

ЧТО ЗНАЧИТ ВЗЯТЬСЯ НЕ С ТОГО КОНЦА

Так называемый «сложный микроскоп» изобрели приблизительно в 1609 году независимо друг от друга Захария Янссен (ок. 1588—ок. 1631) и Галилео Галилей (1564—1642) [367]. Роберт Гук (1635—1703), по отзывам современников, «человек не только выдающегося таланта изобретателя, но и незаурядных добродетелей» [459, 3 р. 295], при помощи этого микроскопа обнаружил в куске коры пробкового дерева мельчайшие заполненные воздухом полости, которые и назвал *клетками*. Он еще раз использовал это слово в своем сборнике микроскопических наблюдений «Микрография» (“Micrographia”) [368], вышедшем в 1665 году, где назвал клетками наполненные жидкостью полости, найденные в сердцевине моркови, а также в фенхеле, папоротнике и других растениях. Гук считал, что по этим «клеткам» осуществляется сообщение между различными частями растения.

Десятилетие спустя Антони ван Левенгук (1632—1723), исследуя под однолинзовым микроскопом водный экстракт острого перца в поисках причины его жгучести, увидел крошечные анималькулы (бактерии) [367]. Правда, он не мог заключить, что каждая анималькула представляет собой *отдельную клетку*: помимо прочих причин, само слово «клетка» тогда имело значение, далекое от нынешнего.

С конца XVII века до начала XIX фактически не существовало общепринятого понимания термина «клетка». Фон Галлер [309, р. 393], Грю [3, р. 380] и, позднее, Бриссо-Мирбель [460], как и сам Гук, называли клетками полости или пространства биологического объекта, заполненные жидкостью. Мальпиги и Мольденгавер настаивали, что клетки являются замкнутыми мешочками [3, р. 180—184].

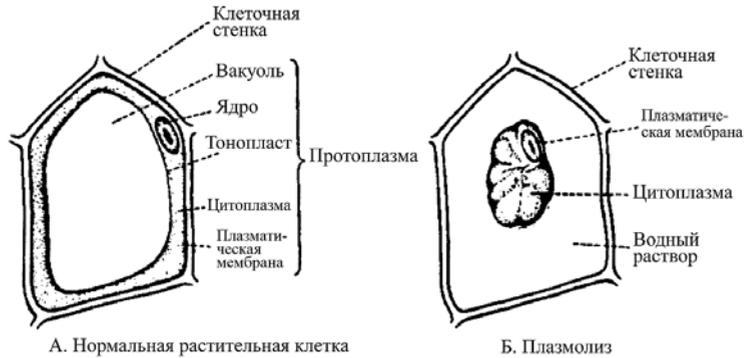
Переключение внимания ученых с формы клеток на их содержимое завершилось в 1805 году, когда Готфрид Тревиранус показал, что две соседние клетки почки лютика разделены не одной, а двумя мембранами, так что могут быть разъединены без нарушения их целостности [461]. Именно после этого открытия мнение о клетке как о самостоятельном объекте стало главенствующим. Однако вряд ли можно в полном смысле слова сказать, что одна точка зрения одержала победу над другой: ученые спорили просто о разных структурах [462, 463]. Одни сосредоточили свое внимание на срезах тканей, позже названных ксилемой и флоэмой; другие — на тех самых клетках, о которых мы сейчас так много знаем.

В период с 1835 по 1840 год официально существовали две основные биологические концепции: клеточная теория Теодора Шванна [1, 335], утверждавшая клетки основными структурными единицами

всех животных и растений, и *саркода* Феликса Дюжардена [2] — еще более мелкая структурная единица жизни. Безотносительно исторической значимости каждой из этих концепций, ни одна из них не возникла на пустом месте (см. главу 2 и рис. 72).

Любимым объектом первых микроскопических исследований живых существ с легкой руки Роберта Гука были зрелые растительные клетки. Больших размеров, с четкими границами, всегда доступные для исследования, длительно сохраняющиеся, — они казались прекрасным материалом для клеточных изысканий. Увы, видимая доступность таила в себе западню, открывшуюся лишь в наши дни.

Рис. 1. Плазмолиз зрелой растительной клетки. **А** — нормальная клетка с центральной вакуолью. **Б** — протопласт, твердая клеточная оболочка, содержащая сжавшуюся в гипертоническом растворе цитоплазму с ядром и другими органеллами, заключенную в плазматическую мембрану. (По Гласстону [13])



Внимание Шванна было сосредоточено именно на зрелых растительных клетках [1]. Объектом же исследований Дюжардена были существа, называвшиеся тогда *Infusoria* [323], а ныне известные как простейшие. При повреждении этих одноклеточных организмов из них истекала студенистая, не смешивающаяся с водой субстанция, описанная Дюжарденом как *gelee vivante* (живое желе) и названная *саркодой* [2].

По мнению Шванна, мембраны, окружающие клетку и ядро, являлись гораздо более важной частью клетки по сравнению с жидкостью (*Zwischenraum*), заполнявшей пространство между ними [3, p. 193—194]. А зрелая растительная клетка, изображенная на рис. 1А, напоминает слова Шванна об «одной пустой клетке внутри другой» [3, p. 193]. Однако, в отличие от зрелых, молодые растительные клетки практически лишены вакуолей, как и животные клетки, и представляют собой сплошную массу живого вещества. Через десяток лет после того, как Дюжарден ввел понятие саркоды, два ботаника, Карл фон Негели и Гуго фон Моль, описали вязкую жидкость в молодых растительных клетках, которую фон Моль назвал *протоплазмой* [6, 7]. Во внушительном сравнительном исследовании Фердинанд Кон показал, что саркода животных и протоплазма растений — одно и то же [8]. Вследствие этого Роберт Ремак предложил и то и другое именовать *протоплазмой* [9].

Появление более совершенных микроскопов не только расширило диапазон доступных для исследования клеток, но и повысило точность наблюдений. В результате появились новые взгляды на природу *типичной* клетки. Так, Франц Лейдиг в 1857 году провозгласил: «Содержимое клетки имеет более высокий ранг, чем мембрана» [10]. А в 1861 году Максом Шульце (1825—1874) была впервые провозглашена его знаменитая «протоплазматическая доктрина»: клетки — это «голые комочки протоплазмы, содержащие ядро» [11].

Ни Лейдиг, ни Шульце не признавали существование мембраны, окружающей клетку и отличающейся от протоплазмы по химическим свойствам [3, р. 200].

К концу XIX века гистологи договорились считать большинство клеток по своей природе *сплошными* телами. А в 1928 году Эдмунд Бичер Уилсон, представляя свой эпохальный труд «Клетка и ее роль в развитии и наследственности», подчеркнул неверность самого термина «клетка»: клетки, «как правило, представляют собой отнюдь не пустые полости, как могло бы показаться из названия, а сплошные тела» [12, р. 4].

ФИЗИОЛОГИ ПОВТОРЯЮТ ОШИБКИ МОРФОЛОГОВ

До сих пор мы говорили о структуре клетки, ее анатомии. Как уже сказано выше, изучением функционирования клеток занимается *физиология клетки*. Однако осмыслить клеточные функции можно, лишь познав ее *анатомию*, которой занимается *морфология*. И, конечно, при неправильном понимании строения клетки немислимо правильное понимание ее физиологии.

В идеале начинать исследования физиологии клетки следовало бы лишь *после* досконального изучения ее структуры. На практике же исследования физиологов *намного опередили* даже осознание того факта, что клетка является сплошным телом. Нечего и удивляться, что внимание первых физиологов, как и первых морфологов, привлекали зрелые растительные клетки. В результате физиологи совершили ту же ошибку — распространили свойства, обнаруженные у достаточно нетипичной зрелой растительной клетки, на клетку вообще. При таких взглядах адекватной моделью любой клетки мог бы служить, например, наполненный жидкостью мочевого пузыря свињи, как это и произошло в описываемом ниже случае.

Аббат Нолле (1700—1770), наставник короля Франции Людовика XV в области естественных наук, научный оппонент Бенджамина Франклина (1706—1790) в его взглядах на электричество, первым осуществил эксперимент с *осмосом* в 1748 году. Нолле, погружая в воду свиной мочевого пузырь, наполненный смесью воды и этилового спирта, обнаружил, что вода проникала через стенку пузыря внутрь, в то время как спирт не мог выйти наружу [13, р. 651]. Так было открыто необычное свойство стенки мочевого пузыря, которое позднее Вант-Гофф (1826—1894) назвал *полупроницаемостью* [14]. Открытие Нолле также стало основой для судьбоносного эксперимента на искусственных мембранах Морица Траубе. Тем не менее, интерпретация опытов Нолле и опытов Траубе, описываемых в следующей главе, дала ученым ложный след в понимании свойств живой клетки.

Первыми физиологами, ставившими опыты на живых клетках, были Рене Дютроше (1776—1847) [3, р. 184—188] и Вильгельм Пфедфер (1845—1920) [15, р. 10—11]. Оба были ботаниками, и оба работали в основном со зрелыми растительными клетками. Подобно Жану Батисту Ламарку (1744—1829) [308] и Лоренцу Окену (1779—1851) [5], Дютроше считал клетку основной единицей жизни еще до того, как к этому заключению пришел Теодор Шванн и Матиас Шлейден (1804—1881) [3, р. 188—189].

Движение, согласно взглядам Дютроше, было жизнью, а его прекращение — смертью. Изучая движение воды **внутри** зрелых растительных клеток и из них наружу, он назвал эти процессы соответственно эндосмосом и экзосмосом [16]. Приставки были впоследствии отброшены, и с тех пор самопроизвольное движение воды в клетку или из нее, а также в соответствующих искусственных системах называется *осмосом*.

