каналов в перехватах Ранвье нервных волокон, послужили Б. Хилле (B. Hille) основанием для создания модели структуры канала, согласно которой вход в Na-канал имеет прямоугольную форму; размер поры составляет примерно 0,3 — 0,5 нм (рис. 3.33, 3.34). Это минимальный размер

селективного фильтра, который необходим для того, чтобы органические катионы, образующие водородные связи с атомами кислорода, могли пройти через Na-канал. Фильтр окружен восемью атомами кислорода. В нем находится ион Na с молекулой воды. Связанная с ионом молекула воды образует водородные связи с атомами кислорода. При исследовании проницаемости Na-каналов Б. Хилле обнаружил такую последовательность: $\text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Tl}^+ > \text{K}^+$.



Р и с. 3.33. Гипотетическая структура селективных фильтров Na- и K-каналов с проникающими ионами. В Na-канале находится молекула H_2O ; 1 и 1' (Na-канал) — отрицательно заряженная группа $-\text{COO}^-$. Все остальные кружки с цифрами — атомы кислорода; а — Na-канал; б — K-канал



Р и с. 3.34. Схема строения ионного (натриевого) канала

Соотношение P_K/P_{Na} составляет 1/12. В Na-канале имеется карбоксильная кислотная группа. Она создает сильное электрическое поле и обеспечивает селективность транспортируемых ионов.

Важную роль в идентификации ионных каналов и разделении ионных токов, проходящих через все типы ионных каналов, играют вещества, избирательно подавляющие ионную проницаемость. Среди блокаторов особое место принадлежит тетродотоксину и сакситоксину. Первый содержится в яичниках, печени и коже рыб семейства Tetradotidae (иглобрюхие) и, действуя на наружное устье канала, подавляет ПД в нервах и мышцах. Второй присутствует в организме некоторых жгутиковых и ингибирует натриевую проводимость в тех же концентрациях, что и ТТХ.

В медицинской практике многие годы применяются местные анестетики, которые, блокируя Na-каналы, препятствуют возникновению ПД. Большинство из них являются третичными аминами и могут находиться в двух формах — заряженной и нейтральной. Многочисленные исследования показали, что местные анестетики в заряженной форме блокируют Na-каналы, лишь размещаясь внутри клетки и проникая во внутреннее устье Na-канала. Там они связываются с рецептором, расположенным между воротами и селективным фильтром канала. Таким образом, для взаимодействия молекулы заряженного анестетика с Na-каналом необходимо, чтобы канал был открыт (активирован). В нейтральной форме местные анестетики, растворяясь в липидах мембраны, могут взаимодействовать с тем же рецептором вне внутреннего устья канала. В данном случае они связаны как с открытыми, так и с закрытыми Na-каналами.

Существуют также агенты, ликвидирующие инактивацию Na-каналов. К ним относятся верапамил, аконитин, батрахотоксин. Все они липидорастворимы. При их действии открытое состояние длится в 50 раз дольше, чем в нормальных условиях.

3.2.5.2. Потенциалзависимый калиевый канал

Потенциалзависимые калиевые каналы играют важную роль в электрической активности многих клеток. Активация этих каналов способствует: реполяризации мембраны во время ПД; развитию гиперполяризации мембраны, что играет большую роль в формировании ритмической активности ряда возбудимых клеток. Существует несколько разновидностей потенциалзависимых K-каналов, различающихся по способности инактивироваться (кинетика активации и инактивации) и реакцией на действие фармакологических агентов. В глиальных клетках обнаружены потенциалзависимые K-каналы, которые регулируются как мембранным потенциалом, так и нейромедиаторами и гормонами. В нейронах симпатических ганглиев амфибий обнаружены K-каналы, деактивирующиеся при воздействии на нейрон ацетилхолина, вызывающего активацию мускариновых холинорецепторов. Эта активация приводит

к появлению внутри клетки вторичного посредника и подавлению функции калиевых каналов.

Данные о свойствах калиевых каналов получены преимущественно в результате исследований, проведенных на гигантском аксоне кальмара, а также на перехватах Ранвье миелинизированных нервных волокон лягушки. В первом случае было выявлено, что во время деполяризации происходит относительно быстрый, но кратковременный рост натриевой проводимости и более медленный, стойкий — калиевой. Натриевые и калиевые каналы возбудимых мембран пространственно разобщены. В качестве доказательства этого обычно приводят данные о возможности изолированного подавления как натриевой, так и калиевой проводимости мембраны при действии ТТХ, СТХ и блокатора К-канала — ТЭА. К. Армстронг рассматривал К-канал как пору, активационные «ворота» которой расположены на цитоплазматической стороне канала. Внутреннее устье канала расширено и открыто для полностью гидратированных ионов калия, а также ТЭА. За расширенным устьем следует избирательная узкая часть канала. При изучении избирательности калиевых каналов в перехватах Ранвье миелинизированных нервных волокон для небольших катионов Б. Хилле обнаружил такую последовательность:

$$P_{\text{Тl}} : P_{\text{К}} : P_{\text{Rb}} : P_{\text{NH}_4} = 2,3 : 1,0 : 0,92 : 0,13.$$

Проводимость калиевых каналов (как и натриевых) блокируется при снижении экстраклеточного рН вследствие протонирования кислотной группы, находящейся в канале. Диаметр узкой части калиевого канала составляет 0,3 нм. Она проницаема для ионов с кристаллическим диаметром от 0,26 (K⁺) до 0,296 нм (Rb⁺, NH₄⁺). Через нее не могут пройти как большие (Cs⁺ — 0,33 нм, ТЭА⁺ — 0,8 нм), так и меньшие (Na⁺ — 0,19 нм, Li⁺ — 0,14 нм) ионы. Ион, проходящий через пору, должен потерять гидратную оболочку, что важно только для взаимодействия дегидратированного иона с зарядами поры. Ион диаметром более 0,33 нм не может войти в пору, а менее 0,26 нм не проникает в нее, поскольку не взаимодействует с атомами кислорода, локализованными в ее стенке. Например, ион калия связывается со всеми пятью атомами кислорода, окружающими просвет поры, а ионы натрия — лишь с двумя. Три других атома кислорода не могут приблизиться к иону натрия из-за ригидности стенки поры, поэтому вход в нее ионов натрия маловероятен.

3.2.5.3. Потенциалзависимый кальциевый канал

Селективное поступление ионов кальция в клетку происходит через потенциалзависимые и лигандозависимые кальциевые каналы. На основании электрофизиологических данных и фармакологических исследований выделены несколько типов потенциалзависимых Ca-каналов, различающихся пороговым уровнем активации, временем жизни в

открытом состоянии, скоростью инактивации, величиной элементарной проводимости и фармакологическими свойствами. Потенциалзависимые кальциевые каналы присутствуют в плазматической мембране практически всех клеток, обладающих электрической возбудимостью (рис. 3.35). Второй тип кальциевых каналов связан с мембранными рецепторами, взаимодействующими в основном с нейромедиаторами и гормонами. Этот класс изучен значительно меньше.

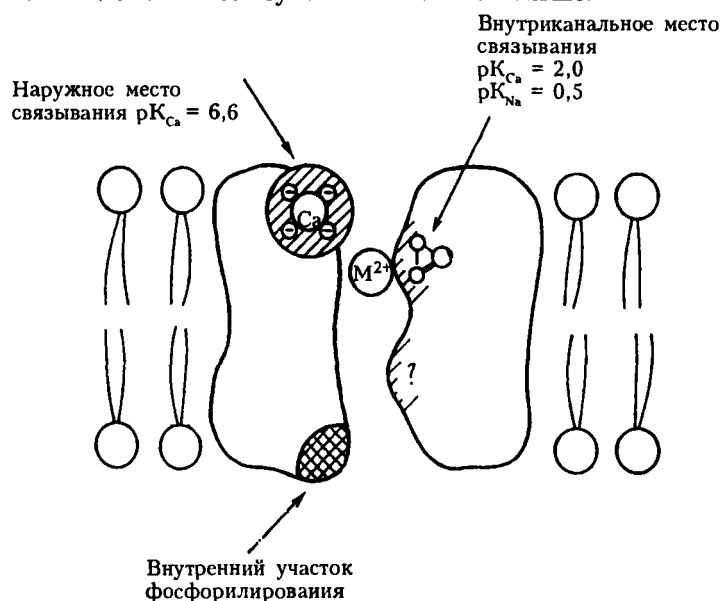


Рис. 3.35. Схематическое изображение участков связывания в кальциевом канале

Рассмотрим основные типы Са-каналов.

Дигидропиридинчувствительные Са-каналы *L*-типа (ДКК). Этот тип Са-каналов хорошо изучен и идентифицирован во многих клетках: нейронах ПНС и ЦНС, клетках сердечной мышцы, гладких мышц и нейронах моллюсков. ДКК играют важную роль в сократительной активности клеток скелетных мышц, активируются при высоких значениях мембранного потенциала (более -10 мВ), характеризуются высокой проводимостью (25 пСм) и медленной кинетикой инактивации. ДКК блокируются кальциевыми антагонистами трех различных групп: верапамилом, нифедипином, а также D-цис-дильтиаземом.

Са-каналы *T*-типа (ККТ) характеризуются при слабой деполяризации быстрой кинетикой инактивации, относительной нечувствительностью к дигидропиридинам и низкой проводимостью для Ba^{2+} . ККТ выделены во многих возбудимых и невозбудимых клетках (фибробласты, В-лимфоциты). Сходство ККТ и ДКК заключается в том, что они

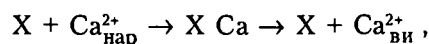
проницаемы для ионов натрия в среде, не содержащей двухвалентных катионов, и блокируются микромолярными концентрациями ионов Са потенциалзависимым образом. ККТ обеспечивают пейсмеккерную активность и вход ионов Са при отрицательных мембранных потенциалах, блокируются тетраметрином, амилоридом и октаполом.

Са-каналы N-типа (ККН). Для ККН характерны активация при высоких потенциалах (более -20 мВ), относительно быстрая инактивация, проводимость (13 пСм), чувствительность к конотоксину и устойчивость к дигидропиридидам. ККН обнаружены в синапсосамах мозга, а также в нейронах коры мозга крыс. Каналы очень чувствительны к блокирующему действию ионов La и по селективным свойствам близки к ДКК. ККН активируются, как правило, при высвобождении медиаторов.

Са-каналы P-типа (ККП), впервые обнаруженные в клетках Пуркинье мозжечка, найдены в нейронах ЦНС и ПНС. Они активируются при потенциалах более чем -50 мВ, имеют очень медленную кинетику инактивации, нечувствительны к дигидропиридидам и конотоксину.

Са-каналы R- и Q-типа (ККРQ). В последнее время идентифицированы два новых типа Са-каналов, активирующихся при высоких мембранных потенциалах. ККРQ найдены в гранулярных клетках мозжечка, нейронах гипоталамуса и коры мозга. ККРQ обладают проводимостью в 15 пСм и высокой чувствительностью к блокирующему действию ионов Ni и конотоксина.

С. Хагивара (S. Hagiwara) и К. Такахаши (K. Takahashi) предположили, что важным промежуточным этапом в механизме проникновения ионов кальция через мембрану является их связывание с определенной структурой кальциевого канала. Переход ионов кальция из наружного раствора внутрь клетки схематически выглядит следующим образом:



где X — место связывания кальция; $Ca_{\text{нар}}^{2+}$ и $Ca_{\text{вн}}^{2+}$ — ионы кальция, находящиеся соответственно снаружи и внутри клетки. Согласно представленной схеме ионы кальция могут проходить через кальциевые каналы только внутрь клетки.

Повышение содержания кальция в наружном растворе вызывает увеличение кальциевого тока только в определенных пределах. Через кальциевые каналы достаточно легко проходят ионы Sr и Ba. Токи, переносимые ионами бария, нередко превышают кальциевые токи. Ионы бария обладают также способностью подавлять калиевые токи, поэтому в присутствии Ba^{2+} более четко выделяются токи, идущие по кальциевым каналам. Для кальциевых каналов плазматической мембраны гигантских мышечных волокон морского желудка характерно следующее соотношение токов при эквимолярных концентрациях ионов в наружном растворе:

$$I_{Ca} : I_{Sr} : I_{Ba} = 1,00 : 1,05 : 1,30.$$

Многие двухвалентные ионы подавляют токи, текущие по кальциевым каналам. Основу такого действия составляет конкурентное связывание кальциевым каналом блокирующих ионов. С ионами кальция конкурируют ионы лантана. По данным С. Хагивары и К. Такахаша, по способности связываться с кальциевыми каналами мембран мышечных волокон морского желудя катионы располагаются следующим образом:



Ионы Ni, Cd, Co и Mn широко используются в качестве блокаторов Са-каналов. При изучении свойств кальциевых каналов нейронов моллюсков П. Г. Костюк и О. А. Крышталь обнаружили, что в бескальциевом растворе, содержащем кальциевые хелаторы этиленгликольтетраацетат или этилендиаминтетраацетат, происходит модификация кальциевых каналов. Последние, сохраняя свою потенциалзависимость для ионов Са, приобретают способность пропускать ионы Na. Обнаруженный феномен объясняется устранением селективного фильтра кальциевых каналов, благодаря чему в них могут проникать ионы натрия. Аналогичные результаты были получены на других возбудимых клетках — кардиомиоцитах сердца лягушки.

Инактивация кальциевых каналов представляет собой более сложный процесс, чем в случае натриевых каналов. Наряду с потенциалзависимой инактивацией в некоторых клетках отмечается инактивация, зависящая от силы входящего в клетку кальциевого тока, что рассматривается как результат повышения внутриклеточного уровня ионизированного кальция.

3.2.6. СИНТЕЗ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Синтез мембранных белков, в частности ионных каналов, а также секретируемых клеткой белков происходит в эндоплазматическом ретикулуме. Синтезированные белки проникают в цистерны эндоплазматического ретикулума, а затем, поступив в полость комплекса Гольджи, подвергаются ковалентным модификациям, в результате которых приобретают конечную форму. Известно, что одной из главных функций последнего является сортировка белков. Синтез ионных каналов осуществляется в комплекс Гольджи нейрона, а затем они транспортируются в аксон, дендриты и нервные окончания.

Динамический характер популяции ионных каналов формирует изменения возбудимости, происходящие в период эмбрионального развития или после денервации нерва. Для скелетных мышечных волокон позвоночных характерно наличие холинорецепторов (ионных каналов, управляемых ацетилхолином) только в области синапсов (концевых пластинок). После денервации скорость синтеза холинорецепторов увеличивается и они распространяются по всей поверхности мы-

шечного волокна, а не только в области концевой пластинки, как до денервации. В открытом состоянии эти каналы имеют меньшую проводимость и большее время жизни, чем в норме. Кроме того, в плазматической мембране появляются натриевые каналы, которые в 1 000 раз менее чувствительны к ТТХ, чем нормальные. Воротные процессы в них протекают значительно медленнее (подобными свойствами обладают холинорецепторы и натриевые каналы культуры периннервированных эмбриональных мышц). После реиннервации холинорецепторы, расположенные вне синапсов, исчезают, как и натриевые каналы, мало чувствительные к ТТХ.