Из предыдущей главы мы узнали, что морфологи довольно быстро поняли, что клетка вовсе не является лишь полостью, заполненной жидкостью. Но физиологи, в отличие от них, долго пребывали в заблуждении на этот счет даже после того, как гистологи пересмотрели свои взгляды. Более того, это застаревшее заблуждение продолжает владеть их умами по сей день! Как старая мембранная теория, так и ее современная модификация — теория мембранных насосов — изображали и изображают клетку всего лишь раствором веществ, заключенным в мембрану.

РОЖДЕНИЕ МЕМБРАННОЙ ТЕОРИИ

Мориц Траубе (1826—1894), торговец и естествоиспытатель-любитель из Берлина, однажды сделал простое, но ставшее историческим открытие [17]. Оказывается, если каплю раствора сульфата меди привести в соприкосновение с каплей раствора ферроцианида калия, то по линии их контакта образуется тончайшая пленка красновато-коричневого преципитата — ферроцианида меди. При этом дальнейшая преципитация прекращается, так как образовавшаяся пленка препятствует перемещению ионов меди и ферроцианида навстречу друг другу.

Траубе опубликовал свои наблюдения в 1867 году [17]. Их значение сразу же оценил Вильгельм Пфедфер. Он провел преципитацию ферроцианида меди в пористой стенке фарфорового цилиндра, в результате чего вместо хрупкой пленки Траубе была получена прочная экспериментальная модель мембраны, сопротивлявшаяся не только перемещению ионов, но даже механическому давлению. Помещая растворы сахарозы различных концентраций по разные стороны ферроцианидной мембраны, «армированной» керамикой, Пфедфер обнаружил, что вода перемещается через нее из разбавленного раствора в более концентрированный [18], что соответствовало результатам опытов аббата Нолле на импровизированной мембране, полученной из мертвого животного, и Дютроше — на живых зрелых растительных клетках.

Пфедфер также обнаружил, что такое осмотическое движение воды можно прекратить, приложив достаточное механическое давление со стороны более концентрированного раствора сахарозы (величина необходимого давления была названа *осмотическим давлением*). Было показано, что, если с одной стороны мембраны помещать растворы сахарозы различных концентраций, а с другой — воду, или же при равных концентрациях сахарозы менять температуру одного из растворов, осмотическое давление (π) изменяется прямо пропорционально концентрации (С) или абсолютной температуре (Т) соответственно [18].

Голландский ботаник Хуго де Врис (1848—1935), основоположник одной из важнейших теорий генетики — *теории мутаций* [363, р. 34], привлек к необычным открытиям Пфедфера внимание Якоба Хендрика Вант-Гоффа, физико-химика, чье имя уже звучало на страницах этой книги. Вант-Гофф тут же заметил, что уравнения, описывающие каждую из открытых Пфедфером взаимосвязей, аналогичны уравнениям, описывающим поведение идеального газа

($PV = RT$, где P — давление, приложенное к занимающему объем V идеальному газу при абсолютной температуре T , а R — газовая постоянная), то есть

$$\pi V = R'T, \quad (1)$$

где V — объем раствора, содержащего один моль сахарозы, равный поэтому $1/C$ (C — концентрация сахарозы в молях/л); π — осмотическое давление; T — абсолютная температура; R' — константа. Подставив полученные Пфеффером в своих опытах значения π , V ($= 1/C$) и T в уравнение (1), Вант-Гофф вычислил константу R' , значение которой оказалось близким к газовой постоянной R ($1,987 \text{ кал} \cdot \text{град}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$).

Природу осмотического давления Вант-Гофф попытался объяснить так называемой *теорией бомбардировки*. Подчеркивая аналогию уравнения Вант-Гоффа (1) соответствующему уравнению для идеального газа, он писал: «В одном случае давление создают удары молекул газа о стенки сосуда, в другом — удары молекул растворенного вещества о полупроницаемую мембрану» [13, р. 664; 14] (о неожиданных последствиях такого понимания сказано в разделе 11.3, п. 7).

Таким образом, тщательное изучение Пфеффером осмотического давления подготовило почву для *теории растворов* Вант-Гоффа. Дальнейшие эксперименты Пфеффера как на моделях, так и на зрелых растительных клетках позволили ему сформулировать теорию функционирования клеток растений, позднее ставшую известной как *мембранная теория* Пфеффера.

Главный труд Пфеффера вышел в 1877 году под названием «*Osmotische Untersuchungen*» («Осмотические исследования») [18]. Одна из главных идей книги заключается в том, что периферический слой протоплазмы — «*Plasmahaut*» (дословно — «*протоплазматическая кожа*») [404, р. 879], или *плазматическая мембрана*, является не только поверхностью клетки, но и покрывает любую каплю протоплазмы, пришедшую в соприкосновение с «*другим* водным раствором» [18, р. 234]. Также высказывается мысль о сходстве свойств плазматической мембраны со свойствами медно-ферроцианидной мембраны Траубе, и что именно таким вездесущим плазматическим мембранам все клетки обязаны своими осмотическими свойствами и полупроницаемостью.

В «Осмотических исследованиях» Пфеффер не характеризует физико-химическую природу содержимого клетки. Он также не упоминает в книге имя Шванна. Однако то тут, то там проскальзывают фразы, дающие понять, что Пфеффер, как и Шванн, наделял клеточное содержимое свойствами обычного водного раствора. В только что процитированном тексте он говорит о водном растворе, соприкасающемся с протоплазмой, как о «*другом* водном растворе». А в конце второй и заключительной части книги, названной «*Физиологической*», он приводит такие слова: «Поскольку протоплазма и от вакуолей отделена плазматической мембраной, клетку по осмотическим

характеристикам можно сравнить с системой из двух клеток, меньшая из которых находится внутри большей» [18, 1985, р. 235]. Это явно напоминает слова Шванна об «одной пустой клетке внутри другой пустой клетки», хотя здесь меньшая «клетка» наполнена *водным раствором* (клеточным соком), а большая — *протоплазмой*. Если Пфеффер и подразумевал наличие неких коренных различий между этими двумя веществами, то в своей книге он об этом ничего не сказал.

Авторство мембранной теории обычно приписывается Пфефферу, однако сам термин «мембранная теория» не фигурирует ни в его «Осмотических исследованиях», опубликованных в 1877 году, ни во втором издании, которое вышло без каких-либо изменений в 1921 году, когда Пфеффер уже давно «удалился» от исследований осмоса [18, р. 22—23].

Давняя традиция представлять клетку пузырьком с жидкостью и впечатляющая теория растворов Вант-Гоффа выглядели вместе несокрушимым фундаментом мембранной теории. Первые исследования осмоса, а также данные ученых из других областей клеточной физиологии только подтверждали ее правоту. Среди этих ученых автор мембранной теории электрических потенциалов клетки *Юлиус Бернштейн* [19], а также автор теории равновесного распределения ионов по обе стороны мембраны и возникающего при этом электрического потенциала *Фредерик Доннан* [20]. Однако их представления и подкреплявшие эти представления факты подтверждали мембранную теорию лишь постольку, поскольку ее создатели исходили из предпосылки фундаментального характера, — что клетки представляют собой мембранные емкости, заполненные разбавленным раствором электролитов.

Все эти теории и представления, переплетавшиеся в сознании ученых того времени, сделали мембранную теорию первой логически последовательной общей теорией в физиологии клетки. Эта теория, предельно упростив природу живой клетки, низведя ее до простых окруженных мембраной полостей, заполненных раствором солей и органических веществ, оказалась способной объяснить четыре фундаментальных проблемы физиологии клетки:

регуляцию клеточного объема,
избирательное распределение растворенных веществ между клеткой и средой,
избирательную проницаемость,
электрические потенциалы клеток.

В следующей, четвертой главе, мы сначала рассмотрим основные экспериментальные данные, рассматриваемые как доказательства истинности мембранной теории, и особо остановимся на объяснениях полупроницаемости клеточной мембраны, а затем увидим, как выглядят эти «доказательства» при более внимательном анализе.

Факты, которыми обосновывалось наличие якобы свободной воды и свободных ионов K^+ внутри клетки, будут рассмотрены в пятой главе.

ЧТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О ТОМ, ЧТО ЛЮБАЯ КЛЕТКА ПОКРЫТА МЕМБРАНОЙ?

Ниже следует сводка данных, рассматриваемых многими как очевидные доказательства существования клеточной мембраны у любой клетки.

4.1. Изменения объема клеток и проницаемости мембран

Наблюдения над изменением объема клеток стали исторически первыми экспериментальными исследованиями в физиологии клетки и были посвящены изучению закономерностей проникновения воды в клетку и из клетки в среду. Согласно мембранной теории, экспериментальные данные о водном обмене явно указывают на наличие у клеток мембран, важнейшим свойством которых является способность свободно пропускать воду и пропускать или задерживать растворенные вещества. Рассмотрим эти данные.

1. Полупроницаемый диффузионный барьер на поверхности клетки

Чемберс Р. и Чемберс Э. Л. показали, что исследованные ими витальные красители неспособны самостоятельно проникать внутрь клетки или выходить из нее (если их ввести в клетку микропипеткой): равномерно распределяясь по цитоплазме, движение красителя прекращается у поверхности клетки, которая препятствует его выходу в среду [22].

2. Плазмолиз

Если поместить зрелую растительную клетку в концентрированный раствор поваренной соли (NaCl) или тростникового сахара (сахарозы), содержимое клетки — *протопласт* (термин введен фон Ханштейном [27]) — сжимается, отслаиваясь от клеточной стенки (рис. 1В). Степень сжатия зависит от концентрации раствора. Это явление подробно изучено Хуго де Врисом [28] и известно под названием *плазмолиз*.

В 1871 году де Врис заметил, что *протопласт* клеток корня свеклы, помещенный в концентрированный раствор хлорида натрия, остается съжившимся сутками [24]. Он сделал вывод, что плазматические мембраны таких клеток *абсолютно непроницаемы* для NaCl. В контексте мембранной теории это наблюдение приобретает решающее значение. Ведь в нем воплощен основной постулат мембранной теории: для вещества, вызывающего стойкое сморщивание клетки, мембрана должна быть *непроницаема абсолютно и перманентно*.

4.1. Изменения объема клеток и проницаемости мембран

4.2. Мембранная теория электрических потенциалов Бернштейна

4.3. Теория распределения ионов и мембранного потенциала Доннана

Чтобы понять всю важность и логическую необходимость этого постулата, подумаем вот о чем. Многие клетки позвоночных на протяжении всей своей жизни, которая длится порой 100 и более лет, погружены в тканевую жидкость, основным осмотически активным компонентом которой является NaCl. Отсюда вывод: если бы NaCl проникал в клетку, пусть и с незначительной скоростью, то рано или поздно клетка была бы насквозь «просолена», потеряла бы осмотическое равновесие со средой и, в конце концов, погибла бы. Так что мембрана клетки должна быть *совершенно* непроницаемой для NaCl.

Кульминацией в истории изучения плазмолиза стал 1918 год, когда К. Хёфлер [29] изобрел способ *количественного* определения объема сжавшегося протопласта (рис. 1В). С его помощью он показал, что в зрелых клетках растения *Tradescantia elongata* произведение объема протопласта V и концентрации сахарозы в окружающей среде C близко к константе. Неизменность произведения VC была принята как решающее количественное доказательство истинности мембранной теории. Действительно, наличие константы доказывает, что клетка в растворах с различной концентрацией непроницающих веществ (таких, как сахароза) ведет себя как *совершенный осмометр* [30].

Однако дальнейшие опыты заставили Хёфлера пересмотреть первоначальные выводы [31]. Он обнаружил, что совершенным осмометром является вовсе не вся клетка, а только ее центральная вакуоль. Лишь в отношении этого образования справедливо утверждение о неизменности произведения VC в растворах различной осмотичности. Эта находка нанесла первый серьезный удар по мембранной теории.

Сахароза в высоких концентрациях приводит к существенному уменьшению размеров центральной вакуоли. Это факт. Однако это явление не могло бы иметь места, если бы сахароза не проникла сначала в цитоплазму клетки, которая со всех сторон окружает центральную вакуоль. А это, в свою очередь, говорит о том, что сахароза должна была пройти через плазматическую мембрану прежде, чем оказаться в цитоплазме. Следовательно, клеточная мембрана *проницаема* для сахарозы, что в корне противоречит основному догмату мембранной теории, что вещество (такое, как сахароза), вызывающее столь эффективный плазмолиз, не способно преодолеть мембранный барьер.

По данным других исследований, в достаточно концентрированном растворе электролита (например, соли калия) цитоплазма может даже разбухать, в то время как центральная вакуоль при этом сжимается [32]. И это наблюдение мембранная теория также неспособна объяснить.

3. Переходные и устойчивые изменения объема клеток

Как я уже отметил, хлорид натрия — основной и вездесущий компонент тканевой жидкости у всех позвоночных. Чарльз Э. Овер-

тон, дальний родственник Чарльза Дарвина, в 1902 году продемонстрировал, что изолированная портняжная мышца лягушки — тонкая плоская мышца на внутренней поверхности бедра, названная так за то, что в прежние времена была особенно развита у портных — длительное время сохраняет свою обычную массу в 0,7% растворе NaCl [25]. Раствор NaCl такой концентрации был назван Х. Гамбургером *изотоническим*, а растворы более высоких и более низких концентраций — соответственно *гипертоническими* и *гипотоническими* [26]. При добавлении в 0,7% раствор NaCl метанола до 5 об.%, масса погруженной в него мышцы по сравнению с чистым 0,7% раствором NaCl также не изменялась. Однако в растворе, содержащем 3% этиленгликоля и 0,35% NaCl, мышца сначала съеживалась, а затем ее масса начинала медленно увеличиваться и становилась больше исходной; почти так же она набухла и в чистом 0,35% растворе NaCl.

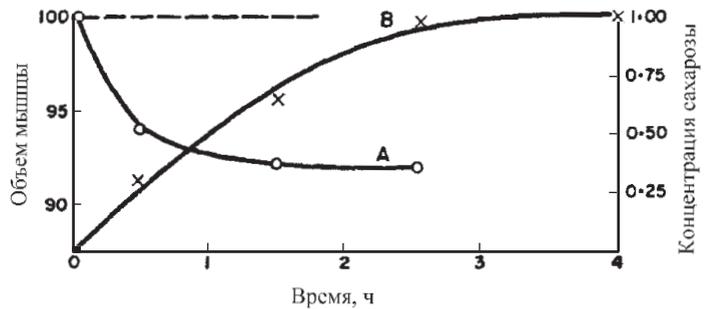
Этому предлагались следующие объяснения: метиловый спирт, как и вода, хорошо проникает через клеточную мембрану. Поэтому его добавление к изотоническому раствору NaCl (если пренебречь снижением концентрации NaCl при разбавлении спиртом) не изменяет массу мышцы. Этиленгликоль также хорошо проникает через мембрану, но хуже метанола. Поэтому добавление этиленгликоля сначала вызывает сжатие клетки, а затем, по мере его проникновения внутрь, масса клетки возвращается к исходной, а затем и превышает ее. В растворах с содержанием NaCl более 0,7% или содержащих 0,7% NaCl и 3% глюкозы, мышца сжимается и остается сморщенной длительное время. Эти наблюдения расценивались как еще одно доказательство основного положения мембранной теории: *лишь в концентрированных растворах веществ, для которых клеточная мембрана абсолютно и перманентно непроницаема (таких, как NaCl или глюкоза), может возникнуть стойкое сморщивание клетки*. Однако позднее такое понимание осмотических явлений столкнулось с непреодолимыми трудностями.

В 1937 и 1938 годах советские ученые Д. Н. Насонов, Э. И. Айзенберг [33] и И. Е. Камнев [34] сделали открытие, ставя незамысловатые эксперименты. С одной стороны, они продемонстрировали, что мышца лягушки в изотоническом растворе Рингера с добавлением 4% сахарозы сжимается до некоторой степени (рис. 2, кривая А), что и следовало ожидать, согласно мембранной теории. Однако, с другой стороны, никак нельзя было ожидать, что по мере сжатия мышцы *сахароза проникает в сморщенные мышечные клетки и накапливается в них* (рис. 2, кривая В).

Проникновение сахарозы продолжалось вплоть до достижения диффузионного равновесия между клеткой и средой. При этом концентрация сахарозы внутри клетки оказывалась в итоге ниже, чем в окружающей среде, и оставалась на этом уровне в течение длительного времени (подробности см. в разделе 8.2).

Этот простой, однако невероятно значимый опыт доказал, что сахаразы, вызывающая сжатие клетки, на самом деле способна проникать через мембрану. Это открытие, как и более ранние наблюдения Хёфлера, опровергает основополагающий догмат мембранной теории, что устойчивое сморщивание клетки способны вызывать только вещества, для которых клеточная мембрана является непреодолимым препятствием. Длительное сморщивание, как выяснилось, могут вызывать и вещества, для которых мембрана проницаема.

Рис. 2. Уменьшение относительного объема мышцы лягушки (в процентах от исходного, левая ось ординат) в растворе Рингера с добавлением сахаразы (4%) с течением времени инкубации (А). Поступление сахаразы в мышцу лягушки из окружающего раствора (В); внутриклеточная концентрация дана в весовых процентах на 100 г тканевой воды (правая ось ординат). (По Насонову и Айзенберг [33], Камневу [34]).



В конце 30-х — начале 40-х годов, когда появились радиоизотопные технологии, физиология клетки вступила в новую эпоху расцвета. Ведь радиоактивные метки впервые дали возможность напрямую оценить проницаемость мембраны, — параметр, являющийся альфой и омегой мембранной теории (см. разделы 13.3 и 15.2, п. 1).

С одной стороны, данные табл. 1 подтверждают существование диффузионного барьера для меченых молекул сахаразы и NaCl: сразу после рассечения мышечных клеток лягушки скорость проникновения в них сахаразы через рану удваивается [23]. Однако они показывают и другое — меченые молекулы сахаразы способны проникать и в *неповрежденные* мышечные клетки. В ряде других экспериментов было недвусмысленно показано, что и другие вещества, подобные сахаразе [23, 35] и NaCl [36], способны проникать через клеточную мембрану. Таким образом, спустя 55 лет после опытов Хёфлера была окончательно доказана справедливость его выводов, а также выводов Насонова, Айзенберг и Камнева: вещества, проникающие через мембрану, *способны* вызывать стойкое сморщивание клетки в гипертонических средах. Тот элементарный факт, что живая

клетка способна поддерживать свой объем в изотонических растворах проникающих в нее веществ (NaCl, сахарозы и др.) опровергает один из важнейших постулатов мембранной теории о ключевой роли непроницаемости плазматической мембраны в осмотических явлениях.

Таблица 1

Скорость поступления в интактную клетку, мкмоль/г		Скорость поступления через поверхность сечения, мкмоль/г	
		свежая поверхность	после инкубации
Сахароза	0,073 ± 0,013	0,174 ± 0,031	0,168 ± 0,016 (24 часа)
Na ⁺	—	22,7 ± 2,5	22,3 ± 5,1 (51 час)

Экспериментальные данные, доказывающие, что на границе раздела цитоплазма/омывающий раствор, полученной отсечением части мышечной клетки, *регенерации мембраны* не происходит. Портняжную мышцу лягушки помещали в приспособление, показанное на рис. 7; ее дистальный конец, выступающий из-под силиконовой прокладки, осторожно и быстро срезали. В опытах с сахарозой, раневую поверхность мышечных клеток сначала экспонировали в обычный раствор Рингера без радиоактивной метки в течение 24 часов, а затем в раствор Рингера (при 25 °С), содержащий 10 мМ меченой сахарозы на 2 часа. Затем измеряли уровень метки, проникшей в клетки через поверхность сечения (контрольную, парную, мышцу сразу нагружали меткой без предварительной экспозиции в нормальный раствор Рингера). Таким же образом были проведены опыты и с интактными мышцами (которые также помещали в указанное приспособление), с тем, чтобы получить возможность сравнить их проницаемость с проницаемостью поверхности среза. Аналогичным образом исследовали поступление Na⁺ в указанные мышечные препараты. Но из-за сравнительно низкой скорости обмена клеточного Na⁺ на Na⁺ среды время нагрузки мышечных клеток меченым Na⁺ (погружением в 100 мМ раствор меченого NaCl) было увеличено с 2 до 24 часов. Соответственно время предшествующей этому инкубации в нормальном растворе Рингера было увеличено с 24 до 51 часа. (По Лингу [23]).