3.2.7. ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЕ ПРОВЕДЕНИЯ ВОЗБУЖДЕНИЯ

В настоящее время установлено, что генерация ПД и его проведение по нервным волокнам (как и другим специализированным возбудимым клеткам) не требуют непосредственного расхода энергии АТФ. Механизмы распространения возбуждения относительно независимы от метаболизма, который главным образом обеспечивает процессы восстановления и поддержания готовности к возбуждению. Нерв, находящийся в состоянии покоя, потребляет около половины энергии от той, которую он использует при максимальном РВ. Первые сведения о том, что работа возбудимых образований связана с затратами энергии, получены еще в начале XX в. Так, в 1913 г. было установлено, что при проведении нервом возбуждения выделяются углекислый газ и аммиак. В 1920-х гг. Р. В. Джерард (R. W. Gerard) и другие исследователи собрали сведения о метаболизме макроэргических фосфатов в нервных проводниках. Так, при длительной ритмической стимуляции уровень АТФ и креатинфосфата в нерве лягушки снижается примерно в два раза. Было обнаружено также изменение соотношения разных макроэргических фосфатов и получены доказательства связи этих изменений с характером и объемом выполняемой нервом работы (частота, продолжительность РВ и т. п.).

Исключительно большое значение в исследовании метаболизма возбудимых образований имеют публикации А. Хилла (A. Hill) и его учеников, посвященные измерению теплопродукции нерва. Установлено, что при возбуждении она проходит две стадии. Так называемое начальное тепло выделяется во время проведения возбуждения или сразу после ПД, что составляет всего 1/30 часть общей теплопродукции. При восстановлении МП после РВ теплота, постепенно уменьшаясь, выделяется примерно еще час.

Начальное теплообразование изучено подробнее, чем теплообразование восстановления. Так, на нерве краба доказано, что изменение начального тепла происходит в две фазы:

- повышение температуры нерва на 10^{-5} °C;
- понижение температуры на $8 \cdot 10^{-6}$ °C.

Таким образом, за один импульс температура повышается на

$2 \cdot 10^{-6}^{\circ}\text{C}$. На миелиновых нервах двухфазность выделения тепла наблюдать не удастся, а на вегетативных это возможно лишь при условии охлаждения первого волокна.

Более четкие данные о потреблении энергии нервом в состоянии покоя были получены М. Березиной в 1932 г. Нерв краба в покое при температуре 20°C в присутствии O_2 высвобождает энергию, равную $9 \cdot 10^{-2}$ Дж/г·с. При возбуждении, вызванном непрерывным раздражением того же нерва с максимальной частотой, количество выделяемого тепла возрастает в два раза. Эти данные долго не получали объяснения, и лишь сравнительно недавно было установлено, что в нервах краба от 50 до 90 % энергии метаболизма используется на работу Na-насоса, «откачивающего» из клетки ионы Na. Впоследствии К. М. Коннелли (С. М. Connolly) удалось доказать, что в покое нерв поглощает кислород, что также свидетельствует об активных метаболических процессах, происходящих в нем в этом состоянии (рис. 3.36).

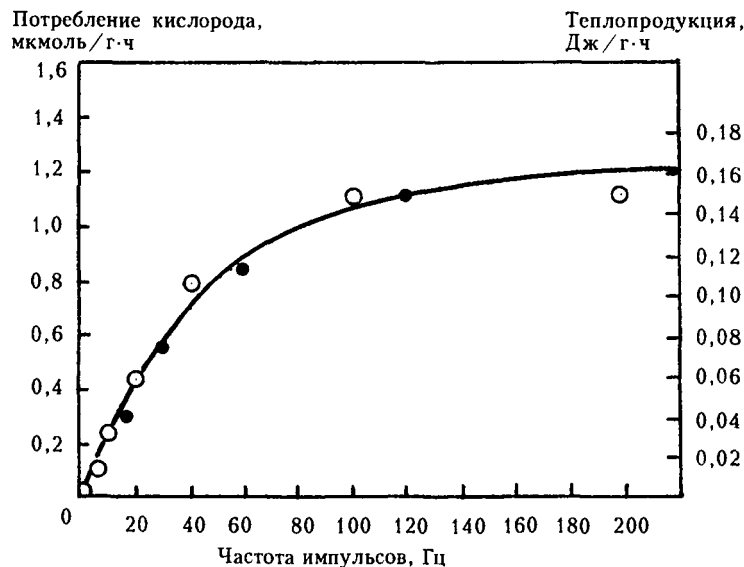


Рис. 3.36. Зависимость потребления кислорода (○) и теплопродукции (●) в седалищном нерве лягушки от частоты ритмического возбуждения

При анализе данных по энергетическому метаболизму нервов становится ясно, что существует корреляция между изменениями теплопродукции, потребления кислорода, содержанием и гидролизом макроэргов. Оказалось, что повышение функциональных возможностей нервов в эволюции происходит при одновременном снижении энергетических затрат на выполнение идентичной работы. Еще в первых публикациях, посвященных метаболизму нерва, отмечалось, что при переходе к более интенсивной работе (например, к более высоким ритмам

возбуждения) расход кислорода, макроэргических фосфатов или теплопродукция в пересчете на один ПД снижаются.

Следовательно, параллельно с волной электрических и электрохимических обратимых процессов, связанных с изменением уровня поляризации плазматической мембраны, распространяется волна структурно-метаболических изменений. На очереди у исследователей стоит расшифровка на молекулярном и субмолекулярном уровнях связи метаболизма и структурных (конформационных) изменений в мембране.

Биохимические процессы, поставляющие возбудимым клеткам энергию, не отличаются от таковых для живых клеток вообще. Основным источником энергии служит АТФ, а первичной реакцией, обеспечивающей работу, является ферментативное расщепление аденозинтрифосфата (рис. 3.37):

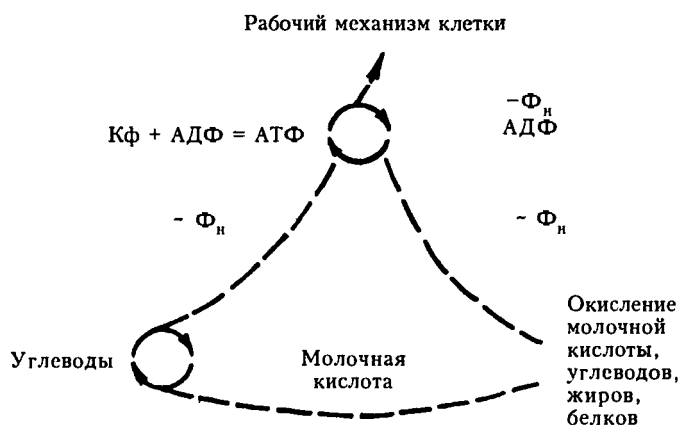
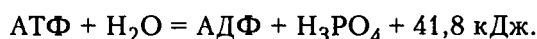


Рис. 3.37. Схема метаболизма, обеспечивающего энергией рабочий механизм клетки; пунктиром показан перенос энергии

Ресинтез АТФ может осуществляться анаэробным и аэробным путями. При недостатке кислорода энергию можно получить из креатинфосфата (у позвоночных) или из аргининфосфата (у большинства беспозвоночных), а также путем обогащения неэнергетизированных фосфатных связей за счет энергии, высвобождающейся в ходе ферментативного расщепления углеводов. Креатинфосфат и аргининфосфат содержат макроэргическую связь в готовом виде.

Открытие Дж. Скоу в 1957 г. Na, K-АТФ-азы способствовало пониманию роли метаболизма в процессах биоэлектrogenеза и расшифровке функции биологических мембран. Хотя конкретных результатов получено недостаточно, как мы уже убедились при выяснении роли

ионных каналов, некоторые факты заслуживают пристального внимания.

Окислительное фосфорилирование (основной источник макроэргических фосфатов) связано с митохондриями, которые в аксонах осуществляют синтез АТФ и регулируют ионный состав аксоплазмы. Контроль за содержанием АТФ в аксоне проводит и Na, K-АТФ-аза. Известно, что активация Na, K-АТФ-азы увеличивает содержание в клетке АДФ и Φ_n , что в свою очередь стимулирует окислительное фосфорилирование и поглощение кислорода. Детально механизм взаимосвязи работы митохондрий и АТФ-азы пока не изучен, но известно, что митохондрии скапливаются в местах с высокой активностью АТФ-азы (например, в области перехвата Ранвье во время возбуждения).

Установлено, что при ритмическом возбуждении характер электронно-транспортных процессов меняется. В опытах Б. Чанса (B. Chance) регистрировались изменения флуоресценции восстановленного НАД·Н₂ в зависимости от характера функционирования нерва. Обнаружено, что в начале РВ уровень флуоресценции снижается, а по окончании — возвращается к исходному значению. В связи с участием митохондрий в энергообеспечении РВ внимания заслуживают исследования корреляции между изменениями сигнала ЭПР и РВ нерва.

Следует отметить, что об энергетическом обеспечении клеточных процессов известно довольно много. Значительно меньше сведений о структурных перестройках в мембранах в результате их разнонаправленного функционирования; в частности, представления о конформационных изменениях в ионных каналах пока остаются гипотетическими. Поэтому представляют интерес данные П. Г. Костюка и других ученых о кальциевых каналах. Установлено, что наряду с обычными потенциалзависимыми Са-каналами существует другая их разновидность — каналы, непосредственно связанные с метаболизмом. В последние годы обнаружено, что циклический аденозин 365-монофосфат оказывает первичное действие на воротный механизм кальциевого канала в мембране сердечной мышцы за счет фосфорилирования его компонентов. Если эти данные будут уточнены и расшифрованы, то можно будет утверждать, что кальциевые каналы существенно отличаются от ранее идентифицированных натриевых и калиевых каналов. Для Na- и K-каналов метаболизм лишь предоставляет энергию электрохимического градиента. Что касается Са-канала, то его функционирование требует фосфорилирования белка, и если оно нарушается, канал теряет способность переходить в активное состояние. Эту особенность Са-каналов можно объяснить участием ионов кальция практически во всех внутриклеточных процессах — регуляции синтеза ряда важных для клетки веществ, их внутриклеточном транспорте, выделении и т. д. Возможно, именно поэтому существует обратная связь — поступление или выход кальция должны зависеть от внутриклеточных процессов.

3.3. КЛЕТОЧНАЯ РЕЦЕПЦИЯ

3.3.1. КЛЕТОЧНАЯ ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕЦЕПЦИЯ

Гормоны, нейромедиаторы и другие агонисты способны быстро и обратимо активировать такие процессы, как сократимость, секреция, энергетический обмен, изменения мембранного потенциала и т. д. На базе фармакологических данных еще в начале прошлого века установлено, что многие гормоны взаимодействуют с определенными рецепторами на наружной стороне клеточной мембраны. Однако дальнейший ход клеточных процессов при рецепции был непонятен. Крупнейшее открытие в этой области было сделано Э. У. Сазерлендом (E. W. Sutherland), который обнаружил, что при стимуляции гликогенолиза глюкагоном внутри клеток печени образуется термостабильное соединение, способное активировать энергетический обмен клетки. Позже это соединение было идентифицировано как цАМФ. Впоследствии была выдвинута гипотеза, согласно которой гормоны осуществляют регуляцию внутриклеточных процессов путем активации синтеза так называемых вторичных мессенджеров, или посредников. Первым из описанных вторичных посредников был цАМФ, позже были обнаружены цГМФ и инозитол-1,4,5-трифосфат.

Принципиально иной механизм, с помощью которого может передаваться и усиливаться сигнал от агонистов, заключается в рецепторозависимой активации ионных каналов плазматической мембраны клетки. Такого рода регуляция была описана только для электровозбудимых клеток (нейрон, мышечная клетка), но оказалось, что она имеет универсальный характер. Еще один способ передачи гормонального сигнала заключается в том, что рецепторы некоторых агонистов являются ферментами. При этом их регуляторный центр — участок связывания агониста — находится с наружной стороны клетки, а каталитический центр обращен в сторону цитоплазмы. По такому механизму действуют многие факторы роста, рецепторы которых являются протеинкиназами, и предсердный натрийуретический пептид, рецептор которого — гуанилатциклаза. Существуют и другие пути передачи сигнала. Так, рецепторы стероидных гормонов и тироксина переносят гормон в клеточное ядро.

Остановимся на основных типах гормональной коммуникации и клеточных рецепторов.

Типы гормональной коммуникации клеток:

- эндокринная, когда гормоны разносятся по всему организму;
- паракринная, когда гормоны переносятся на расстояние не более 1 мм;
- синаптическая, когда гормоны переносятся на расстояние не более 5 нм.

В настоящее время в клетках различают три основных типа мембранных рецепторов:

- рецепторы факторов роста;
- рецепторы сопряжения с G-белками;
- каналобразующие рецепторы (АХР и др.).

Представленные типы рецепторов различаются по основным классам: ацетилхолиновый, катехоламиновый, опиатный, ГАВА-рецептор, глициновый, глутаматный, серотониновый.

Клеточные мембраны содержат специфические белки-рецепторы, которые при активации выполняют ряд функций:

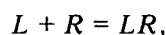
- узнавание лиганда;
- инициация первой стадии клеточного ответа;
- открывание ионного канала;
- продуцирование вторичного мессенджера (цАМФ), который наряду с ферментом (протеинкиназой) регулирует ионный транспорт и клеточный метаболизм.

Специфичность рецептора обеспечивается следующими свойствами:

- насыщение молекулы рецептора при физиологических концентрациях лиганда;
- локализация рецептора только в клетках, где проявляется его биологическое действие;
- селективность рецептора (лиганд специфичен к определенному участку молекулы рецептора).

Процесс рецепции гормонов разделяют на четыре стадии.

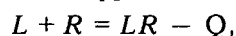
1. Диффузия гормона к рецептору.
2. Связывание гормона и рецептора:



где L – лиганд; R – рецептор; LR – комплекс. Константа связывания может быть порядка $K = 10^8 - 10^{11}$ моль $^{-1}$.

3. Латеральная диффузия рецептора в мембране сквозь белковые кластеры и фосфолипидные домены (теория перколяций).

4. Наличие внутриклеточных посредников (цАМФ и ионы Ca). Так, процесс взаимодействия рецептора и гормона, как правило, описывают с помощью теории «занятости» и гипотезы «плавающего центра». Согласно теории «занятости» реакция взаимодействия гормона и рецептора описывается с помощью уравнения



где Q – биологический эффект. Константа связывания

$$K = [R][L]/[RL] \text{ и } Q/Q_{\max} = [RL]/R_0,$$

где R_0 – общая концентрация рецептора в мембране клетки.

Рассмотрим особенности гормональной регуляции на примере специфических и неспецифических межклеточных взаимодействий в нервной системе (аксоглиальные взаимодействия и синапсы). Одной из главных функций шванновской клетки является регуляция кон-

центрации межклеточного K^+ при РВ аксона, которая модифицирует не только возбудимость соседних нейронов, но и процессы дыхания, гликолиз, синтез ДНК и белков в глиальных клетках. Изменения уровня межклеточного K^+ и глутамата стимулируют вход Ca^{2+} в ШК через Ca -канал и NMDA-глутаматный рецептор, что стимулирует ШК к экзоцитозу ацетилхолина, связывание его с никотиновым ацетилхолиновым рецептором ШК, активацию аденилатциклазы, фосфолипаз, протеаз и гиперполяризацию плазматической мембраны ШК. Таким образом, при РВ аксона плазматическая мембрана ШК сначала деполяризуется, а затем наступает фаза быстрой гиперполяризации.