4. Регенерация мембраны

В 1855 году швейцарский ботаник Карл фон Негели (1817—1891) провел следующий опыт. Он растирал корневые волоски водного растения *Hydrocharis* [37], при этом из них выделялись мелкие капли вещества (цитоплазмы, как на рис. 3, b), не растворявшиеся в окружающей жидкости и не поглощавшие краситель, который был добавлен в омывающий раствор. Кроме того, эти капли, прямо как настоящие клетки, были способны осмотически набухать и сжиматься. Подобные же несмешиваемые с водой мельчайшие капли были описаны Вильгельмом Кюне (1837—1900) в его опытах на инфузории *Stentor* [38]. Наблюдения этих ученых были приведены Пфедфером в его «Осмотических исследованиях» в поддержку своей теории, что *клеточные мембраны способны мгновенно образовываться при кон-*

такте капля протоплазмы с водной средой. Эта мысль — неизбежная, если представлять себе содержимое клетки как раствор, впервые была высказана еще фон Негели [37], о чем Пфедфер не забыл упомянуть [18, р. 141]. Согласно Пфедферу, именно благодаря этой способности клеточных мембран быстро регенерировать, капли протоплазмы ведут себя как осмометры, подобно неповрежденным клеткам [18, 1-е изд., р. 127; 39, р. 92].

Однако Пфедфер в своей книге не упомянул имя Феликса Дюжардена, наблюдавшего то же явление и описавшего его как *утечку не смешиваемого с водой «живого желе»*, или саркоды [2]. Теория Дюжардена была проста: протоплазма не способна смешиваться

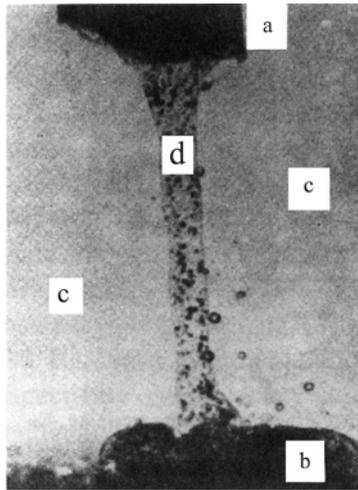


Рис. 3. Поток протоплазмы (эндоплазмы) (d) из разрезанной клетки *Nitella* (a) в экспериментальную среду (c). Видно, как протоплазма оседает на дно кюветы в виде сплюсненной капли (b). Фотография сделана через 5 минут после повреждения клетки. Такие капли эндоплазмы могут сохраняться в течение 10—50 часов в среде, содержащей 80 мМ KNO_3 , 50 мМ NaCl и 4 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. (По Куроде [63]).

с водой, подобно маслу. Пфедфер же предложил более сложную модель — мембранную. Пролить свет на эти противоречивые мнения были призваны исследования Кайта, опубликованные в 1913 году [40].

Кайт вводил микропипеткой витальные красители и другие вещества в цитоплазму различных клеток. Так, кислые красители при введении в яйцеклетку морской звезды *Asterias* скапливались лишь в пределах поврежденного микропипеткой участка цитоплазмы, не проникая в интактные области клетки. Дистиллированная вода, введенная в яйцеклетку морской звезды или в мышечную клетку саламандры *Necturus*, образовывала пузырек, медленно таявший в цитоплазме вплоть до своего исчезновения. Капля же гипертонического раствора соли со временем только увеличивалась в размере.

Эти и другие наблюдения заставили Кайта предположить, что цитоплазма всех клеток, а не только цитоплазма яйцеклеток морской звезды, обладает такими же осмотическими свойствами, что и целая клетка с ее мембраной. Более того, он пришел к заключению, что *непроницаемость или неполная проницаемость для красителей и*

кристаллоидов не является исключительным свойством клеточной мембраны, но присуща любой части протоплазмы — вывод, полностью совпадавший с представлениями Дюжардена и фон Моля о несмешиваемости протоплазмы с водой.

Однако сторонники мембранной теории не согласились с выводами Кайта. Они возразили, что в месте введения микропипетки сразу происходила регенерация мембраны, что и создавало иллюзию осмотических реакций протоплазмы [41, р. 125; 315]. Противостояние этих взглядов продолжалось полвека, пока не появились технологии, способные внести ясность в этот вопрос.

Как уже было сказано, скорость проникновения радиоактивно меченой сахарозы в мышечное волокно лягушки была вдвое с небольшим выше через срез, чем через интактную поверхность клетки (табл. 1; опыты проводили с использованием препарата безнасосной незамкнутой клетки, БНК; пояснение см. в подписи к рис. 7 и в разделе 10.2, п. 1). Увеличение проницаемости наблюдалось сразу после рассечения мышечной клетки, когда ее цитоплазма приходила в соприкосновение с раствором сахарозы, и ее уровень оставался неизменным на протяжении целых суток [23]. При оценке проницаемости для сахарозы парной мышцы, рассеченной подобным же образом, также было обнаружено, что она у обнаженной цитоплазмы остается высокой на протяжении 24 часов, то есть остается длительное время на том же высоком уровне, что и у свежего разреза. Аналогичные результаты получены и для Na^+ : по истечении 51-часовой инкубации оголенная цитоплазма мышечной клетки сохраняла столь же высокую проницаемость для меченых ионов Na^+ , что и свежий разрез. Это доказывает, что никакой регенерации клеточной мембраны в месте контакта цитоплазмы с окружающей средой не происходит. Следует подчеркнуть, что этот результат получен прямым методом — методом радиоактивных меток.

Современные электронные микроскопы, в отличие от световых, позволяют рассмотреть клеточную мембрану, толщина которой не превышает 100 Å [269] при условии правильной фиксации препарата и обработки его солями тяжелых металлов (урана или свинца), придающих клеточным структурам способность эффективно рассеивать электроны и потому делающих их более заметными. При помощи этой техники И. Л. Камерон смог получить электронно-микроскопические фотографии поверхности разрезов мышц сразу после рассечения мышечных волокон и спустя некоторое время. Никакой регенерации мембран не происходило [42; 107, Fig. 4.11].

Итак, поверхность клетки действительно представляет собой диффузионный барьер, препятствующий проникновению через него, по крайней мере, некоторых веществ (см., однако, раздел 13.3). Но непроницаемость этого барьера весьма относительна и часто преувеличивается. В действительности он не обладает

ни абсолютной проницаемостью, ни абсолютной непроницаемостью для какого-либо вещества. Клетки, как правило, не являются совершенными осмометрами. Центральный догмат мембранной теории, согласно которому лишь вещество, не проникающее через мембрану, способно в соответствующей концентрации вызвать стойкое сжатие клетки, опровергнуто. Это ставит под сомнение и все остальные объяснения этой теории — механизмов клеточной проницаемости, регуляции клеточного объема, распределения растворенных веществ между клеткой и средой и т. д. Кроме того, доказано, что поверхность сечения, образующаяся при поперечном разрезе мышцы и находящаяся в контакте со средой, не способна восстанавливать мембрану, ни быстро, ни медленно. Конечно, на основании исследования одних только мышечных клеток нельзя исключать, что регенерация мембран все же происходит, например, на поверхности капель более жидкой протоплазмы, взятой из других клеток. При этом, правда, необходимо учитывать, что в термин «мембрана» рассматриваемые здесь конкурирующие теории могут вкладывать разный смысл (см. раздел 11.3, п. 3). Тем не менее, изложенный материал ясно говорит о том, что из четырех фундаментальных свойств клетки мембранная теория уверенно объясняет пока только одно — происхождение электрических потенциалов. Но как раз этим вопросом мы сейчас и займемся.

4.2. Мембранная теория электрических потенциалов Бернштейна

Хотя мембрана из ферроцианида меди не пропускает, как уже сказано, ионы меди и ферроцианида, она проницаема для ионов калия (K^+) и хлора (Cl^-) [18, р. 47]. В 1890 году Вильгельм Оствальд (1853—1932), изучая разность электрических потенциалов между растворами, содержащими различные ионы, предположил, что природа генерации электрических потенциалов мышечного и нервного волокон, также как и соответствующих клеток электрического угря, едина и обусловлена особыми свойствами мембраны [43]. Это предположение решили проверить Юлиус Бернштейн (1839—1917) и Фредерик Доннан (1870—1956) (см. также [316]).

В 1902 году Юлиус Бернштейн опубликовал теорию, названную им «мембранной» [19, р. 542]. В этой теории постоянную трансмембранную разность электрических потенциалов нервной или мышечной клетки в состоянии покоя, ранее известную как *потенциал покоя или повреждения* [15, р. 20], он назвал «мембранным потенциалом» [19; 232].

Назвав свою теорию происхождения потенциала покоя «мембранной теорией», Бернштейн никак при этом не упомянул ту «мембранную теорию», автором которой называют Пфедффера [3]. Это умолчание — начало фрагментации физиологических наук (см. эпилог) и последующего разделения физиологии на физиологию растений, представленную работами Пфедффера со зрелыми растительными клетками, и физиологию животных, представ-

ленную опытами Бернштейна на мышечных и нервных тканях.

Согласно Бернштейну, мембранный потенциал является следствием проницаемости мембраны мышечных клеток для K^+ и ее непроницаемости (умозрительной) для Na^+ и всех анионов [19]. Схематически изображенная на рис. 4В, теория Бернштейна гласит, что потенциал покоя внутренней поверхности мембраны по отношению к наружной отрицателен, а его величина зависит от абсолютной температуры и логарифма отношения концентрации K^+ с внутренней стороны мембраны (C_1) к его концентрации снаружи (C_2). Это означает, что потенциал покоя должен зависеть от C_2 , величину которого можно

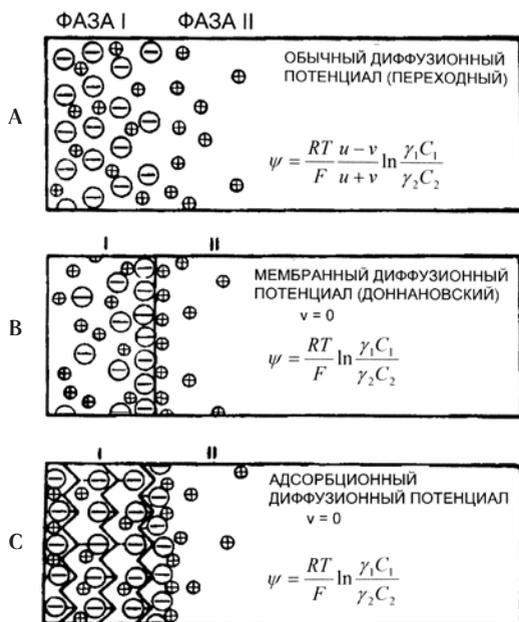


Рис. 4. Иллюстрация трех типов электрических потенциалов (ψ): А — обычный диффузионный потенциал; В — постоянный мембранный потенциал по Доннану; С — постоянный адсорбционный потенциал. \square — свободный одновалентный катион; \ominus — свободный одновалентный анион (на панелях А и В) и фиксированный одновалентный анион (на панели С); u и v — соответственно подвижность одновалентного катиона и аниона. C_1 и C_2 — соответственно концентрации одновалентного иона в I и II фазах; γ_1 и γ_2 — соответствующие коэффициенты активности свободных ионов в каждой из двух фаз. Уравнение, описывающее адсорбционный потенциал на рис. 4С, справедливо, если фиксированные анионные центры распределены равномерно по всей поверхности клетки, включая и подлежащие слои. Если же плотность распределения поверхностных анионных центров отличается от плотности их распределения в более глубоких слоях цитоплазмы, тогда лучше воспользоваться уравнением (10) в 15-й главе (то же уравнение приведено в приложении под номером А22). (По Лингу [96].

легко менять в эксперименте. По мере совершенствования техники измерения электрических потенциалов клеток [253; 88; 441—443] каждое из трех упомянутых положений этой теории не раз находило экспериментальное подтверждение [15, р. 68—73; 107, р. 276].

Согласно мембранной теории Бернштейна, потенциал покоя должен зависеть от концентрации внутриклеточного K^+ (C_1 на рис. 4В). Такая зависимость была показана лишь в четырех лабораториях [418], тогда как в десяти других ее не обнаружили [419].

Кроме того, мембранная теория Бернштейна требует, чтобы клеточная мембрана была совершенно непроницаемой для Na^+ , что, как оказалось, не соответствует действительности [36] (раздел 4.1, п. 3). В условиях, когда клеточная мембрана оказывается проницаемой для Na^+ величины C_1 и C_2 на рис. 4В должны включать концентрации обоих ионов (K^+ и Na^+) как по одну, так и по другую стороны

мембраны ($C_1 = C_{1K} + C_{1Na}$; $C_2 = C_{2K} + C_{2Na}$), иначе говоря, бернштейновский потенциал перестал быть чисто калиевым. Поскольку суммарная концентрация K^+ и Na^+ в клетке примерно равна суммарной концентрации этих ионов в среде, то их отношение близко к единице, а логарифм единицы равен нулю. Так почему же потенциал покоя в действительности равен не нулю, как следовало бы из этой теории, а -90 мВ [95]?

Для решения этой проблемы профессор Алан Ходжкин (1914—1998) предложил в 1949 году модификацию мембранной теории клеточных потенциалов, которую он назвал «ионной теорией» [47].

Ионная теория Ходжкина уже не разделяет ионы на проникающие и непроникающие через мембрану, а признает за ними разную способность проникать в клетку. Например, K^+ , легче проникает через мембрану, поэтому сильнее влияет на величину потенциала покоя, чем Na^+ с меньшей проникающей способностью. Ионная теория смогла численно объяснить происхождение не только потенциала покоя, но и потенциала действия — физической основы нервного и мышечного импульса (подробнее об этом сказано в разделе 15.6). Это взволновало многих — особенно аспирантов вроде меня, в то время работавшего над кандидатской диссертацией по электрическим потенциалам мышечных клеток лягушки.

Ионная теория Ходжкина — это модификация мембранной теории Бернштейна, и в силу этого она основывается на том же допущении фундаментального характера: вода и K^+ в клетке находятся в свободном состоянии. Экспериментальные данные в пользу этих утверждений будут рассмотрены в следующей, 5 главе.

4.3. Теория распределения ионов и мембранного потенциала Доннана

В 1911 году Фредерик Доннан опубликовал статью под названием: «Теория происхождения мембранного равновесия и мембранного потенциала вследствие существования непроникающих электролитов» [20]. Как следует из названия, его теория касается характера равновесного распределения ионов (Na^+ , Cl^- и др.) между различными отсеками, или компартментами, отделенными друг от друга полупроницаемой мембраной, обусловленного введением в один из компартментов электрически заряженного соединения, неспособного проникать через полупроницаемую мембрану.

Основной упор в теории Доннана сделан на то, что наличие в одном из компартментов электролита, неспособного проникать через мембрану, влечет за собой асимметрию распределения остальных электролитов, для которых мембрана проницаема. Вследствие этого между соседними компартментами возникает разность электрических потенциалов, или мембранный потенциал. Мембранный потенциал Доннана по своей сути не отличается от мембранного потенциала Юлиуса Бернштейна, описанного выше (см. рис. 4В). Однако, в отличие от него, теория Доннана предсказывает зависимость вели-

чины и знака мембранного потенциала от равновесных концентраций ионов.

Эмиль Абдергальден, ученик великого Эмиля Фишера (1852—1919), знаменитого своими открытиями в химии белков, сравнил уровни K^+ и Na^+ в плазме крови человека и внутри красных кровяных клеток [73]. Обнаружилось, что в плазме содержится мало K^+ , но много Na^+ , а в красных кровяных клетках — наоборот, много K^+ , но мало Na^+ [74, р. 120—121]. Данные Абдергальдена в основном аналогичны результатам подробного исследования содержания ионов в мышечных тканях, опубликованным двумя годами ранее Юлиусом Катцом [75]. Оба исследователя продемонстрировали выраженную *асимметрию распределения K^+ и Na^+ по обе стороны клеточной мембраны* [98, р. 232—233] *несмотря на то, что в химическом отношении эти ионы очень похожи.*

В 1928 году Г. Неттер из Гейдельберга попытался применить теорию Доннана к селективному накоплению ионов K^+ в мышечных клетках лягушки, полагая, что мембрана проницаема для K^+ , но непроницаема для Na^+ и всех анионов [50]. А в 1941 году Бойль и Конвей адаптировали теорию мембранного равновесия Доннана к своей версии мембранной теории [44—46].

По мнению Бойля и Конвея, клеточные мембраны потому проницаемы для K^+ и непроницаемы для Na^+ , что представляют собой подобие сита с ячейками, пропускающими ионы K^+ потому, что те меньше по размеру (с учетом гидратной оболочки) гидратированных ионов Na^+ .

Интересно отметить, что у Бойля и Конвея, с их теорией сита, были предшественники. За 14 лет до них, Монд и Амсон высказали мнение, что в мембране мышечных клеток существуют поры, достаточно широкие для того, чтобы пропускать небольшие гидратированные ионы K^+ , но достаточно узкие, чтобы служить препятствием для более крупных гидратированных ионов Na^+ [51, р. 78]. В свою очередь, теория Монда и Амсона была развитием теории Леонора Михаэлиса, объяснявшей избирательность коллоидной мембраны по отношению к ионам K^+ и Na^+ : она была проницаема для K^+ и непроницаема для Na^+ по причине все тех же различий в размерах этих ионов в растворе [401, р. 42]. Однако, в отличие от Монда и Амсона, безоговорочно признававших приоритет Михаэлиса в этом вопросе, Бойль и Конвей умолчали о своих предшественниках, несмотря на то что знали статью Монда и Амсона и даже ссылались на нее, правда, по другому поводу, в своей, ставшей широко известной, работе [44, р. 6]. Я сам, увы, многие годы ошибочно считал Бойля и Конвея настоящими авторами теории сита, и даже по неосмотрительности способствовал распространению этого заблуждения.

Из сказанного следует, что постулат о непроницаемости клеточной мембраны для Na^+ был экспериментально опровергнут *за многие годы до того* (см. подборку публикаций [36]), как в 1941 году вышла в свет эпохальная статья Бойля и Конвея, в которой они все еще продолжали настаивать на нем. Первой публикацией о проницаемости мембраны для Na^+ была статья П. Жерара, вышедшая еще

в 1912 году, а к 1941 году этот факт был многократно подтвержден [36]. *Неспособность этой позднейшей версии мембранной теории объяснить асимметрию распределения ионов K^+ и Na^+ стала причиной появления теории натриевого насоса* [49, p. 123—124].