В последнее время особый интерес представляет вопрос о функциональной роли секреции определенных веществ из ШК при РВ. Известно, что при накоплении межклеточного калия из глиальных клеток выходит гамма-аминомасляная кислота, а увеличение межклеточной концентрации глутамата вызывает не только гиперполяризацию плазматической мембраны ШК, но и экзоцитоз АХ. Следовательно, сложившиеся представления о неспецифическом характере передачи сигнала между нейроном и глиальной клеткой, а также генерализованном влиянии глии на нервную клетку претерпевают существенные изменения. Одним из механизмов передачи сигнала от нейрона к глии являются перераспределение и вход Ca^{2+} в ШК в ответ на накопление межклеточного K^+ , глутамата и АХ. Так, блокирование электрической активности нейрона при действии ТТХ приводит к снижению концентрации межклеточного K^+ , ингибированию входа и регулярных колебаний уровня внутриклеточного Ca^{2+} соседних астроцитов. Последнее может быть также связано с отсутствием изменений содержания межклеточного глутамата. Действительно, при экстраклеточном действии глутамата на астроциты обнаружены не только увеличение входа, но и функционально зависимые колебания внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . В исследованиях на нервных волокнах показано, что действие специфического блокатора глутаматного рецептора снимает обратимую гиперполяризацию ШК; при действии на нервное волокно тубокурарина обнаружена деполяризация мембраны ШК, а совместное действие блокатора и тубокурарина нивелирует данный эффект. Известно, что выход АХ из ШК и связывание его с АХР, локализованным на плазматической мембране ШК, активируют внутриклеточную аденилатциклазу и в конечном счете приводят к гиперполяризации плазматической мембраны ШК. И наконец, обнаружено наличие связи между фосфорилированием и числом АХР: форсколин и другие агенты, повышающие уровень внутриклеточного цАМФ, увеличивали количество АХР фибробластов мыши.

Возбуждение аксона приводит к росту числа АХР шванновской клетки и зависит от частоты ритмического возбуждения, уровня межклеточной концентрации K^+ , Ca^{2+} и ацетилхолина. При РВ снижается активность ацетилхолинэстеразы аксона, что способствует поддержанию высокой концентрации межклеточного АХ. Обнаружено, что уве-

лишение межклеточной концентрации АХ активирует фосфоинозитид-специфичную фосфолипазу С миелинового нервного волокна. Предполагается, что при РВ аксона деполяризация K^+ и экзоцитоз АХ активируют вход Ca^{2+} по Са-каналам, что вызывает фосфорилирование АХР ШК посредством стимуляции ФИ-ФЛС.

Синапс. Нервные импульсы должны передаваться от одной клетки к другой. В месте этой передачи находятся специальные контактные области — синапсы. Аксон может быть связан с сомой второй клетки через аксосоматический синапс; имеются также аксодендритные и аксо-аксональные синапсы. Передача сигнала от клетки к клетке может осуществляться либо путем прямого прохождения ПД (электрический синапс), либо с помощью специальных молекул — нейромедиаторов (химический синапс). В связи с интересом к клеточной рецепции мы более подробно рассмотрим химический синапс (рис. 3.38).

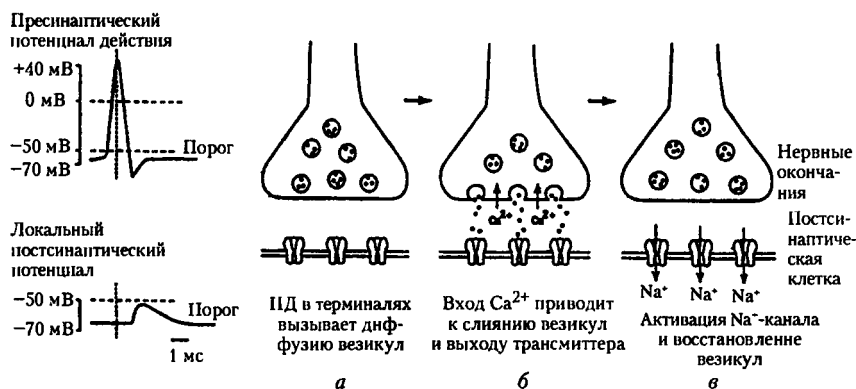


Рис. 3.38. Схема передачи транмисмиттера в синаптической щели и изменения мембранного потенциала на пресинаптической и постсинаптической мембране: а — нервный импульс достигает пресинаптической мембраны; б — ионы Са входят и вызывают слияние везикул и выход нейротрансмисмиттера в синаптическую щель; в — активация каналов, вход ионов натрия и восстановление везикул

Химический синапс состоит из нервного окончания на пресинаптической стороне и специализированной области на поверхности клетки, принимающей сигнал. Пре- и постсинаптические мембраны находятся на расстоянии 20 — 40 нм друг от друга. Синаптическая щель заполнена олигосахаридсодержащей соединительной тканью — базальной мембраной, которая представляет собой структуру, объединяющую отдельные клетки. Когда ПД достигает нервного окончания, он вызывает деполяризацию пресинаптической мембраны и высвобождение медиатора. Последний диффундирует через синаптическую щель к постсинаптической мембране, что ведет к изменению ее ионной проницаемости и, следовательно, мембранного потенциала. Это в свою очередь приво-

дит к генерации ПД. Перечислим основные процессы, происходящие при функционировании синапса:

- 1) синтез медиатора (например, ацетилхолина);
- 2) загрузка медиатора в везикулу; в том случае, когда первая и вторая стадии протекают в перекарионе, происходит аксоплазматический транспорт везикулы к нервному окончанию;
- 3) слияние везикул с пресинаптической мембраной при деполяризации и высвобождение медиатора (экзоцитоз);
- 4) диффузия медиатора к постсинаптической мембране;
- 5) узнавание медиатора и связывание его со специфическим рецептором, например с мембранным белком постсинаптической мембраны, сопровождающееся действием медиатора на ионный канал или фермент постсинаптической мембраны;
- 6) инактивация медиатора, которая приводит к ограничению длительности пресинаптического сигнала. Такая инактивация происходит либо путем ферментативной деградации медиатора, либо путем его обратного поглощения пресинаптической мембраной.

Цикл завершается и возвращается ко второй стадии (или к первой, если клетка поглощает продукт деградации инактивированного медиатора).

3.3.2. КЛЕТОЧНАЯ ФОТОРЕЦЕПЦИЯ

3.3.2.1. Зрение

Зрительный процесс включает много стадий: энергия света улавливается, превращается в нервный импульс, передается и интегрируется. Только первые стадии можно описать как исключительно молекулярные процессы, но они не представляют собой зрения в смысле восприятия изображений.

Первая стадия (поглощение света). Световые сигналы воспринимаются специальными клеточными структурами (фоторецепторами) и затем передаются в ЦНС. Фоторецепторами зрительных сигналов являются специализированные клетки (палочки и колбочки) сетчатки глаза, расположенной на дне глазного яблока. А. Хехт показал, что один фотон может запустить нервный импульс, а Г. Вальд — что для циклического процесса фоторецепции необходим витамин А (родопсин). Родопсин состоит из белка опсина и связанного с ним хромофора, являющегося альдегидной формой витамина А (ретиноль); соотношение этих составных частей в молекуле родопсина 1 : 1. И палочки, и колбочки, несмотря на разные спектры поглощения, содержат в родопсине один и тот же ретиноль. Главная стадия фоторецепции состоит в использовании энергии поглощенного света для изомеризации ретиналя: 11-*цис*-ретиноль переходит в *транс*-ретиноль, что приводит к дестабилизации комплекса и его гидролизу до ретиналя и опсина. Таким

образом, поглощение света вызывает конформационные изменения белка посредством изомеризации ретиналя. Регенерация нативного родопсина (цикл Вальда) осуществляется за счет ферментативного восстановления ретиналя до ретинола с его последующей изомеризацией, окислением до 11-*цис*-ретиналя и рекомбинацией до родопсина (процесс идет в темноте).

Вторая стадия (трансдукция). Рассмотрим один из двух фоторецепторов позвоночных — палочки. Колбочки, ответственные за цветовое зрение, исследованы меньше. Палочки выполняют функцию распознавания контрастов яркости и участвуют в зрении главным образом при слабом освещении. Глаз человека содержит около $120 \cdot 10^6$ палочек и $6,5 \cdot 10^6$ колбочек. Палочка состоит из наружного и внутреннего сегментов. Во внутреннем сегменте расположены митохондрии, которые обеспечивают метаболическую активность клетки, и клеточное ядро. Наружный сегмент содержит стопку бислойных мембран (1 000 — 2 000 стопок на палочку), называемых дисками, в которые встроены молекулы родопсина. Родопсин — гликопротеин, содержащий 14 ковалентно связанных остатков моносахаридов, нерастворим в воде и при действии мягких детергентов может быть отделен от своего липофильного окружения в мембране. Родопсин представляет собой интегральный белок, который вслед за поглощением фотона света меняет мембранный потенциал клетки. Гиперполяризация мембраны палочки при поглощении света называется рецепторным потенциалом. Изменения мембранного потенциала обусловлены инактивацией около 1 000 натриевых каналов. Отметим, что гиперполяризация клетки наблюдается только у позвоночных, у беспозвоночных, напротив, происходит деполяризация мембраны клетки. Предполагают, что родопсин регулирует проницаемость натриевых каналов плазматической мембраны клеток палочек с помощью мессенджеров, таких, как Ca^{2+} и цГМФ. Установлено, что Са-АТФ-аза является компонентом мембранных дисков. Как предполагается в одной из моделей Хагинса, падающий свет может открывать и Са-каналы, хотя участие в данном процессе родопсина практически не исследовано.

Основную роль (в качестве мессенджера) играет цГМФ, который поддерживает натриевые каналы мембран палочек в открытом состоянии. Действительно, в связи с этим становятся понятными факты наличия в клетке светозависимой фосфодиэстеразы, расщепляющей цГМФ. Согласно гипотезе Страейера, этот фермент активируется белком, названным трансдуцином. Именно комплекс трансдуцин — гуанозинтрифосфат активирует фосфодиэстеразу.

Третья стадия (интегрирование нервных импульсов). На данной стадии рецепторный потенциал должен превратиться в нервный импульс. Зрительная система представляет собой иерархию стадий обработки, на которых световой стимул дополняется все большим количеством информации. Реакция фоторецепторов прямо пропорциональна количеству падающего света (но в ганглионарных клетках сетчатки

контролируется не интенсивность, а световой контраст) и обусловлена двумя особенностями сетчатки:

1) сетчатка имеет трехслойную структуру и состоит из рецепторных, биполярных и ганглионарных клеток, между которыми расположены клетки других типов (амакриновые и горизонтальные);

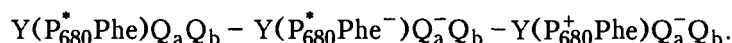
2) она обладает высокой степенью конвергенции: многочисленные световые сигналы, проходя через две промежуточные стадии, сливаются в одной ганглионарной клетке; когда каждая ганглионарная клетка получает сигнал, то запускается другая группа рецепторов (рецептивное поле), состоящая из центра, освещение которого возбуждает ганглионарную клетку, и концентрического кольца клеток, ингибирующих это возбуждение.

3.3.2.2. Фотосинтез

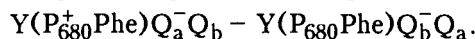
Фоторецепция света — основная реакция процесса фотосинтеза. В хлоропластах высших растений имеются две фотосистемы — *фотосистема 1* (ФС1) и *фотосистема 2* (ФС2), различающиеся по составу белков и пигментов. Светособирающая антенна ФС1 поглощает свет с длиной волны 700 — 730 нм, а ФС2 — 680 — 700 нм. Индуцированное светом окисление реакционных центров двух фотосистем сопровождается их обесцвечиванием, которое характеризуется изменениями спектров поглощения. Две фотосистемы связаны посредством цепи электронных переносчиков (рис. 3.39).

ФС2 является источником электронов для ФС1. Индуцируемое светом разделение зарядов в фотореакционных центрах обеспечивает перенос электрона от воды, разлагаемой в ФС2, к конечному акцептору электрона — молекуле НАДФ⁺. Цепь электронного транспорта, соединяющая две фотосистемы, в качестве переносчиков электрона включает в себя молекулы пластохинона, отдельный электрон-транспортный белковый комплекс (так называемый b/f-комплекс) и водорастворимый белок пластоцианин (Pc).

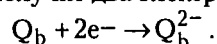
В ФС2 от возбужденного центра P₆₈₀^{*} электрон переносится сначала на первичный акцептор феофетин (Phe), а затем на молекулу пластохинона Q_a, прочно связанную с одним из белков ФС2:



Затем электрон переносится на вторую молекулу пластохинона Q_b, а P₆₈₀⁺ получает электрон от первичного донора Y:



Молекула пластохинона, химическая формула которой и ее расположение в БЛМ показаны на рис. 3.40, способна принять два электрона. После двукратного срабатывания реакционного центра ФС2 молекула пластохинона Q_b получит два электрона:



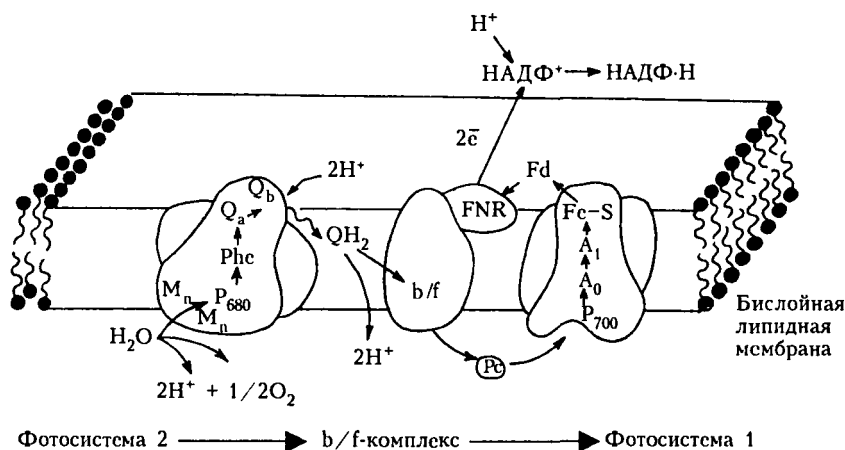


Рис. 3.39. Расположение электрон-транспортных комплексов (ФС1, ФС2 и b/f-комплекса) и их взаимодействие в тилакоидной мембране. В состав ФС1 входят: Ps — пластоцианин, P₇₀₀ — энергетическая ловушка и реакционный центр, первичный акцептор электрона — молекула хлорофилла (A₀), вторичные акцепторы — молекула филлохинона (A₁) и три переносчика белковой природы (ферредоксин), у которых в активном центре находятся атомы железа и серы. В состав ФС2 входят: фотореакционный центр P₆₈₀, первичный акцептор — феофетин (Phe), вторичные акцепторы — молекулы пластохинона (Q_a и Q_b) и водорасщепляющий комплекс. В переносе электрона от акцепторов ФС1 к НАДФ⁺ участвуют растворенный в строме белок ферредоксин (Fd) и связанный с мембраной специальный электрон-транспортный комплекс ферредоксин-НАДФ⁺-редуктаза (FNR), функционирующие на внешней стороне тилакоидной мембраны. При восстановлении одной молекулы НАДФ⁺ до НАДФ·Н на нее переносятся два электрона и один ион водорода, который захватывается из стромы

Отрицательно заряженная молекула Q²⁻ обладает высоким сродством к протонам, которые она захватывает из стромального пространства. После протонирования восстановленного пластохинона Q_b²⁻ (Q_b²⁻ + 2H⁺ → Q_bH₂) образуется электрически нейтральная форма этой молекулы, которая называется пластохинолом. Пластохинол выполняет роль подвижного переносчика двух электронов и двух протонов: покинув ФС2,

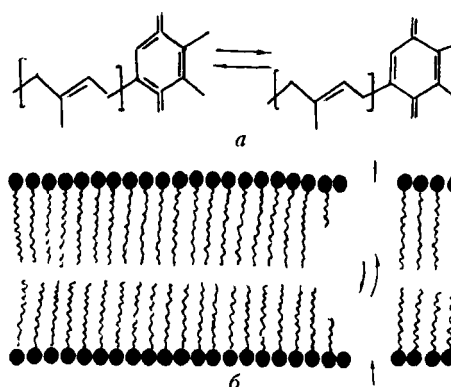
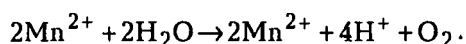


Рис. 3.40. Окислительно-восстановительные превращения пластохинона (a) и предполагаемая схема его расположения в мембране (б)

молекула QH_2 может легко перемещаться внутри тилакоидной мембраны, обеспечивая связь ФС2 с другими электрои-транспортными комплексами. Окислительный реакционный центр ФС2 обладает исключительно высоким сродством к электрону, т. е. является очень сильным окислителем. Благодаря этому в ФС2 происходит разложение воды — химически устойчивого соединения. Входящий в состав ФС2 водорасщепляющий комплекс содержит в своем активном центре группу ионов марганца, которые служат донорами электронов для P_{680}^+ . Отдавая электроны окисленному реакционному центру P_{680}^+ ионы марганца становятся «накопителями» положительных зарядов, непосредственно участвующих в реакции окисления воды. В результате последовательного четырехкратного срабатывания реакционного центра в Mn-содержащем активном центре ВРК накапливаются четыре сильных окислительных эквивалента (или четыре «дырки») в форме окисленных ионов марганца, которые, взаимодействуя с двумя молекулами воды, катализируют реакцию ее разложения:



Таким образом, в результате последовательной передачи электронов от ВРК к P_{680}^+ происходит синхронное разложение сразу двух молекул воды, сопровождающееся выделением одной молекулы кислорода и четырех протонов, которые диффундируют во внутритилакоидное пространство хлоропластов.