Ее создателем часто называют Роберта Дина, однако в действительности весь его вклад исчерпывается лишь одним высказыванием: «Легко допустить, что существует некий насос, который способен, пока неизвестным, постоянно «откачивает» натрий наружу с той же скоростью, с какой происходит его диффузия внутрь волокна» [333, p. 346]. Подобную мысль высказывали чуть ли не за 100 лет до него другие ученые, среди которых Ральф Лилли [41, p. 117], Эрнест Овертон [320, p. 9] и Теодор Шванн [3, p. 194; 335]. Так, Шванн считал, что клеточная мембрана обладает некой «метаболической силой», благодаря которой способна регулировать химический состав внутри- и внеклеточной среды [3, p. 194].

Активность исследований натриевого насоса резко возросла после того, как в 1957 году профессор Йенс Кристиан Скоу из Дании выдвинул предположение, что *натриевым насосом является фермент под названием Na,K -активируемая АТФаза* [52]. Однако отложим рассказ о теории натриевого насоса до главы 12, а пока остановимся на основных событиях, произошедших до начала работ Скоу в этой области.

ЧТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О СОДЕРЖИМОМ КЛЕТКИ КАК О РАЗБАВЛЕННОМ РАСТВОРЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ?

Принципиальное положение мембранной теории, — содержимое клетки представляет собой разбавленный водный раствор электролитов, — можно разделить на два постулата: о свободной воде и о свободном K^+ . Как сказано выше, уже в конце XIX века было обнаружено, что K^+ является основным внутриклеточным катионом большинства клеток [73, 75, 98, р. 232—233]. Однако данные, касающиеся его физического состояния, а также состояния клеточной воды, стали появляться значительно позже. Так, свидетельства в пользу их свободного состояния увидели свет лишь в период с начала 1930-х и до конца 1940-х, то есть спустя годы после появления представлений, которые, в первом приближении, можно охарактеризовать как теории «связанной воды» и «связанного K^+ » (подробнее см. гл. 7). Здесь я лишь в общих чертах набросаю эти первые результаты в пользу мембранной теории, которые дали повод думать, что вода и K^+ в клетке свободны, а изложение более поздних изысканий отложу до 10-й и 11-й глав (разделы 10.2, п. 3 и 11.3, п. 5).

5.1. Первые свидетельства свободного состояния воды в клетке

5.2. Первые свидетельства свободного состояния клеточного K^+

5.1. Первые свидетельства свободного состояния воды в клетке

В 1930 году лауреат Нобелевской премии Арчибальд Хилл (1886—1977) обнаружил, что мочевины одинаково хорошо растворима как в воде, омывающей мышечные клетки, так и в самих клетках [81]. Это заставило его сделать вывод, что клеточная вода находится в свободном состоянии, и ни в коей мере не является «связанной» или «нерастворяющей». Вскоре к такому же выводу пришли и другие авторы [82].

5.2. Первые свидетельства свободного состояния клеточного K^+

В 1953 лауреат Нобелевской премии Алан Ходжкин и профессор Ричард Кейнес из Кембриджского университета опубликовали свои данные о подвижности ионов K^+ в гигантском нервном волокне (аксоне) каракатицы [263]. Оказалось, что K^+ , проникнув в аксон, обладает в аксоплазме той же подвижностью, что и в 0,5 М растворе KCl [263, р. 526]. О важности этой работы говорит замечание другого Нобелевского лауреата, Бернарда Катца, которое мы находим в его работе “Nerve, Muscle and Synapse” [237, р. 42—44]:

«...Эрнст, Трошин и Линг утверждают, что большая часть внутренних отрицательных зарядов принадлежит протеинам полиэлектролитов; кроме того, они полагают, что ионы калия не просто служат противоионами к отрицательно заряженной коллоидной структуре, а обладают избирательным сродством и химически связаны с протеинами. (Моя позиция здесь искажена. С моей точки зрения, которая будет рассмотрена в разделе 10.1, п. 3, внутриклеточный K^+ адсорбируется в первую очередь благодаря действию электростатических сил, что никак нельзя назвать «химической связью» — ГЛ).

Однако эта точка зрения кажется маловероятной ввиду наблюдений Ходжкина и Кейнеса (имеется ввиду работа [263] — ГЛ). Эти наблюдения мы рассмотрим подробно, так как они имеют решающее значение в связи с еще продолжающимися спорами относительно правильности представлений о возбудимой мембране... Было ясно, что меченые ионы (в том числе K^+ — добавлено мной, ГЛ), проникшие в аксоплазму, и внутри клетки продолжали вести себя как свободные ионы с почти нормальной подвижностью». (Цитировано по русскому переводу: Б. Катц. Нерв, мышца и синапс. М., «Мир», 1968, с. 56—58).

Через шестнадцать лет после вышеупомянутой публикации Ходжкина и Кейнеса новые данные в их поддержку представили Кушмерик и Подольский. Они измерили коэффициенты диффузии семи меченых веществ в цитоплазме мышечных фрагментов лягушки, каждый из которых имел длину 3—6 мм и был незамкнут на концах [264]. Этими веществами были: K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , АТФ, сахароза и сорбит. У шести из этих соединений, за исключением Ca^{2+} , коэффициент диффузии внутри клетки оказался в два раза ниже, чем в обычном растворе.

Ученые сделали вывод, что эти шесть веществ (в их числе K^+ и АТФ) существуют внутри клетки в свободном состоянии, а двукратное уменьшение коэффициентов их диффузии обусловлено наличием механических преград внутри мышечной клетки. Кажется бы, Кушмерик и Подольский, таким образом, представили доказательства не просто в пользу постулата о свободном состоянии внутриклеточного K^+ , но и самого принципа свободного состояния низкомолекулярных веществ внутри клетки вообще, что также является неотъемлемой частью мембранной теории.

Дальнейшее развитие идей о свободном K^+ и воде, как я уже говорил, будет рассмотрено соответственно в 10 и 11 главах. Однако уже сейчас можно отметить, что все упомянутые выше исследователи, включая Катца, упустили из виду важные данные, которые уже давно имелись в литературе.

В 1913 году Рудольф Хёбер сообщил о результатах измерения электропроводности мышцы лягушки при частоте переменного тока $0,9 \cdot 10^7$ Гц. На этой частоте емкостное сопротивление клеточной мембраны сводится практически к нулю и его можно не учитывать.

Оказалось, что по электропроводности цитоплазма мышечных клеток соответствует лишь 0,1—0,2% раствору NaCl [265]. Это противоречит утверждению мембранной теории о свободном K^+ в клетке. Если бы это было действительно так, то электропроводность цитоплазмы была бы близка к электропроводности *изотонического* 0,7% раствора NaCl, находящегося в осмотическом равновесии с мышечными клетками лягушки (4.1, п. 2). Данные Хёбера были неоднократно подтверждены другими учеными, в числе которых Арчибальд Хилл, и моими собственными экспериментами.

До сих пор мы обращали наше внимание на мембранную теорию и лежащее в ее основе предположение, что клетки — это мембранные емкости с разбавленным раствором электролитов и низкомолекулярных веществ. В следующих главах я рассмотрю теории и факты, свидетельствующие в пользу концепции, для которой клетки являются не пузырьками с водным раствором, а плотными, квазитвердыми протоплазматическими телами. А начну я свой рассказ с рождения нового раздела химической науки — *коллоидной химии*.

КОЛЛОИД — БЕСЦЕННЫЙ ДАР ХИМИКОВ

6.1. Коллоидная система как убедительная модель протоплазмы

6.2. Коацерваты

Невозможно переоценить значение для клеточной физиологии открытия вещества жизни — протоплазмы. Оно сразу же стало предметом всесторонних, пытливых исследований, но не физиолога, а... химика — Томаса Грэма (1805—1869). Грэм в то время занимал пост главы Королевского монетного двора Англии [53 р. 183] — тот самый пост, который некогда занимал сам Исаак Ньютон (до конца XVII века) [464, р. 229].

6.1. Коллоидная система как убедительная модель протоплазмы

Томас Грэм большую часть жизни посвятил изучению феномена диффузии. Он заметил, что некоторые вещества — крахмал, смола, желатин — диффундируют медленно и не способны образовать кристаллы. В 1861 году он написал: «Поскольку желатин выглядит одним из представителей этого рода субстанций, предлагаю назвать этот класс веществ *коллоидами*, а особое агрегированное состояние этих веществ — коллоидным состоянием материи» [53] (коллоид — от греч. *kólla* — клей, *éidos* — вид).

Назвав группу медленно диффундирующих веществ коллоидами, Грэм подчеркнул, что «среди представителей этого класса имеются пластичные элементы животного организма». Под пластичными элементами он мог подразумевать лишь мягкие ткани, в противоположность плотным элементам — костям, рогам, раковинам. Все эти мягкие ткани, согласно Феликсу Дюжардену, Гуго фон Молю, Максу Шульце и остальным, образованы протоплазмой, хотя сам Грэм это слово и не употреблял.

Однако, учредив коллоидную химию, Грэм не только указал направление исследований протоплазмы с химической точки зрения, но и придал импульс углублению понимания роли клеточных мембран. Так, он использовал мембраны с порами «коллоидного» размера для отделения коллоидов от воды и растворенных в ней веществ (в том числе солей и сахаров) — то есть изобрел диализ. Соли и сахара, в отличие от коллоидов, обладают гораздо большей скоростью диффузии и способны образовывать кристаллы. Поэтому Грэм назвал всю эту группу веществ кристаллоидами.

В 1857 году Майкл Фарадей продемонстрировал Королевскому научному обществу вещество, которое назвал *коллоидным* золотом (интересно, что произошло это за четыре года до того, как Грэм предложил термин *коллоид*) [54, р. 472]. Фарадей показал, что растворы коллоидного золота, как и обычные растворы, совершенно

прозрачны, «если смотреть сквозь жидкость на свет». Однако, «если при помощи линзы сфокусировать солнечные лучи в объеме такого раствора, то в нем появляется световой конус, внутри которого становятся заметными взвешенные частицы» [54, р. 472]. Это явление, известное как эффект Тиндаля, легло в основу устройства оптического прибора — *ультрамикроскопа* [64, р. 87]. Ультрамикроскоп позволяет увидеть мельчайшие коллоидные частицы, невидимые для других приборов, поскольку в нем используется боковое освещение, а фон остается темным.