Образовавшаяся при функционировании ФС2 молекула пластохинона QH_2 диффундирует внутри липидного бислоя тилакоидной мембраны к b/f-комплексу. При столкновении с комплексом она связывается с ним, а затем передает ему два электрона. При этом для каждой молекулы пластохинола, окисляемой комплексом, внутрь тилакоида выделяются два протона. В свою очередь комплекс служит донором электронов для пластоцианина — сравнительно небольшого водорастворимого белка, у которого в состав активного центра входит ион меди (реакция восстановления и окисления пластоцианина сопровождается изменением валентности иона меди). Пластоцианин выполняет роль связующего звена между b/f-комплексом и ФС1. Молекула пластоцианина быстро перемещается внутри тилакоида, обеспечивая перенос электрона от b/f-комплекса к ФС1. От восстановленного пластоцианина электрон поступает непосредственно к окислительным центрам ФС1. Таким образом, в результате совместного действия ФС1 и ФС2 два электрона от молекулы воды, разлагаемой в ФС2, через цепь электронного транспорта переносятся на молекулу НАДФ^+ , обеспечивая образование сильного восстановителя $\text{НАДФ}\cdot\text{H}$.

Зачем хлоропластам нужны две фотосистемы? Известно, что фотосинтезирующие бактерии, которые используют в качестве донора электрона для восстановления окисленных реакционных центров различные органические и неорганические соединения (например, H_2S),

успешно функционируют с одной фотосистемой. Дело в том, что энергии одного кванта видимого света недостаточно для эффективного прохождения электроном всего пути по цепи молекул-переносчиков от воды к НАДФ⁺.

Приблизительно 3 млрд лет назад на Земле появились цианобактерии, которые приобрели способность использовать воду в качестве источника электронов для восстановления углекислоты. В настоящее время считается, что ФС1 ведет свое происхождение от зеленых бактерий, а ФС2 — от пурпурных. После того как в ходе эволюции ФС2 «включилась» в единую ЦЭТ вместе с ФС1, стало возможным преодолеть довольно большую разницу окислительно-восстановительных потенциалов пар кислород — вода и НАДФ⁺ — НАДФ·Н.

Перенос электронов по ЦЭТ, как правило, сопровождается снижением энергии. Этот процесс можно уподобить самопроизвольному движению тела по наклонной плоскости. Уменьшение уровня энергии электрона в ходе его движения вдоль ЦЭТ не означает, что перенос электрона является энергетически бесполезным процессом. В нормальных условиях функционирования хлоропластов большая часть энергии, выделяющейся в ходе электронного транспорта, не пропадает бесполезно, а используется для работы специального энергообразующего комплекса клетки, называемого АТФ-синтетазой. Этот комплекс катализирует энергетически невыгодный процесс образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата, в связи с чем принято говорить, что энергодонорные процессы электронного транспорта сопряжены с энергоакцепторными процессами синтеза АТФ.

Важную роль в обеспечении энергетического сопряжения в мембранах тилакоидов, как и во всех остальных энергообразующих оргanelлах (митохондриях, хромофоры и т. д.), играют процессы протонного транспорта. Синтез АТФ тесно связан с переносом через АТФ-синтазу трех протонов из тилакоидов в строму. Этот процесс становится возможным потому, что из-за асимметричного расположения переносчиков в мембране функционирование ЦЭТ хлоропластов приводит к накоплению избыточного количества протонов внутри тилакоида: ионы водорода поглощаются снаружи на стадиях восстановления НАДФ⁺ и образования пластохинола и выделяются внутри тилакоидов на стадиях разложения воды и окисления пластохинола (см. рис. 3.39). Освещение хлоропластов приводит к увеличению концентрации протонов внутри тилакоидов в 100 — 1 000 раз.

Итак, мы рассмотрели цепь событий, в ходе которых энергия света запасается в форме энергии высокоэнергетических химических соединений — АТФ и НАДФ. Эти продукты световой стадии фотосинтеза используются в темновых стадиях для образования органических соединений из углекислого газа и воды. Основные этапы преобразования энергии включают следующие процессы:

- 1) поглощение энергии света пигментами светособирающей антенны;

- 2) перенос энергии возбуждения к фотореакционному центру;
- 3) окисление фотореакционного центра и стабилизация разделенных зарядов;
- 4) перенос электрона по цепи электронного транспорта, образование НАДФ·Н;
- 5) трансмембранный перенос протонов;
- 6) синтез АТФ.

3.4. КЛЕТОЧНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ

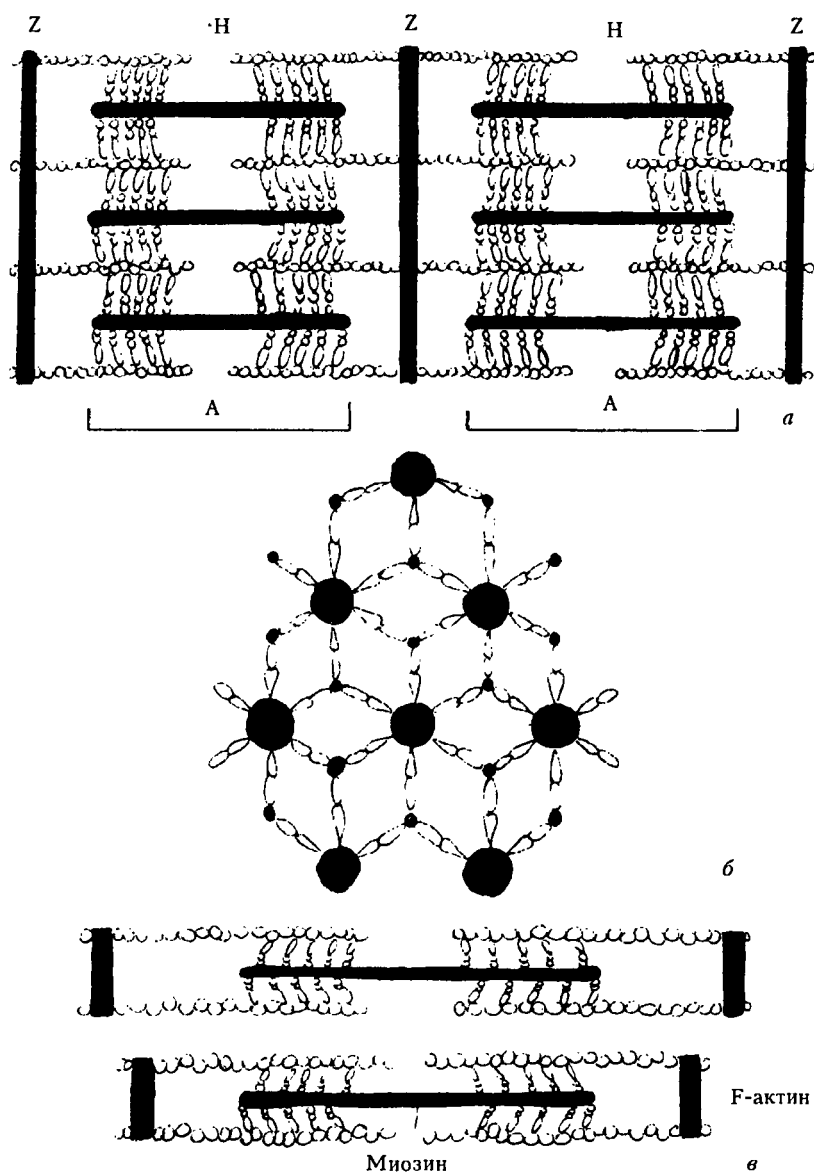
Среди механохимических преобразователей энергии, распространенных в клетке, исключительную роль играют клеточные белки, которые движутся вдоль полимерных путей, используя в качестве источника энергии молекулы АТФ. К таким системам относятся белки актомиозинового комплекса, входящего в состав сократительного аппарата мышц. Движение клеточных выростов, микроворсинок (жгутиков и ресничек) определяется взаимодействием другой пары белков — динетина и тубулина. Кинезин и другие родственные ему белки работают в клетке как переносчики органелл (митохондрий и лизосом) и сравнительно крупных частиц. Среди большого числа моторных белков миозин скелетных мышц и кинезин из клеток мозга являются наиболее изученными молекулярными моторами.

3.4.1. МЫШЕЧНОЕ СОКРАЩЕНИЕ

3.4.1.1. Модель скользящих нитей

Известно, что скелетные мышцы состоят из многоядерных клеток, связанных возбудимой плазматической мембраной, по которой проходит нервный импульс. Мышечные клетки состоят из множества сократительных волокон — миофибрилл, расположенных параллельно друг другу. Структурно-функциональными единицами миофибрилл являются саркомеры, которые располагаются вдоль мышечных волокон через каждые 2,3 микрона. На электроно-микроскопических снимках продольного среза мышечной ткани видно, что саркомер состоит из параллельных рядов толстых и тонких нитей. Их взаимное расположение схематически показано на рис. 3.41.

Вертикальные темные линии Z соответствуют специальным структурным белкам, разделяющим миофибриллы на саркомеры. Между ними видны горизонтальные нити сократительного аппарата. От Z-линий отходят тонкие нити, которым на снимках соответствуют светлые полосы Н. В центральной части саркомера расположены толстые нити, которым соответствуют темные полосы. В середине каждой полосы А вид



Р и с. 3.41. Схематическое изображение строения саркомеров мышечного волокна: *a* — продольный разрез; *б* — поперечный разрез в области пересечения толстых и тонких нитей; *в* — изменение длины саркомера в результате движения толстых и тонких нитей

на более светлая полоса Н. Наличие двух темных участков полосы А определяется тем, что в этих зонах толстые нити перекрываются тонкими. Более светлая полоса (зона Н) соответствует участку саркомера, где толстые нити не перекрываются тонкими.

Толстые нити (диаметром 15 нм) состоят главным образом из молекул миозина. Тонкие нити (диаметром 9 нм) состоят из белков трех типов: актина, тропомиозина и тропонинового комплекса. Толстые и тонкие нити взаимодействуют друг с другом с помощью поперечных мостиков длиной 13 нм, которые через регулярные промежутки выходят из толстых нитей и заполняют щели между соседними толстыми и тонкими нитями.

При сокращении мышцы ее длина укорачивается на одну треть. Как это происходит, стало понятным в начале 1950-х гг., когда Э. и Х. Хаксли (A. Huxley, H. Huxley) и Ж. Хэнсон (J. Hanson) на основании исследования структуры мышечных волокон методами рентгеноструктурного анализа, оптической и электронной микроскопии независимо друг от друга пришли к модели скользящих нитей. В основе этой модели лежат следующие факты:

- при сокращении мышцы длина толстых и тонких нитей саркомера не меняется;
- саркомер укорачивается за счет перекрывания толстых и тонких нитей, которые скользят друг относительно друга при сокращении мышцы (при сокращении полосы Н укорачиваются);
- сила, развиваемая мышцей, создается в процессе движения соседних нитей.

Скольжение толстых и тонких нитей друг относительно друга совершается за счет энергии, выделяющейся при гидролизе АТФ. Открытие АТФ-азной активности миозина было сделано отечественными исследователями В. А. Энгельгардтом и М. Н. Любимовой в 1939 г. Они показали, что препараты миозина способны расщеплять АТФ до АДФ и P_i . Ими было также установлено, что добавление АТФ к белковому препарату, состоящему из нитей миозина, влияет на его механические свойства. Вскоре после этого А. Сент-Дьёорди (A. Szent-Gyorgyi) установил, что в растворе актин и миозин образуют так называемый актомиозиновый комплекс, в отсутствие актина миозин плохо гидролизует АТФ, а в присутствии актина АТФ-азная активность миозина возрастает приблизительно в 200 раз.

3.4.1.2. Элементарный акт мышечного сокращения

Молекулы миозина и актина, взаимодействуя друг с другом, образуют актомиозиновый комплекс. В покоящейся мышце миозиновые мостики не проявляют АТФ-азной активности, поскольку тропомиозин и белки тропонинового комплекса препятствуют взаимодействию головок миозина с нитью актина. Активация актомиозинового комплекса инициируется ионами Ca^{2+} . Их концентрация в цитоплазме расслаблен-

пой мышцы составляет менее 0,1 мкмоль, что обусловлено работой Са-насоса саркоплазматического ретикулума, который перекачивает ионы из цитоплазмы в специальные цистерны. Под действием нервного импульса ионы Са выходят из кальциевых цистерн и связываются с тропонином С — регуляторным белком тропонинового комплекса. В результате запускается цепь конформационных превращений остальных белков тропонинового комплекса, что вызывает изменение положения тропомиозина относительно нити F-актина. Таким образом, благодаря последовательным структурным перестройкам белков тонкой нити (тропонин — тропомиозин — актин), инициированным повышением концентрации ионов Са, головка миозина приобретает возможность связываться с актином. Сила, которая вызывает движение молекул миозина вдоль нитей актина, возникает за счет структурных изменений, происходящих в каталитическом центре миозина после гидролиза молекулы АТФ. Работа миозина напоминает функционирование механического устройства, в котором «головка» и «шейка» миозинового мостика выполняют роль своеобразного рычага, позволяющего существенно увеличить амплитуду смещения миозинового «хвоста». Этот рычаг одним из своих концов опирается на актиновую нить, другой конец рычага соединен с «хвостом» молекулы миозина (рис. 3.42).