Мартин Фишер, чей вклад в физиологию клетки будет отмечен ниже, так определил коллоиды: «коллоидная система возникает всякий раз при распределении одного вещества в другом, если размер частиц распределенного вещества больше размера молекулы» [64, р. 5]. Росс Гортнер, чьи выдающиеся работы также будут упоминаться, предложил несколько изменить формулировку: «коллоидная система возникает при распределении одного вещества в другом, если размер распределенных частиц больше размера молекул, либо если диаметр мицелл составляет не менее 10—15 Å». Гортнер отметил также, что ультрамикроскоп позволяет увидеть коллоидные частицы диаметром 10—1000 Å [64, р. 5]. В свою очередь, Вольфганг Оствальд (1883—1943) установил следующий диапазон размеров коллоидных частиц: от 10 до 10 000 Å [65, р. 24]. Однако другое определение, предложенное Германом Штаудингером, вызвало некоторые затруднения.

Штаудингер полагал, что истинными коллоидами (*эуколлоидами*) можно считать лишь молекулы размером более 1250 Å [65, р. 23—24; 66]. Для него «коллоиды» и «макромолекулы» были синонимами. Он был автором *теории макромолекул*, согласно которой макромолекулы представляют собой длинные цепи повторяющихся единиц (мономеров), последовательно соединенных ковалентными связями [67].

Однако такие коллоиды, как коллоидное золото Фарадея или гель ферроцианида меди Траубе, отнюдь не назовешь макромолекулами; это просто скопления мелких частиц. Они не имеют ничего общего с «мелкими единицами, соединенными ковалентными связями». Поэтому, хотя их часто смешивают, коллоиды и макромолекулы — совсем не одно и то же. Мы еще вернемся к этому вопросу в разделе 11.3, п. 2.

Создав коллоидную химию, Грэм объединил два вещества, сыгравшие важнейшую роль в истории физиологии клетки и субклеточных структур, — ферроцианид меди и желатин. Мы с вами уже знаем, как ферроцианид меди сделал возможным рождение мембранной теории. Теперь я расскажу о том, как коллоидные химики сделали возможным заметить близкое родство между желатиновым гелем и протоплазмой. Правда, как станет ясно из раздела 11.3, п. 2, тогда было еще очень далеко до появления внятного теоретического объяснения этого родства.

6.2. Коацерваты

1. История

В 1902 году Паули и Рона обнаружили, что добавление нейтральных солей в раствор желатина при 30 °С приводит к его разделению на два слоя (фазы) с четкой границей между ними. В нижнем слое содержание желатина было высоким, в верхнем — низким [58]. В 1929 году Бунгенберг-де-Йонг (1893—1977) и Х. Крюйт предложили назвать это явление *коацервацией* (от лат. *acervi* — скопление, и приставки *co* — вместе) [59]. Фаза, богатая коллоидом, была названа *коацерватом*. Если в стабилизации структуры коллоида важную роль играют солевые связи между фиксированными анионами и фиксированными катионами коллоида, коацерват называется *комплексным*.

В прошлом коллоидные химики называли все белки коллоидами. Это наводило на мысль, будто любой белок может образовывать коацерват. Однако это не так. Оказалось, что к коацервации способны лишь белки, которые Бунгенберг-де-Йонг назвал *линейными белками* — такие, как желатин [61, р. 185, р. 239]. Большая же часть *глобулярных белков* в тех условиях, в которых линейные белки образуют коацерваты, *кристаллизуется*. Это различие очень важно, и о нем следует помнить. Дело в том, что большая часть исследованных природных белков относится к глобулярным белкам. На этом фоне желатин уникален в том отношении, что постоянно находится в линейной или, как я ее называю, в *полноразвернутой конформации* (см. раздел 11.2). Как возникает такая конформация и каким образом обеспечивается ее стабильность, долгое время было неясно. Эта тема будет рассмотрена в разделе 11.3, п. 2.

2. Взгляды Бунгенберг-де-Йонга на физическое состояние воды в коацерватах

Бунгенберг-де-Йонг предложил сразу два объяснения структуры коацерватов и физического состояния воды в них. Согласно первому, более раннему объяснению, мелкие коллоидные частицы, окруженные диффузным слоем растворителя, вначале объединяются в более крупные частицы, оставаясь в них изолированными друг от друга водой. Затем эти крупные частицы объединяются в коацерват, а свободная вода, разделявшая их, выдавливается из внутренней среды коацервата; сольватные оболочки отдельных частиц сливаются в единое целое с образованием плотной внешней границы (природа этой плотной оболочки оставалась, однако, неясной). Обратите внимание, что в этой первой модели вся или почти вся вода коацервата является не обычной жидкой водой, а *гидратной* [61, р. 245—246, 249].

Более поздние представления о коацерватах, по словам самого Бунгенберг-де-Йонга, «диаметрально противоположны первоначальной идее». В самом деле, согласно его новой модели «большая

часть коацерватной воды рассматривается в качестве *окклюзивной* [61, р. 249] — то есть «не связанной макромолекулами» [61, р. 371], а обычной жидкой водой, захваченной сетью макромолекул. По сравнению с первой моделью, во второй взаимодействие между макромолекулами и водой в коацервате практически отсутствует. К счастью, Бунгенберг-де-Йонг с сотрудниками оставили своим озадаченным читателям, вроде меня, результаты своих экспериментов, которые дают возможность объективно судить об их истинном значении.

Холлеман, Бунгенберг-де-Йонг и Моддерман изучали равновесное распределение сульфата натрия (Na_2SO_4) между простым

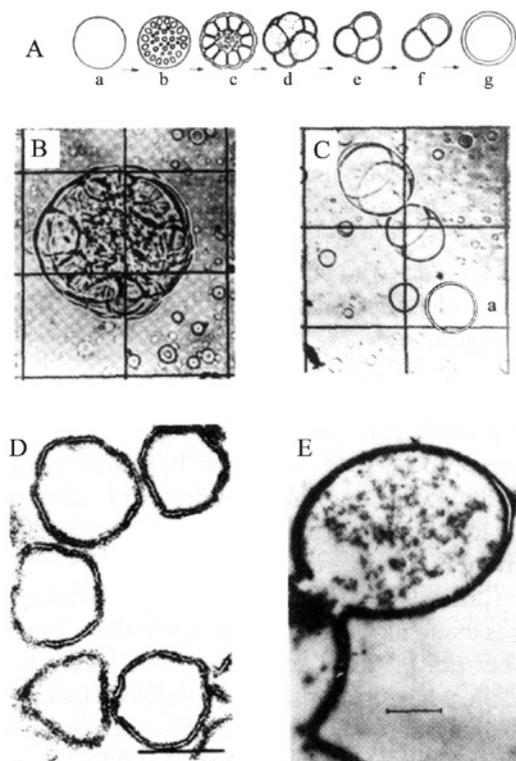


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая поэтапное возникновение *in vitro* пузырьков с бислойной мембраной, и несколько интересных микрофотографий. А. Схематическое изображение этапов образования поллой сферы с бислойной мембраной (g) из отрицательно заряженной (по отношению к среде) капли комплексного коацервата желатин-гуммиарабик (a); b — первичная вакуолизация; c и d — пенистые тела — промежуточные этапы возникновения поллой сферы (g). В. Микрофотография коацерватной капли на стадии пенистого тела, соответствующей стадии c на панели А (увеличение в 203 раза). С. Микрофотография пенистых тел в стадии f. Обратите внимание на двухслойную стенку полого пузырька, обозначенного буквой a (соответствует стадии g на панели А) (увеличение в 196 раз). D. Фрагмент электронной микрофотографии пузырьков, приготовленных из почечной Na,K-АТФазы методом диализа в присутствии детергента холата натрия (увеличение в 290 000 раз). Диаметр пузырьков составляет приблизительно 900 Å. E. Электронная микрофотография протеиноидной «микросферы», как она выглядит при высоких рН. Длина масштабной метки — 1 мкм, или 1000 Å. Обратите внимание, что бислойная мембрана может образовываться в смеси желатин + гуммиарабик (А, В, С); Na, К-АТФаза + холат (D); а также в протеиноидах, полученных нагреванием смесей чистых аминокислот (E). Единственное, что связывает эти три препарата, — наличие в их составе белков. (А, В и С — из данных Бунгенберг-де-Йонга [61, р. 460]; D — из работы [487]; E — из [216]).

коацерватом (желатин + Na_2SO_4 при 50°C) и средой [70]. При концентрации желатина 27,2% отношение концентрации сульфата натрия в коацерватной воде к его концентрации во внешнем растворе составляло 0,62. Это частичное вытеснение Na_2SO_4 из коацервата показывает, что из всей воды, составляющей $1 - 0,272 = 0,728$, или 72,8% коацервата, $1 - 0,62 = 0,38$, или 38% не способно растворять эту соль. Разделив общее количество «нерастворяющей» воды (равное $0,728 \cdot 0,38 = 0,277$) на процентное содержание желатина, мы получаем $0,277 / 0,272 = 1,02$ грамма такой воды на грамм сухого желатина. Эта цифра в 3-4 раза превышает то количество гидратной воды, которое способно связаться с нативными глобулярными белками, согласно общепринятой оценке, — 0,2–0,3 грамма на грамм сухого белка [155, Table 5]. В то же время, ощутима и разница между реальными 38% и гипотетическими 100% «гидратной воды», — уровнем, который допускала первая идеальная модель. Если бы гидратная вода первой модели лучше растворяла Na_2SO_4 , то коэффициент распределения соли между водой коацервата и среды (q) был бы соответственно ближе к 1 (см. раздел 11.3, п. 4), а расхождение между рассматриваемым постулатом первой модели и экспериментом не было бы таким разительным. Из этого сопоставления напрашивается вывод, что нерастворяющая способность гидратной воды в первой модели коацерватов преувеличена. Мы вернемся к этому интересному вопросу позже, в разделе 11.3, п. 3.