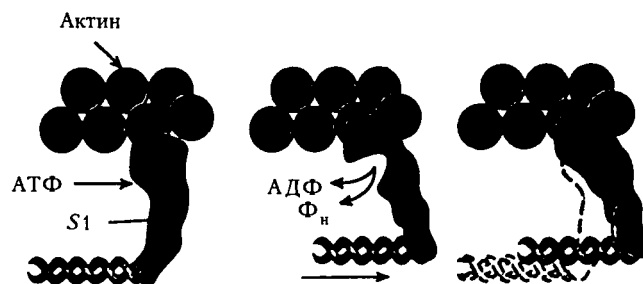


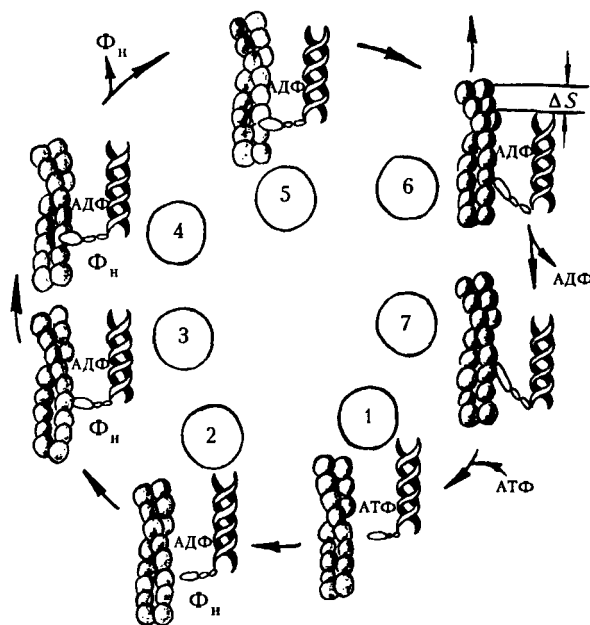
Рис. 3.42. Схема, показывающая изменение положения «головки» миозина (S1) относительно тонкой нити в ходе структурных перестроек актомиозинового комплекса, которые приводят к возникновению силы, тянущей «хвост» миозина

После гидролиза АТФ и диссоциации АДФ и F_n из каталитического центра в «головке» миозина происходят перестройки, в результате которых зацепленная за нить актина «головка» миозина поворачивается на $30 - 40^\circ$, увлекая за собой «хвост» миозина. Так возникает сила, вызывающая скольжение миозина вдоль нитей актина.

3.4.1.3. Рабочий цикл актомиозинового комплекса

В процессе сокращения мышцы каждая «головка» миозина совершает многократные повороты, периодически изменяя угол наклона

относительно пилы актина. В расслабленной мышце миозиновый мостик отделен от активной цепи. Свободная «головка» миозина обладает определенной степенью подвижности; угол ее наклона относительно «хвоста» может изменяться. При связывании молекулы АТФ с активным центром миозина его «головка» остается отсоединенной от актина (рис. 3.43).



Р и с. 3.43. Цикл структурных превращений актомиозинового комплекса, приводящих к смещению молекулы миозина вдоль нити актина

В каталитическом центре миозина молекула АТФ расщепляется (состояние 1) до АДФ и Φ_n (2), которые остаются связанными с каталитическим центром. Вслед за этим происходит присоединение «головки» миозина к активной нити: сначала образуется слабая связь (3), затем возникает более прочная связь (4). При этом вращательная подвижность миозинового мостика становится ограниченной. Прочное связывание «головки» миозина с актином инициирует освобождение Φ_n из активного центра, что вызывает дополнительное увеличение сродства миозина к актину (5). В результате этого появляется сила, вызывающая поворот мостика в сторону «хвоста». Вместе с поворотом мостика смещается вдоль нити актина «хвост» миозина, который соединен с мостиком с помощью шарнирного сочленения. Благодаря продольному смещению «хвоста» миозина происходит сокращение длины

саркомера. После смещения «головки» миозина, инициированного диссоциацией фосфата, молекула АДФ выходит из каталитического центра (6). Ее место занимает новая молекула АТФ, что сопровождается отсоединением «головки» миозина от актина, завершающим цикл структурных преобразований в активном центре миозина (7). В результате многократно повторяющихся циклов гидролиза АТФ возникает направление скольжения нитей миозина и актина друг относительно друга.

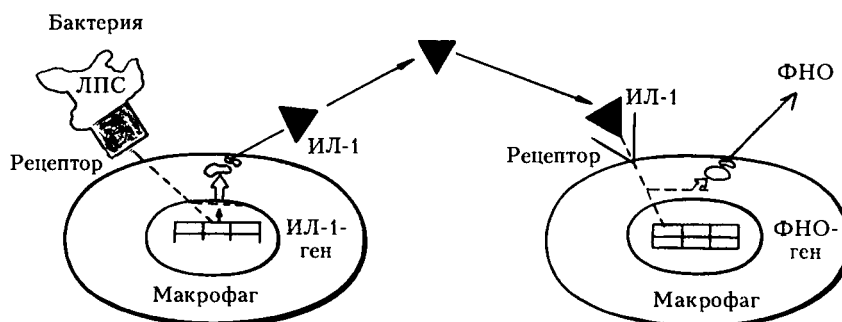
В мышечных волокнах молекулы миозина работают не индивидуально, а кооперативно, в составе крупных макромолекулярных ансамблей. При сокращении мышцы лишь сравнительно небольшая часть миозиновых мостиков (10 — 15 %) одновременно находится в контакте с окружающими нитями актина. При этом молекулы миозина, у которых мостики отсоединены от актиновых нитей, во время сокращения саркомера перемещаются вместе с остальными молекулами миозинового жгута. Такое движение свободных (несвязанных) мостиков происходит за счет работы других мостиков, которые в это время непосредственно взаимодействуют с нитями актина. Иными словами, каждый мостик не просто «шагает» вдоль нити, равномерно «ступая» между соседними звеньями актиновой цепи, а как бы «прыгает» вдоль нее. Длина таких «прыжков» составляет 36 — 38 нм, что многократно превышает размер индивидуального шага (4 нм). Таким образом, сокращение мышечных волокон обеспечивается за счет кооперативной работы большого количества молекул миозина, собранных в толстые нити. Движение пучка молекул миозина вдоль нити актина можно сравнить с перетаскиванием бревна большой группой работников, из которых лишь небольшая часть (10 — 15 %) опирается ногами на землю, в то время как все остальные висят на бревне, не касаясь земли. Кооперативный способ работы молекул миозина, характерный для скелетных мышц, встречается также в некоторых других сократительных системах.

Известна, однако, большая группа моторных белков, которые работают индивидуально; их цикл механохимических превращений протекает в равномерном режиме, а перемещение происходит отдельными шагами. К таким белкам относятся некоторые классы немышечных миозинов, работающих в клетках животных и растений при переносе молекул и органелл. Простейшие молекулы миозина, выполняющие работу индивидуальных переносчиков (миозин класса I), имеют глобулярную «головку» и короткий «хвост». Двигаясь вдоль нити актина цитоскелета, молекула-переносчик может тащить за собой органеллу, к которой она прикрепляется своим «хвостом». Движение органелл наблюдают в некоторых крупных клетках, таких, как гигантские клетки зеленой водоросли *Nitella*. Интересна структурная организация транспортной системы, обеспечивающей циркуляцию цитоплазмы в клетках водоросли. На периферии клетки, рядом с плазматической мембраной, находится слой хлоропластов, примыкающих к так называемому кортикальному

слою, который содержит пучки актиновых нитей. Между неподвижным кортикальным слоем и мембраной вакуоли расположен слой движущейся цитоплазмы, в котором находятся ядра, митохондрии и другие органеллы. Молекулы миозина совершают круговое движение внутри клетки, равномерно перемещаясь вдоль нитей актина и увлекая за собой сравнительно крупные органеллы (митохондрии, эндоплазматический ретикулум, ядра и др.). Скорость перемещения органелл составляет 50 — 75 мкм/с. Благодаря этому в клетке водоросли возникает циркуляция цитоплазмы, за счет которой ее содержимое перемешивается гораздо быстрее, чем при простой диффузии. Известно, что при освещении растений хлоропласты быстро перемещаются внутри клетки, собираясь вблизи клеточной стенки. Возможно, эти феномены связаны с движением цитоплазмы при выполнении клеткой определенной функции. Действительно, благодаря динамике цитоскелета фибробласт может менять форму и направление движения в ответ на изменения окружающей среды. Несмотря на внешние различия, механизмы движения фибробластов и роста нервных отростков сходны: они включают создание внешними факторами неравномерности прикрепления и стабилизацию этих различий двумя цитоскелетными системами. Особенность нейронов заключается в чрезвычайно длительной и стойкой микротрубочковой стабилизации отростков, «долговременной памяти».

3.5. КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНИТЕТА

Проникновение микробов в ткани, их размножение служат сигналом к мобилизации защитных клеток. Каким образом защитные клетки, циркулирующие в крови или осевшие в органах и тканях иммунной системы, отдаленные от «входных ворот» инфекции, получают сигнал об опасности? Этот процесс осуществляется с помощью семейства молекул, получивших название цитокинов (греч. *kytos* — «клетка», *kinētikos* — «связанный с движением»). Данные молекулы являются переносчиками сигнала от клетки к клетке. В геноме клетки имеются специальные гены, ответственные за синтез определенных цитокинов. До поры они находятся в «неактивном» состоянии, но после получения сигнала о проникновении микробов-паразитов активизируются. С них считывается информация о структуре соответствующих белков, затем осуществляется их синтез, и готовые молекулы цитокинов начинают выделяться (секретироваться) клеткой в окружающую среду. Для восприятия и распознавания различных сигналов клетки несут на своей поверхности рецепторы, специфические для каждого цитокина. Таким образом, цитокины, являясь единицами своеобразного языка межклеточного общения, позволяют клеткам общаться, взаимодействовать, объединяя свои усилия в борьбе с микробами-паразитами (рис. 3.44).



Р и с. 3.44. Продукция и рецепция цитокинов. На поверхности бактерии-паразита имеется сигнальная молекула (ЛПС), которая распознается специальным рецептором на поверхности макрофага. От рецептора идет сигнал к активации гена, ответственного за синтез интерлейкина-1 (ИЛ-1), начинаются синтез этой молекулы и ее секречия. Другой макрофаг несет рецептор для ИЛ-1, через который идет сигнал к его гену, ответственному за синтез фактора некроза опухолей (ФНО), и запускаются синтез и секречия этого цитокина

Рассмотрим, как складываются такие межклеточные взаимоотношения, на примере макрофагов и Т-лимфоцитов. На поверхности макрофагов находятся молекулы-рецепторы, которые связываются с токсинами, выработанными микробами-паразитами. Распознавание токсина приводит к движению макрофага в область проникновения микробов. В очаге инфекции макрофаги осуществляют фагоцитоз микробов. Действие токсинов активирует многие гены макрофага и стимулирует производство цитокинов, таких, как ИЛ-1, которые с током крови попадают в мозг и действуют на центр терморегуляции. В результате повышается температура тела, т. е. запускается один из механизмов защиты организма, так как многие микробы снижают скорость размножения при повышении температуры. Те же молекулы ИЛ-1, действуя через соответствующие рецепторы, передают сигнал на лимфоциты, и запускается расширенный иммунный ответ. ИЛ-1 способен запускать каскад продукции других цитокинов, получивших название ИЛ-2, -3, -4 и т. д., которые находят соответствующие рецепторы на Т-, В-лимфоцитах и других клетках, передавая им сигналы, активирующие их отдельные функции. Хотя иммунный ответ запускает макрофаг, только лимфоциты обладают рецепторами для распознавания чужеродных молекул — антигенов — и могут обеспечить иммунный ответ. От клеточной мембраны Т-лимфоцита к ядру идут одновременно два типа сигнала: от антигенраспознающего рецептора и от рецептора, связавшего ИЛ-1. При таком комплексном воздействии в геноме Т-лимфоцитов активируются гены не только самого ИЛ-2, но и рецепторов, специфичных к нему. Затем синтезированный в Т-лимфоците ИЛ-2 начинает действовать на производящие его клетки, в них активируется процесс деления, и за счет этого усиливается функция клеточной популяции Т-лимфоцитов.

3.6. КЛЕТочНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕСТРОЙКИ БЕЛКОВ

Известно, что нативная, трехмерная структура белка устанавливается в результате действия целого ряда энергетических и энтропийных факторов. Характерные времена многих внутримолекулярных изменений, в том числе и ферментативных процессов, не превышают 10^{-2} — 10^{-3} с и зависят от pH, температуры и ионного состава среды. Таким образом, изменения ионного гомеостаза могут непосредственно влиять на структурные изменения в клеточных белках и соответственно на их функции и активность. Рассмотрим в качестве примера конформационные перестройки белков, переносящих кислород, — гемоглобина и миоглобина. Строение этих белков, находящихся в кристаллической форме, детально изучено методом рентгеноструктурного анализа. Пространство между α -спиральными участками, в том числе полость активного центра гемовой группы внутри молекул белка, заполнено гидрофобными боковыми цепями аминокислот, а в окружающую водную среду выступает множество полярных белковых цепей. Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц (две α и две β), образующих правильный тетрамер. Молекулы воды, локализованные в области контактов субъединиц, образуют солевые мостики и дополнительно стабилизируют тетрамер. Железо может находиться в высоко- и низкоспиновом состоянии в зависимости от способа заполнения d -орбитали электронами, который определяется правилами Хунда. В связи с этим заполнение электронами внешних d -орбиталей ионов двух- и трехвалентного железа характерно для свободных ионов или ионов в составе соединений с ионной связью. Ситуация меняется, когда атомы железа находятся в комплексе, где связаны лигандными атомами ковалентной связью и входят в состав гема. Следует подчеркнуть, что спиновое состояние центрального атома в комплексе определяется характером лигандного окружения: симметрией, силой связывания лигандов в комплексе и т. д. В силу этого изменения в лигандном окружении могут приводить к изменениям в спиновом состоянии иона металла, что в свою очередь может вызвать изменения конформации белка, с которым связан ион металла. Изменения спинового состояния ионов железа, индуцированные присоединением субстратов, сменой температуры, были продемонстрированы для ряда гемопротеинов. Переход иона железа из низкоспинового состояния в высокоспиновое увеличивает диаметр иона и приводит к выходу его из плоскости гема, что обуславливает и конформационные изменения в ближайшем «белковом» окружении гема.

В высокоспиновом состоянии Fe^{2+} обладает координационным числом 5 и расположен вне плоскости гема на расстоянии 0,05 — 0,07 нм. Он координационно связан с четырьмя атомами азота пиррольных групп плоского порфиринового кольца, а в 5-м положении взаимодействует с атомом N имидазольного кольца гистидина. Оксигенация и

образование связи кислород — железо не меняют валентности атома железа, но переводят его из высокоспинового состояния в низкоспиновое, увеличивая число лигандов в координационной сфере до 6. В 6-м положении железо координируется с кислородом или другими лигандами.

Присоединение кислорода индуцирует ряд конформационных изменений в молекуле гемоглобина. Связывание кислорода с переводом атома железа в низкоспиновое состояние сопровождается одновременным смещением железа на 0,07 нм в плоскость гемовой группы. Это смещение передается через гистидин, и спираль вместе с ним «подтягивается» в сторону гема к центру молекулы, выталкивая из полости остаток тирозина. Затем происходят поэтапный разрыв солевых мостиков между α -субъединицами и смещение их вдоль области контакта. Расстояние между гемом и α -субъединицами увеличивается, а между гемом и β -субъединицами, наоборот, сокращается. Центральная полость гема при этом сжимается. Разрыв шести солевых мостиков и освобождение протонов (эффект Бора) характерны для этих конформационных изменений гемоглобина. В целом оксигенация переводит каждую из субъединиц из дезокси- в оксиконформацию. Разрыв четырех солевых мостиков из шести при оксигенации первых двух α -субъединиц способствует разрыву двух остальных мостиков и, следовательно, облегчает соединение следующих молекул кислорода с остальными субъединицами, увеличивая сродство их к кислороду в несколько сотен раз. В этом и состоит кооперативный характер присоединения кислорода к гемоглобину, при котором начало оксигенации последнего облегчает связывание остальных молекул кислорода.

Использование лазерного излучения с длиной волны поглощения в диапазоне β -полосы порфирина и вблизи нее позволяет регистрировать спектры РКР протопорфиринов в целых клетках (эритроцитах). В этих спектрах доминируют линии, лежащие в области $1\,000 - 1\,650\text{ см}^{-1}$, которые обусловлены плоскостными колебаниями связей $\text{C}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{N}$ и деформационными колебаниями $\text{C}-\text{N}$. Некоторые из них подвержены влиянию химических превращений, происходящих с атомом железа, и могут быть использованы для изучения структуры макроцикла. При изменении состояния окисления атома железа от Fe(III) к Fe(II) наблюдается снижение частоты некоторых скелетных колебаний порфирина. Положение этой и других характерных полос спектра РКР отражает заселенность электронами π -орбиталей порфирина. С ее увеличением связи в порфирине становятся менее прочными, что выражается в снижении частоты колебаний. Заселенность π -орбиталей порфирина возрастает за счет обратного перехода электронов с π -орбиталей атома железа. Поскольку процесс сильнее выражен для Fe(II) , чем для Fe(III) , полосы, характеризующие состояние окисления, сдвинуты в область более низких частот для гемов с Fe(II) . При таком подходе любой эффект (в том числе изменения состояния окисленности атомов железа), который вызывает изменения в распре-

делении электронов на π -орбиталях порфирина, может повлиять на частоту соответствующих характеристических линий. Эта частота сильно меняется, например, если аксиальный лиганд, имеющий π -орбиталь, может взаимодействовать с орбиталями порфиринов через $d\pi$ -электроны атома железа. Аксиальный π -электронный донор приводит к дополнительному переходу $d\pi$ -электронов атома железа на π -орбитали порфирина и вызывает снижение частоты полос, характеризующих состояние окисления, до «нетипичных» величин.

3.7. СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ КЛЕТОК

Живые организмы, их ткани и клетки при активном делении способны излучать УФ-фотоны, обладающие митогенетическим эффектом. Это было установлено в 1920 — 1930-е гг. русским ученым А. Г. Гурвичем и его сподвижниками, которые для обнаружения данного излучения применяли биотесты. Значительно позже в нескольких независимых лабораториях с использованием ФЭУ были обнаружены источники слабого УФ-излучения в диапазоне длин волн от 250 до 380 нм (культуры дрожжей, кишечной палочки, микроспороциты). Трудности изучения этого эффекта связаны с тем, что УФ-излучение биологических объектов зависит от поглощения ими видимого света, а регистрация излучения с помощью ФЭУ требует помещения объекта в полную темноту. В связи с этим для большей надежности выявления слабого УФ-свечения у биологических объектов необходимы строгие требования «слепоты» ультрафиолетового ФЭУ к видимой области спектра, а такие детекторы не использовались в этих работах. В настоящее время существуют ФЭУ, не чувствительные к свету с длинами волн по крайней мере более 365 нм.

Сейчас уже нет сомнений в том, что некоторые ткани и клетки живых организмов способны излучать более длинноволновый свет, чем УФ, невидимый невооруженным глазом, но тем не менее информирующий о некоторых важных окислительно-восстановительных реакциях в клетках, обязательными участниками которых являются активные формы кислорода и другие свободные радикалы, приводящие к образованию электронно-возбужденных продуктов. Впервые достоверное сверхслабое излучение живой ткани в видимом диапазоне спектра обнаружено в 1954 г. Л. Колли с соавторами. Они зарегистрировали слабую люминесценцию (несколько сот импульсов в секунду) от экстрактов различных частей растений. Однако лишь в конце 1950-х гг. Б. Н. Тарусовым были проведены первые систематические исследования ССИ живых объектов с помощью высокочувствительных установок с применением ФЭУ. Было обнаружено ССИ широкого круга интактных органов, изолированных клеток, тканевых гомогенатов позвоночных и беспозвоночных животных, растений и ряда реакций в

пробирке. В отличие от сильной биолюминесценции, хорошо видимой, присущей некоторым представителям бактерий и животного мира, излучающим до $10^3 - 10^4$ фотонов в 1 с с высоким квантовым выходом ($\phi = 0,1 - 1,0$), и хемилюминесценции некоторых химических реакций ($\phi = 0,01 - 0,50$), ССИ характеризуется в $10^3 - 10^8$ раз более слабой интенсивностью. Спонтанная эмиссия света часто не превышает 1 фотона в 1 с на клетку, а в пересчете на орган составляет до 10^4 фотонов в 1 с на 1 см^2 излучающей поверхности ткани, или 20 000 фотонов в 1 с из 1 см^3 . Если клетка (например, гепатоцит) имеет радиус 20 мкм, то в 1 см^3 содержится $2,5 \cdot 10^8$ клеток, поэтому на клетку приходится $8 \cdot 10^8$ излучаемых в 1 с фотонов. Обычно реакции, ответственные за сверхслабую хемилюминесценцию, имеют максимально низкий квантовый выход (ϕ бывает в пределах $10^{-3} - 10^{-8}$, а иногда $10^{-9} - 10^{-15}$).

ССИ живых клеток и тканей является следствием релаксации ЭВС, возникающих в ходе свободнорадикальных окислительно-восстановительных реакций, в частности пероксидации некоторых молекулярных субстратов. В реакциях рекомбинации свободных радикалов и ферментативного и неферментативного расщепления перекисных соединений (которые в любом случае протекают по пути одноэлектронного восстановления кислорода) освобождаются порции энергии, эквивалентные квантам видимого и даже ультрафиолетового света. Реализация ЭВС может быть различной в зависимости от того, в каких условиях возникли эти продукты электронного возбуждения. Если ЭВС генерируются достаточно редко и в условиях, когда возбужденные частицы за счет броуновского движения случайно сталкиваются с невозбужденными и разнородными молекулами, энергия возбуждения почти сразу переходит в тепловую. При этом возможен, но с малой вероятностью, спонтанный переход из возбужденного состояния в основное, сопровождающийся излучением кванта света. При наличии в среде, клетках, тканях субстанций, способных поглотить этот квант, они возбуждаются, а далее либо высвечивают его, либо переводят в тепло. Энергия от возбужденной частицы к другой может передаваться безызлучательным путем. Такой перенос осуществляется практически мгновенно на большие в молекулярных масштабах расстояния и реализуется тем эффективнее, чем выше уровень структурной организации. Именно такие условия характерны для внутренней среды живых организмов, их тканей и клеток, где благодаря молекулярной и надмолекулярной организации цитоплазмы должна существенно снизиться вероятность диссипации энергии ЭВС в тепло, но повышается вероятность ее накопления в макромолекулах, надмолекулярных ансамблях и безызлучательного перераспределения между ними.

Поскольку доля кислорода, восстанавливаемого в организме животного по одноэлектронному пути, весьма значительна, то и интенсивность генерации ЭВС должна быть высока. За последние несколько десятилетий появился громадный массив данных, свидетельствующих о

том, что все без исключения живые системы и даже их фрагменты, в которых сохраняется хотя бы какой-то уровень метаболизма, излучают свет, причем способность к его испусканию строго зависит от присутствия кислорода. В подавляющем большинстве случаев свет испускается в области сверхнизких интенсивностей. Целый ряд организмов биолюминесцирует, т. е. испускает свет, видимый невооруженным глазом, за счет наличия особых белков с громадным квантовым выходом, которые преобразуют в видимый свет энергию, освобождаемую при одноэлектронном восстановлении кислорода.

ССИ может также объясняться флуоресценцией синглетного кислорода и его димеров и фосфоресценцией возбужденных карбонильных соединений, получающихся в результате распада диоксиэтанов и тетраоксидов. В определенных условиях такие реакции, сопровождающиеся ССИ, могут протекать по механизму так называемых вырожденно-разветвленных цепных процессов. Физико-химическая система, в которой происходят такого рода процессы, переходит из квазиравновесного состояния в неравновесное, причем в определенных условиях неравновесность системы может поддерживаться в течение длительного времени за счет постоянной продукции в ней активных частиц.

Большинство авторов считают, что ССИ — это побочное явление, не играющее функционально значимой роли. Однако еще Гурвич на основании громадного фактического материала, полученного им и другими авторами, работавшими в этой области, утверждал, что электронное возбуждение в живых клетках возникает закономерно в ходе обмена веществ и необходимо для нормальной жизнедеятельности. В последнее время появилось много свидетельств того, что в живых системах постоянно протекают процессы, приводящие к непрерывному возникновению электронно-возбужденных частиц. За счет их энергии в клетке могут осуществляться энергоемкие процессы, фотомодулироваться активность ферментов и т. д. Существует мнение, что излучения в разных областях спектра могут иметь функциональное значение, причем их регуляторная функция реализуется, как правило, в области очень низких интенсивностей. Кроме того, возможно, что создаваемое возбужденными частицами электромагнитное поле и излучения, сопутствующие его осцилляциям, играют информационную роль.

Основной массив данных в области исследований ССИ биообъектов был накоплен при изучении хемилюминесценции, сопровождающей генерацию АФК, или так называемый окислительный взрыв, в препаратах очищенных суспензий нейтрофилов или на сильно разведенной крови. Однако неразведенная кровь также может быть источником излучения, происходящего в результате вторичных процессов, обусловленных трансформацией ЭВС в системе. Интенсивность и некоторые другие параметры ССИ могут меняться в зависимости от состояния живого объекта, его физиологических и биохимических особенностей, от силы и характера воздействий, влияющих на разные уровни биоло-

гической организации. В разные периоды жизнедеятельности меняются метаболическая активность живых организмов и соответственно эффективность ССИ, причем существенно. При усилении потребления кислорода световой сигнал повышается от 2 до 10 раз в зависимости от ткани. Например, в логарифмической фазе роста культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ССИ более интенсивно, чем в стационарной фазе. Максимум световой эмиссии от 10^{10} клеток примерно $5 \cdot 10^5$ фотонов в 1 с, что эквивалентно 1 фотону на каждые 20 000 клеток. Однако при пересчете числа фотонов только на делящиеся клетки обнаруживается многократное относительное усиление их образования: 0,1 — 1 фотон на 1 клетку.

Чтобы увеличить квантовый выход ССИ, можно использовать люминесцентные зонды, или люминофоры, такие, например, как широко применяемые люминол и люцигенин. Хорошо известно, что люцигенин является специфическим индикатором $O_2^{\cdot -}$, а люминол — менее специфичный люминофор и информирует об образовании различных АФК ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$, OCI^-). Например, добавление люминола к активированным изолированным нейтрофилам в концентрации 10 мкмоль может вызвать образование 1 — 100 фотонов в 1 с на 1 клетку. В присутствии же люцигенина интенсивность хемилюминесценции оказывается значительно ниже (максимальное усиление эмиссии по сравнению со спонтанным излучением достигается с люминолом в 10^3 — 10^4 раз, а с люцигенином — в 10^2 — 10^3).

Важно, что и люцигенин, и люминол являются не инертными индикаторами и усилителями ССИ биологических систем. Они могут взаимодействовать с ними, каким-то образом модифицируя их. Указанные люминофоры могут не только вступать в реакции окисления с АФК с образованием продуктов в электроно-возбужденных состояниях, но и выступать в роли транзиттеров энергии таких состояний, переходя в возбужденное состояние с последующим высвечиванием квантов света.

Глава 4

КЛЕТОЧНАЯ И МЕМБРАННАЯ ПАТОЛОГИЯ

Все, что мы знаем сегодня о клеточной патологии, позволяет утверждать, что ей принадлежит ведущая роль в развитии различных отклонений от нормального биологического процесса. Поэтому можно предположить, что нарушения функционирования клетки или ее отдельных компонентов (мембраны, органеллы, ядра) вызывают всевозможные патологии (злокачественные новообразования, атеросклероз, гипертонию и др.). Однако многочисленные попытки исследователей связать конкретные изменения в клетках с определенными заболеваниями находятся, как правило, в стадии постановки задачи. Существуют два аспекта изучения патологии клеток: анализ процессов, приводящих к патологическим — обратимым или необратимым — изменениям в клетке, и анализ влияния выявленных нарушений на состояние всего организма.

4.1. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Одним из важных процессов, связанных с клеткой и клеточными мембранами, является перекисное окисление липидов. Его течение регулируется специальными клеточными веществами — антиоксидантами. В случае, если процесс перекисного окисления нарушается, то развивается патология. Образование перекисей липидов имеет цепной свободнорадикальный механизм. *Свободными радикалами* называются частицы (атомы, молекулы), имеющие неспаренные электроны, отличающиеся высокой реакционной способностью (в норме концентрация свободных радикалов в тканях равна $10^{-6} - 10^{-8}$ моль/г ткани). В процессе перекисного окисления липидов, происходящего в биологических мембранах, участвуют свободные радикалы ненасыщенных жирных кислот клеточных мембран. При его активации нарушаются барьерные, рецепторные и каталитические функции мембран. В настоящее время рассматриваются в основном три механизма повреждения мембран при усилении перекисного окисления липидов:

— появление гидрофильных гидроперекисных групп в полинепа-

сыщенных жирных кислотах фосфолипидов, нарушающих гидрофобность липидного бислоя и вызывающих резкое возрастание пассивной проницаемости мембраны для ионов;

- возникновение в ходе липоперекисления диальдегидов (например, малонового), способных вызвать полимеризацию и агрегацию белков и липидов в мембране;

- окисление перекисными радикалами аминокислотных остатков мембранных белков (в первую очередь гистидина, триптофана и аминокислот, содержащих сульфгидрильные группы), присутствие которых в активных центрах ферментов вызывает потерю ферментативной активности.

Названные первичные изменения приводят к серьезным нарушениям функционирования мембран, что проявляется и на уровне организма. Усиление перекисного окисления липидов в саркоплазматическом ретикулуме мышечных клеток нарушает механизм «накачивания» кальция в цистерны, в результате чего снижается величина отношения $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$. Этот эффект возникает из-за увеличения проницаемости мембраны для кальция. На поздних стадиях липоперекисления активность Са-АТФ-азы ингибируется в связи с появлением межмолекулярных белковых сшивок. Нарушение системы транспорта Ca^{2+} приводит к появлению избыточных концентраций кальция и, как следствие, к мышечной контрактуре. Такие процессы можно наблюдать в организме, например, при тяжелых физических нагрузках, когда перекисное окисление интенсифицируется в мышечной ткани. При усилении перекисного окисления повреждаются мембраны эритроцитов и мышечных клеток и высвобождаются железосодержащие белки — миоглобин и гемоглобин, катализирующие распад перекиси и образующие ОН-радикалы и продукты перекисного окисления липидов. Подобный процесс происходит, например, при анемии, характерной для марафонцев. Предотвратить усиление липоперекисления при больших физических нагрузках можно введением в организм дополнительных доз природного антиоксиданта — витамина Е. Установлено, что усиление липоперекисления является причиной многих патологических процессов. В настоящее время ведутся поиски адекватных антиоксидантов, необходимых для разработки соответствующих лекарственных препаратов.

4.2. ГИПЕРТОНИЯ

Важные данные получены при исследовании связи развития гипертонической болезни с патологическими изменениями мембран. В настоящее время известно, что в основе такого системного заболевания, как гипертония, лежат не только изменения в гладких мышцах артерий, заболевание почек и нарушение работы периферической нервной систе-

мы, но и нарушение ион-транспортирующих систем клеточных мембран. В работах, выполненных на эритроцитах гипертензивных крыс, было установлено, что при гипертонии нарушаются катионтранспортные функции плазматических мембран. В них возникают гидрофобные участки липидного бислоя и участки белково-липидных контактов с повышенной скоростью переноса одновалентных катионов. Для первичной гипертонии характерны частичная деполяризация мембраны возбудимых (гладкомышечные клетки сосудов) и невозбудимых (эритроциты) клеток и повышение проницаемости плазматической мембраны для различных ионов.

Большое значение при возникновении и развитии гипертонии имеет повышение концентрации свободного кальция в различных клетках. В настоящее время данные о нарушении нормального распределения внутриклеточного кальция послужили основой для применения в терапии гипертонической болезни антагонистов кальция и разработку новых лекарственных препаратов, снижающих скорость его поступления в клетки и нормализующих внутриклеточное распределение.

С другой стороны, при клеточном изучении причин гипертонии были выявлены изменения конформации порфирина, парциального давления O_2 и CO_2 , а также процессы, регулирующие pCa и pH эритроцитов при эссенциальной гипертонии. Важно, что изменение конформации порфирина при гипертонии свидетельствует о повышенном сродстве гемоглобина к кислороду, что сопровождается снижением парциального давления O_2 и увеличением парциального давления CO_2 . При этом в эритроцитах выявлена повышенная активность Na^+/H^+ -обмена, Ca^{2+} -зависимых K -каналов и пониженная активность Ca -АТФ-азы. Предполагается, что изменение конформации порфирина при гипертонии снижает эффективность обмена O_2 в гемоглобине и величину внутриклеточного pCa и pH эритроцита.

4.3. САХАРНЫЙ ДИАБЕТ

Исследование клеточных причин сахарного диабета является одним из актуальных направлений современной эндокринологии. Широкая распространенность заболевания, высокая смертность больных при этом и практическая необратимость происходящих патологических процессов ставят изучение механизмов СД в ряд основных биологических проблем. Среди множества тканевых и клеточных осложнений при патогенезе СД важное значение имеют изменение ионного состава, кислородного обмена и гиперлипидемия (повышение содержания липидов в тканях). При СД наблюдается не только нарушение процесса оксигенации тканей, но и снижение интенсивности потребления ими кислорода. Среди факторов, влияющих на оксигенацию (в том числе возникновение патогенного состояния «комы»), основными

являются скорость перераспределения кислорода в артериальной крови, скорость потребления кислорода тканями и сродство гемоглобина к кислороду. Последний из перечисленных факторов в настоящее время широко исследуется.

Предполагается, что при СД снижается содержание общего гемоглобина в крови и повышается содержание 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах, а также развивается гипертриглицеридемия. Например, если СД возникает у детей (СД-1, или инсулинозависимый СД) и своевременно не лечится, то развиваются кетоз и ГТГ. Причиной появления данного расстройства служат, с одной стороны, дефицит в организме фермента липопротеинлипазы, обусловленный отсутствием инсулина, а с другой — интенсивное поступление в печень свободных жирных кислот из жировой ткани, вызывающее усиление синтеза триглицеридов. Как правило, заместительная терапия с использованием инсулина приводит к быстрому снижению уровня свободных жирных кислот, возрастанию содержания липопротеинлипазы и в конечном счете к исчезновению ГТГ. Концентрация липопротеинов низкой плотности в плазме крови при этом уменьшается, а концентрация липопротеинов высокой плотности нормализуется или даже становится несколько выше той, которая наблюдается у лиц, не страдающих СД-1. Однако эффективность воздействия таких процедур на развитие СД-1, о чем можно судить по содержанию гемоглобина A_1 , лучше, по-видимому, коррелирует с уровнем глюкозы в крови, чем с содержанием холестерина ЛПВП.

С другой стороны, при СД, характерном для взрослых (СД-2, или инсулинонезависимый СД), уровень инсулина плазмы находится, как правило, в пределах нормы или слегка повышен. При этом дополнительно наблюдается так называемая резистентность к инсулину, обусловленная наличием клеточного и/или молекулярного дефекта, снижающего инсулинопосредованное потребление глюкозы из плазмы в клетки. Важно и то, что при ИНСД возможна ГТГ, связанная с усилением притока в печень субстрата для синтеза триглицеридов, в результате образуются крупные липидные комплексы. Содержание триглицеридов может меняться за счет активации липопротеинлипазы, тогда доля ЛПНП уменьшается до нормы. При ИНСД уровень холестерина ЛПВП часто понижен, что играет определенную роль в патогенезе атеросклероза сосудов. Гипергликемия и ГТГ поддаются лечению с помощью диеты с модифицированным соотношением жиров. Хорошее действие оказывают такие препараты, как сульфамилмочевина или инсулин, хотя содержание холестерина ЛПВП при этом меняется незначительно. Способность фибратов повышать активность фермента липопротеинлипазы и снижать концентрацию триглицеридов в плазме делает эти соединения подходящими для лечения диабета в тех случаях, когда гиперлипидемия сохраняется, несмотря на коррекцию гипергликемии. Если при СД-2 уровень холестерина ЛПНП остается высоким, используют ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы.

Таким образом, комплексное решение проблемы СД должно осуществляться на всех структурных уровнях (клеточном и организменном)

с помощью физиологических, биохимических и биофизических подходов. В рамках последнего установлено, что изменение содержания некоторых компонентов плазмы крови (белков, сахаров, ЛПНП или ЛПВП) модифицирует состояние не только самих клеток — акцепторов глюкозы, но и макромолекулярного матрикса межклеточной среды.

4.4. ДЕМИЕЛИНИЗАЦИЯ

Ряд патологических процессов нервной системы связан с нарушением миелиновой оболочки, т. е. демиелинизацией аксонов, приводящей к снижению скорости проведения потенциала действия и нарушению синхронности в проведении ритмического возбуждения, известному как синдром Landry — Gullain — Barre в ПНС или как множественный склероз (multiple sclerosis) в ЦНС. На электрофизиологическом уровне при демиелинизации наблюдаются изменения скорости проведения и амплитуды ПД, а также трансформация частоты раздражения. На клеточном уровне проявлением демиелинизации нервного волокна является уменьшение содержания миелина в интернодальной области, появление в «оголенных» участках волокна дополнительных К-каналов, а также изменение активности электрогенного Na-насоса. Известно, что накопление лизоформ ряда фосфолипидов и нарушение Ca^{2+} -гомеостаза внутренних отделов миелина (насечки Шмидта — Лантермана, мезаксон и т. д.) влияют на активность взаимодействий аксона и шванновской клетки. Очевидно, что характер этих взаимодействий в миелиновом нервном волокне зависит от динамики быстрых и регулярных изменений миелина.

Методом динамической фазовой микроскопии были выявлены изменения состояния миелина паранодальной области нервного волокна в процессе демиелинизации. В норме для миелина характерны регулярные изменения оптической разности хода светового луча с частотами 4,2 и 6,7 Гц. Демиелинизация нервного волокна наряду со снижением амплитуды и скорости проведения потенциалов действия приводила к сдвигу характерных частот изменения оптической разности хода миелина (2,8, 3,2 и 11 Гц). Предполагается, что подобный сдвиг обусловлен нарушениями состояния заряженных фосфолипидов и снижением уровня связанного Ca^{2+} при демиелинизации нервного волокна.

4.5. СТРЕСС

В настоящее время доказано, что возникновение и развитие в организме стресса обусловлено наличием сложной стресс-системы, которая

состоит из центрального звена и двух периферических ветвей, осуществляющих связь центрального звена со всем организмом. Центральное звено находится в головном мозге — гипоталамусе, который выполняет функции «дозорного» ЦНС, получает информацию о появлении стрессора и запускает механизм стресс-системы. Центральное звено стресс-системы объединяет три основные группы нейронов, вырабатывающие кортикотропный гормон, гормон аргинин-вазопрессин и катехоламины. Периферические ветви стресс-системы представлены гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системой и симпатoadреналовой системой надпочечников. Таким образом, основным результатом активации стресс-системы является повышенный выброс в кровь глюкокортикоидов и катехоламинов — главных стресс-гормонов, которые способствуют мобилизации функции органов и тканей, ответственных за адаптацию. Это ключевое состояние стресс-системы реализуется путем взаимодействия гормонов с рецепторами (рис. 4.1).

Рецепторы избирательно реагируют на определенные гормоны, что приводит к активации связанных с рецепторами ферментов, и образуются так называемые вторичные мессенджеры (цАМФ, инозитолтрифосфат, диацилглицерол и др.). Они служат для передачи внешнего гормонального сигнала внутрь клетки. Мессенджеры запускают внутриклеточные процессы, регулирующие активность протеинкиназ и повышающие внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} , которые контролируют функцию нервной клетки, ее энергообеспечение и состояние генетического аппарата. Последнее важно при формировании устойчивой адаптации при повторных действиях стрессора.

Отметим, что помимо прямых продуктов стресс-системы в процесс вовлечены вещества, вызывающие пролонгированные реакции организма, — ангиотензин, цитокины (интерлейкины).

4.6. АПОПТОЗ

В ответ на внешний сигнал клетки могут не только делиться, но и гибнуть. Этот процесс называют программированной гибелью, или апоптозом. Непрограммируемая смерть клетки (некроз) возникает в результате повреждения ее внешним воздействием. Напротив, при апоптозе внешний агент сам по себе безвреден для клетки, но включает цепь процессов, приводящих к ее гибели. В развитии апоптоза условно различают три фазы. *Начальная фаза*, или *фаза индукции* апоптоза (рис. 4.2), связана с ранними событиями, развивающимися без существенных изменений метаболизма и морфологии клетки, в результате которых принимается решение о самоуничтожении. Эта стадия лучше всего изучена на примере апоптоза, запускаемого лигандами («рецепторами гибели»), структура которых наиболее полно изучена на примере Fas-рецептора и рецептора фактора некроза опухоли ($TNF-\alpha$). В ответ

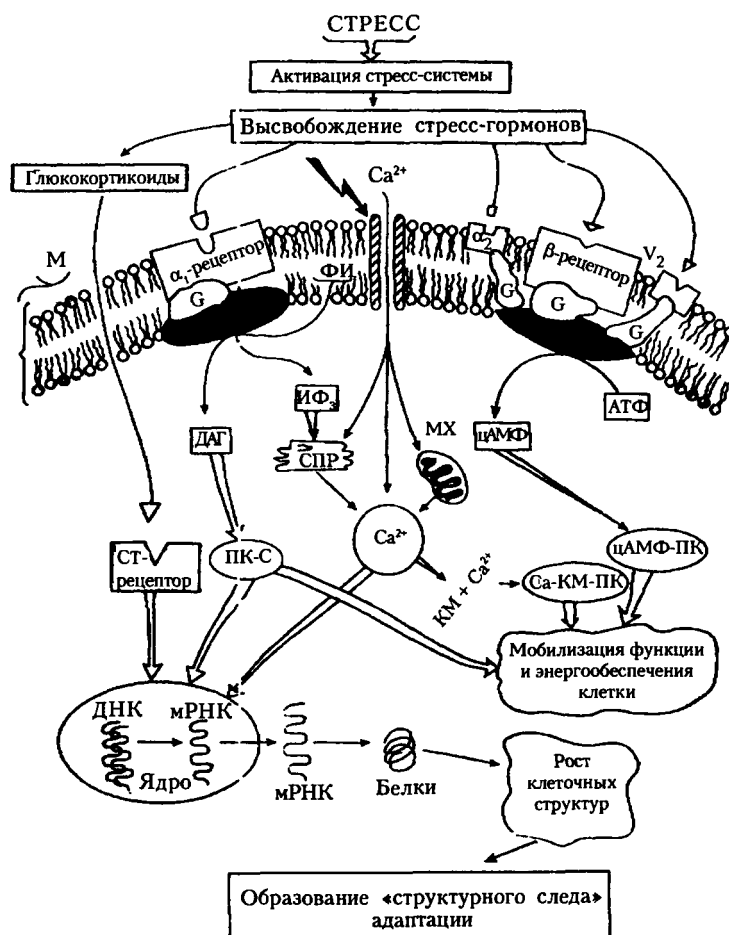


Рис. 4.1. Схема регуляции функционирования клетки при стрессе

на связывание с лигандом Fas-рецепторы образуют внутриклеточный кластер, состоящий из так называемых доменов смерти. Эти домены в свою очередь взаимодействуют с белком, который затем регулирует активность специфического фермента (прокаспазы-8), идентифицированным при исследовании апоптоза, сопровождающего онтогенез у кишечнорастворимых *C. elegans*. В результате такой регуляции прокаспазы-8 претерпевает аутогидролиз с образованием активного фермента каспазы-8 (относится к семейству аспартатузнающих цистеиновых протеаз). Установлено, что эффекторная каспаза-8 может активировать и другие каспазы (каспазу-3 и каспазу-7). Рассмотренные выше события составляют основу *второй, или исполнительной, фазы*, после чего про-

цесс становится необратимым и клетка входит в третью фазу — *фазу самодеградации* (рис. 4.2).

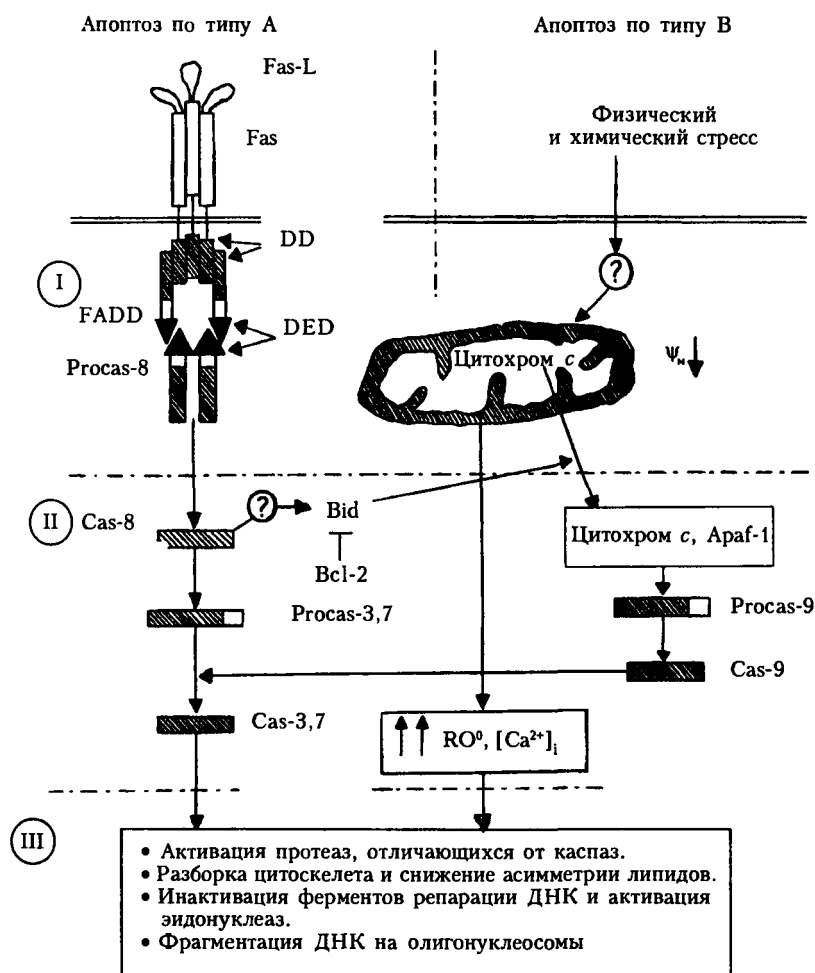


Рис. 4.2. Схема апоптоза

Наряду с исполнительными каспазами существенную роль в запуске фазы деградации играют АФК, и в частности супероксиданион (O_2^-), образующийся в митохондриях (на стадии цитохром с-оксидазного комплекса). Установлено, что продукция O_2^- резко увеличивается при образовании мегалов во внутренней мембране митондрий, приводящем к диссипации мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) — явлению,

сопутствующему клеточному апоптозу. АФК могут также возникнуть в ходе метаболизма полиненасыщенных жирных кислот (цитохромом P_{450}) в эндоплазматическом ретикулуме и при функционировании НАДФ · Н-оксидазы плазматической мембраны. Супероксид дисмутаза приводит к катаболизму образовавшегося O_2^- до H_2O_2 и одного из наиболее токсичных продуктов этой реакции — гидроксилрадикала ($OH\cdot$) — инициатора свободнорадикального окисления липидов. В свою очередь высокореактивные перекиси липидов взаимодействуют с белками и нуклеиновыми кислотами с образованием шиффовых оснований.

Образование митохондриальных мегапор приводит к высвобождению цитохрома c и белка Араф-1. Появление белков в цитоплазме — достаточное условие для активации каспазы-9, которая способна стимулировать активность исполнительных каспаз. В случае апоптоза нарушение функционирования митохондрий обусловлено активацией белков-гомологов CED-9 (Бах, Bad, Bid), обладающих свойствами каналоформеров. Димеризация этих белков с другими представителями семейства CED-9 (Bcl-2, Bcl-X) блокирует их проапоптотические свойства. В. П. Скулачев предположил, что активация каспаз, приводящая к деструкции апоптотических клеток, является одной из составляющих в действии гомологов Бах как антиоксидантов.

Опухолевые трансформации делают клетку менее чувствительной или совсем нечувствительной к сигналам, вызывающим апоптоз. Например, прекращение кормления детей у мыши-самки приводит к апоптозу нормальных клеток ее молочной железы, но не вызывает гибели клеток доброкачественной и злокачественной опухоли этого органа.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Основной

- Рубин А. Б.** Биофизика: В 2 т. Т. 2. Биофизика клеточных процессов: Учеб. для вузов. 2-е изд., испр. и доп. М.: Книжный дом «Университет», 2000. 468 с.
- Рубин А. Б.** Лекции по биофизике: Учеб. пособие. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1994. 160 с.

Дополнительный

- Артюхов В. Г.** Биофизика: Учеб. пособие / В. Г. Артюхов, Т. А. Ковалева, В. П. Шмелев. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1994. 336 с.
- Биофизика / Ю. А. Владимиров, Д. И. Рошупкин, А. Я. Потапченко, А. И. Дев. М.: Медицина, 1983. 272 с.
- Биофизика / П. Г. Костюк, Д. М. Гродзинский, В. Л. Зима и др. Киев: Выща шк., 1988. 504 с.
- Биофизика: Учеб. для вузов / В. Ф. Антонов, А. М. Черныш, В. И. Пасечник и др. М.: Владос, 2000. 288 с.
- Введение в биомембранологию: Учеб. пособие / А. А. Болдырев, С. В. Котельцев, М. Ланио и др. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1990. 208 с.
- Геннис Р.** Биомембраны. Молекулярная структура и функция. М.: Мир, 1997.
- Кейнс Р. Д.** Ионные каналы в мембране нервной клетки // Молекулы и клетки. М., 1982. Вып. 7. С. 176 — 190.
- Кольс О. Р.** Биофизика ритмического возбуждения / О. Р. Кольс, Г. В. Максимов, Ч. Н. Раденович. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1993. 208 с.
- Кольс О. Р.** Ритмическое возбуждение в соматических нервах. Физико-химические аспекты / О. Р. Кольс, Г. В. Максимов. М.: Наука, 1987. 176 с.
- Колев С. В.** Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. Минск: Наука и техника, 1987. 240 с.
- Крепс Г. М.** Липиды клеточных мембран. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1981. 340 с.
- Ленинджер А.** Основы биохимии: В 3 т. М.: Мир, 1985. Т. 1 — 3.
- Максимов Г. В.** Транспорт ионов кальция при функционировании нервного волокна: механизмы и регуляция / Г. В. Максимов, С. Н. Орлов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1994. 88 с.
- Молекулярная биология клетки: В 3 т. / Б. Албертс, Д. Врей, Дж. Льюис и др. М.: Мир, 1994. Т. 1 — 3.
- Основы физиологии / Под ред. П. Стерки. М.: Мир, 1984. 558 с.
- Скулачев В. П.** Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989.
- Ходжкин А.** Нервный импульс М.: Мир, 1965. 126 с.
- Ходоров Б. И.** Общая физиология возбудимых мембран. М.: Наука, 1975. 406 с.
- Шеперд Г.** Нейробиология. М.: Мир, 1987. Т. 1. 456 с.
- Энциклопедия. Современное естествознание. Общая биология. М.: Магистр-Пресс, 2000. Т. 2. 343 с.

СПРАВОЧНЫЙ МАТЕРИАЛ

ЛАТИНСКИЙ АЛФАВИТ

Печатные буквы	Рукописные буквы	Название	Печатные буквы	Рукописные буквы	Название
<i>A a</i>	<i>А а</i>	а	<i>N n</i>	<i>ℕ n</i>	эн
<i>B b</i>	<i>В bb</i>	бе	<i>O o</i>	<i>О о</i>	о
<i>C c</i>	<i>С с</i>	це	<i>P p</i>	<i>Р р</i>	пэ
<i>D d</i>	<i>Д d</i>	де	<i>Q q</i>	<i>Q q</i>	ку
<i>E e</i>	<i>Е e</i>	е	<i>R r</i>	<i>℞ r</i>	эр
<i>F f</i>	<i>ℱ f</i>	эф	<i>S s</i>	<i>Ѕ s</i>	эс
<i>G g</i>	<i>ℊ g</i>	ге	<i>T t</i>	<i>℥ t</i>	тэ
<i>H h</i>	<i>ℋ h</i>	аш	<i>U u</i>	<i>℥ u</i>	у
<i>I i</i>	<i>ℐ i</i>	и	<i>V v</i>	<i>℥ v</i>	ве
<i>J j</i>	<i>ℑ j</i>	йот	<i>W w</i>	<i>℥ w</i>	дубль-ве
<i>K k</i>	<i>℔ k</i>	ка	<i>X x</i>	<i>℥ x</i>	икс
<i>L l</i>	<i>ℓ l</i>	эль	<i>Y y</i>	<i>℥ y</i>	игрек
<i>M m</i>	<i>ℓ m</i>	эм	<i>Z z</i>	<i>℥ z</i>	зет

ГРЕЧЕСКИЙ АЛФАВИТ

Печатные буквы	Рукописные буквы	Название	Произно- шение	Латинская транскрипция
Α α	Α α	альфа	а	a
Β β	Β β	бета	б	b
Γ γ	Γ γ	гамма	г	g
Δ δ	Δ δ	дельта	д	d
Ε ε	Ε ε	эпсилон	э	e
Ζ ζ	Ζ ζ	дзета	дз	z
Η η	Η η	эта	э	ē
Θ θ	Θ θ	тхэта	тх	th
Ι ι	Ι ι	йота	и	i
Κ κ	Κ κ	каппа	к	c
Λ λ	Λ λ	ламбда	л	l
Μ μ	Μ μ	мю	м	m
Ν ν	Ν ν	ню	н	n
Ξ ξ	Ξ ξ	кси	кс	x
Ο ο	Ο ο	омикрон	о	o
Π π	Π π	пи	п	p
Ρ ρ	Ρ ρ	ро	р	r
Σ σς	Σ σς	сигма	с	s
Τ τ	Τ τ	тау	т	t
Υ υ	Υ υ	ипсилон	ю	y
Φ φ	Φ φ	фи	ф	ph
Χ χ	Χ χ	хи	х	ch
Ψ ψ	Ψ ψ	пси	пс	ps
Ω ω	Ω ω	омега	о	ō

**МНОЖИТЕЛИ И ПРИСТАВКИ
ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ ДЕСЯТИЧНЫХ КРАТНЫХ
И ДОЛЬНЫХ ЕДИНИЦ И ИХ НАИМЕНОВАНИЙ**

Число	Приставки		
	Наименование	Обозначение	
		русское	международное
$1\,000\,000\,000\,000\,000\,000 = 10^{18}$	экса	Э	E
$1\,000\,000\,000\,000\,000 = 10^{15}$	пета	П	P
$1\,000\,000\,000\,000 = 10^{12}$	тера	Т	T
$1\,000\,000\,000 = 10^9$	гига	Г	G
$1\,000\,000 = 10^6$	мега	М	M
$1\,000 = 10^3$	кило	к	k
$100 = 10^2$	гекто	г	h
$10 = 10^1$	дека	да	da
$0,1 = 10^{-1}$	деци	д	d
$0,01 = 10^{-2}$	санти	с	c
$0,001 = 10^{-3}$	милли	м	m
$0,000\,001 = 10^{-6}$	микро	мк	μ
$0,000\,000\,001 = 10^{-9}$	нано	н	n
$0,000\,000\,000\,001 = 10^{-12}$	пико	п	p
$0,000\,000\,000\,000\,001 = 10^{-15}$	фемто	ф	f
$0,000\,000\,000\,000\,000\,001 = 10^{-18}$	атто	а	a

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ ПОСТОЯННЫЕ

Название	Обозначение	Значение
Скорость света в вакууме	c	$2,9979 \cdot 10^8 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$
Элементарный электрический заряд	e	$1,6022 \cdot 10^{-19} \text{ А} \cdot \text{с}$
Постоянная Планка	h	$6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ Дж} \cdot \text{с}$
Постоянная Больцмана	k	$1,3806 \cdot 10^{-23} \text{ Дж} \cdot \text{К}^{-1}$
Электрическая постоянная	ϵ_0	$8,8542 \cdot 10^{-12} \text{ А} \cdot \text{с} \cdot (\text{В} \cdot \text{м})^{-1}$
Число Авогадро	N_A	$6,0222 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1}$
Постоянная Фарадея	F	$9,6487 \cdot 10^4 \text{ А} \cdot \text{с} \cdot (\text{г} \cdot \text{экв})^{-1}$
Универсальная газовая постоянная	R	$8,3143 \text{ Дж} \cdot \text{К}^{-1} \text{ моль}^{-1}$
Ускорение свободного падения на Земле (стандартное значение)	g	$9,8066 \text{ м} \cdot \text{с}^{-2}$

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
Глава 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ КЛЕТКИ	7
1.1. Основные структуры и органеллы клетки	10
1.2. Основные типы клеток	11
1.2.1. Клетки животных	11
1.2.2. Клетки растений	13
1.3. Методы исследования клеток	13
1.3.1. Метод электронной микроскопии	13
1.3.2. Метод флуоресцентных зондов	15
1.3.3. Метод восстановленной флуоресценции после фотоотбеливания	16
1.3.4. Метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии	18
1.3.5. Метод спектроскопии комбинационного рассеяния	19
1.3.6. Микроспектроскопия комбинационного рассеяния	22
1.3.7. Метод динамической фазовой микроскопии	22
Глава 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ	24
2.1. Методы исследования биологических мембран	26
2.1.1. Выделение и характеристика мембранных фракций	27
2.1.2. Исследование структурной организации мембран	28
2.2. Состав и структура биологической мембраны	32
2.2.1. Мембранные липиды	33
2.2.2. Фазовые переходы в липидном бислое	38
2.2.3. Мембранные белки	41
2.3. Плазматическая мембрана	43
Глава 3. ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ КЛЕТКИ	48
3.1. Проницаемость и транспорт веществ в биологических мембранах	48
3.1.1. Методы изучения проницаемости	48
3.1.2. Пассивный и активный транспорт веществ через мембрану	50
3.1.2.1. Пассивный транспорт	52
Диффузия	52
Осмоз и фильтрация	60
Механизмы транспорта ионов и веществ в клетку	62
3.1.2.2. Активный транспорт	66
Na, K-АТФ-аза	67

Ca-АТФ-аза	72
К, Н-АТФ-аза	72
Хемиосмотическая теория Митчелла	74
3.2. Биоэлектрические явления	77
3.2.1. Физико-химические основы возникновения биопотенциалов	78
3.2.1.1. Физико-химические процессы формирования мембранного потенциала	78
3.2.1.2. Потенциал покоя	81
3.2.1.3. Потенциал действия	84
3.2.2. Распространение возбуждения	91
3.2.2.1. Проведение потенциалов действия (теория местных токов)	92
3.2.2.2. Факторы, определяющие скорость проведения потенциала действия	94
3.2.3. Ионный канал	97
3.2.4. Поверхностный потенциал клеточной мембраны	100
3.2.5. Потенциалзависимые каналы	104
3.2.5.1. Потенциалзависимый натриевый канал	104
3.2.5.2. Потенциалзависимый калиевый канал	107
3.2.5.3. Потенциалзависимый кальциевый канал	108
3.2.6. Синтез ионных каналов	111
3.2.7. Энергообеспечение проведения возбуждения	112
3.3. Клеточная рецепция	116
3.3.1. Клеточная гормональная рецепция	116
3.3.2. Клеточная фоторецепция	120
3.3.2.1. Зрение	120
3.3.2.2. Фотосинтез	122
3.4. Клеточная подвижность	126
3.4.1. Мышечное сокращение	126
3.4.1.1. Модель скользящих нитей	126
3.4.1.2. Элементарный акт мышечного сокращения	128
3.4.1.3. Рабочий цикл актомиозинового комплекса	129
3.5. Клеточные механизмы иммунитета	132
3.6. Клеточные механизмы перестройки белков	134
3.7. Сверхслабое свечение клеток	136
Г л а в а 4. КЛЕТОЧНАЯ И МЕМБРАННАЯ ПАТОЛОГИЯ	140
4.1. Перекисное окисление липидов	140
4.2. Гипертония	141
4.3. Сахарный диабет	142
4.4. Демиелинизация	144
4.5. Стресс	144
4.6. Апоптоз	145
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	149
СПРАВОЧНЫЙ МАТЕРИАЛ	150

Учебное издание

**РЕВИН Виктор Васильевич
МАКСИМОВ Георгий Владимирович
КОЛЬС Ольга Романовна**

БИОФИЗИКА

Учебник

Редактор *Р. Н. Бусарова*
Технический редактор *Т. А. Сальникова*
Корректоры *Т. В. Некрасова, Ж. В. Митькова*
Компьютерная верстка *А. С. Бондарь*

Подписано в печать 26.11.02. Формат 60 × 84 1/16. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Гарнитура Петербург. Усл. печ. л. 9,07.
Уч.-изд. л. 8,83. Тираж 1 200 экз. Заказ № 1926.

Издательство Мордовского университета
Типография Издательства Мордовского университета
430000 Саранск, ул. Советская, 24

Список опечаток

С. 53, 2-й абзац сверху.

x^{-2} , а надо x^{-2}

С. 119, рис. 3. 38.

В надписи на рисунке справа стоит:

Постси-	Постси-
наптичес-	наптичес-
кая клетка , а надо:	кая мембрана

Список сокращений:

ДАГ- диацилглицерол

ИФ - инозитолфосфат

КМ - калмодулин

ПК-С -протеинкиназа-С