3. Коацерват и протоплазма

Если смешать в нужных пропорциях желатин и гуммиарабик — хорошо растворимый в воде высокомолекулярный сложный полисахарид, добываемый из некоторых видов акаций [60, р. 98], — и дать смеси постоять, то в ней образуется два слоя. Если встряхнуть пробирку с расслоенной жидкостью, то коацерватный слой, богатый желатином, разбивается на множество мелких капель [61, р. 438] (см. также рис. 5А), не смешивающихся с дисперсионной средой (фазой, обедненной коллоидом).

В 1926 году В. В. Лепешкин сообщил, что протоплазма, выделяющаяся из поврежденных молодых растительных клеток *Bryopsis plumosa*, при встряхивании также разбивается на множество мелких капель [62, р. 75], не смешивающихся с водой. Поразительная схожесть этих наблюдений свидетельствует о том, что желеобразное вещество, выделенное из клеток простейших в опытах Феликса Дюжардена и Вилли Кюне, а также из растительных клеток в опытах фон Негели, фон Моля, Лепешкина, Куроды (рис. 3), должно представлять собой коацерват. Эта мысль отнюдь не нова. Лепешкин одним из первых предположил, что протоплазма — это вид коацервата [324].

4. Коацерват и клетка

В обзоре для журнала *Protoplasma* [71] Бунгенберг-де-Йонг отметил девять свойств, общих для коацерватов и клеток, вернее, для *статической модели клетки*, как он это называл. В их числе были отмечены следующие: несмешиваемость с водой, склонность образовывать вакуоли, склонность поглощать твердые частицы, а также характерное поведение при пропускании через раствор постоянного тока.

Далее Бунгенберг-де-Йонг подчеркнул, что наиболее фундаментальным различием между живой клеткой и ее статической моделью является наличие в клетках мембран и их отсутствие в коацерватах («Der wesentliche Unterschied der lebenden Zelle gegenüber unserem statischen Modell bezieht sich wohl auf das Vorhandensein von Filmen oder Membranene in ersteren, die grundsätzlichen Ungleichgewicht ermöglichen») [71, p.164].

Остается загадкой, зачем Бунгенберг-де-Йонг провел эту границу — ведь он сам не раз демонстрировал, что в определенных условиях коацерваты тоже могут образовывать мембраны (рис. 5А и 5С). В следующей главе я представлю работы и идеи А. С. Трошина, который разглядел в опытах Бунгенберга-де-Йонга с коацерватами больше, чем заметил в них сам автор.

НАСЛЕДИЕ ПОЛУЗАБЫТЫХ ПЕРВОПРОХОДЦЕВ

Гистологи 60-х годов XIX века полностью осознали ошибочность представлений о клетке как о пузырьке с раствором веществ, окруженном мембраной. Результатом этого осознания явилась *протоплазматическая доктрина* Макса Шульце, опубликованная в 1861 году [11]. А Томас Хаксли в своих лекциях называл протоплазму *физической основой жизни* еще в 1868 году [72]. К концу века появилось новое поколение физиологов, испытавших влияние протоплазматической школы. Основные силы они бросили на изучение набухания клеток, а также на исследования избирательного накопления ионов калия (K^+) в присутствии ионов натрия (Na^+), наблюдавшегося у большинства клеток, о чем было уже кратко сказано в разделе 4.3.

Сторонники мембранной теории вначале объясняли асимметричное распределение K^+ и Na^+ между средой и красными клетками крови непроницаемостью их мембран для обоих ионов [76]. Это предположение, хоть и наивное, объясняло, почему Na^+ не входит в клетки, а K^+ не выходит из нее.

Бенджамин Мур из Ливерпульского университета в 1906 году вкратце изложил возражения против этой гипотезы [77]. Двумя годами позже он и Герберт Роуф изложили свои доводы уже в развернутом виде [77]. Первый контраргумент состоял в том, что содержание K^+ в клетке остается в пределах физиологической нормы на протяжении всего ее жизненного цикла. Однако, если мембрана всех клеток, а не только эритроцита, остается непроницаемой для этого иона, возражали они, клетке было бы весьма затруднительно поддерживать постоянную внутреннюю концентрацию K^+ по мере ее роста и деления.

В качестве альтернативного объяснения Мур и Роуф предположили, что *протоплазма обладает особым свойством, или адсорбирующей силой в отношении K^+ , и не обладает таковой в случае Na^+* . В свою поддержку они привели пример избирательного поглощения кислорода красными кровяными тельцами (эритроцитами) и предпочтительного поглощения K^+ в присутствии Na^+ почвами, что было уже ближе к обсуждаемой проблеме. Однако они так и не предложили молекулярного механизма избирательной адсорбции ни для клеток, существование избирательности у которых лишь предполагалось, ни для почв, избирательность которых была уже известным фактом (см. раздел 10.1, п. 3).

Чарльз Овертон, больше известный своей *теорией липоидных мембран* (она будет рассмотрена в разделе 13.1, п. 1), обнаружил в 1902 году новые факты, ставящие под сомнение утверждение, что

клетки представляют собой всего лишь мембранный пузырек с раствором. Перенеся портняжную мышцу лягушки из изотонического для холоднокровных животных раствора NaCl (0,7%) в гипотонический с вдвое меньшей концентрацией NaCl (0,35%), он обнаружил, что масса разбухшей мышцы вовсе не удваивается при этом, как следовало бы из мембранной теории, а увеличивается лишь на треть. Овертон сделал вывод, что, по меньшей мере, часть клеточной воды должна быть *Quellungs-wasser* (ассимилированной) [25, р. 273].

В 1907 и 1909 годах Мартин Фишер, тогда профессор медицины в Оклендской медицинской школе (Калифорния), утверждал, что набухание клеток — это не осмотическое мембранное явление, как тогда считалось (см. раздел 4.1), а результат сильного сродства коллоидов протоплазмы к воде, какое наблюдается у фибрина и желатина [546; 78]. Развивая эту мысль, он предложил *теорию отека*, а также опубликовал по этому вопросу пространное исследование [78]. В работе, датированной 1909 годом, он обрисовал несколько свежих идей об асимметричном распределении ионов и других веществ между клеткой и средой, проиллюстрировав их примером распределения K^+ и Na^+ .

Фишер подчеркивал, что концентрация растворенных веществ в коллоидной массе (протоплазме) может быть как выше, так и ниже по сравнению с окружающей средой. При этом более высокая концентрация может быть объяснена *адсорбцией*, а более низкая — *законом распределения* (также известным как закон распределения Бертло—Нернста [420]; его частным случаем является закон Генри: растворимость газа в жидкости прямо пропорциональна давлению этого газа над раствором, — *прим. автора, ГЛ*) [78, р. 545—546]. Однако Фишер не стал развивать эти важнейшие идеи.

Помимо существенного вклада Мартина Фишера в физиологию клетки, в историю также вошли его необычайная доброта и благородство. Так, в конце Первой мировой войны он за счет собственных средств поддерживал даже своих научных оппонентов в Германии [79]. Поздравляя Фишера с 60-летним юбилеем, коллоидный химик Вольфганг Оствальд процитировал Шопенгауэра: «Как факелы и фейерверки блекнут и исчезают при свете солнца, так ум и даже гений и красоту затмевает доброта сердца» [79, р. 441].

В. В. Лепешкин также отвергал гипотезу, что клетки — это всего лишь мембранные пузырьки с раствором. Выше уже описан опыт, в котором он раздавливал молодые клетки водоросли *Bryopsis* в морской воде. В результате из них вытекало множество несмешивавшихся с водой мелких капель протоплазмы [62, р. 289—290]; см. также другой пример на рис. 3. При разбавлении морской воды дистиллированной эти шарики сильно увеличивались в размерах, а внутри возникали вакуоли. При возвращении же в морскую воду шарики уменьшались до исходного размера, а вакуоли исчезали.

По оценкам Лепешкина, общая поверхность этих мельчайших шариков, получаемых при встряхивании, тысячекратно превосходила поверхность клетки, из протоплазмы которой они были получены. Однако количество липоидов, основного якобы строительного мате-

риала клеточной мембраны, ограничено, и его никак не может хватить на покрытие сплошным липидным слоем поверхности в 1000 раз больше поверхности клетки [62, р. 275]. Следовательно, эти факты противоречат теории непрерывной липидной пленки, возникшей из объединения теории липоидных мембран Овертона [21] с представлениями об их необыкновенной способности к регенерации (см. раздел 4.1, п. 4). Итог такого обобщения оказался странным: каждая из тысяч капель протоплазмы *должна* быть покрыта такой же липидной мембраной, как и сама клетка, из которой эти капли получены. Поскольку это требование оказалось невыполнимым, Лепешкин пришел к выводу, что эти мельчайшие шарики могут быть покрыты лишь веществом самой протоплазмы [62, р. 276]. Это согласуется с предположениями Франца Лейдига и Макса Шульце, что поверхность клетки состоит из тех же веществ, что и ее протоплазма. Что интересно, Вильгельм Пфедфер и сам разделял подобную точку зрения [18, р. 156].

В пользу теории Лепешкина говорят и наблюдения Паули и Роны, описанные в разделе 6.2. Они показали, что солевой раствор желатина при нагревании до 30 °С образует стабильный коацерват. Поскольку в желатине нет ничего, кроме желатины, то и «мембрана» коацервата, — если называть поверхностный слой коацервата мембраной, — может состоять лишь из желатина.

Как я уже говорил, Лепешкин одним из первых выдвинул утверждение, что протоплазма является коацерватом [324]. Он также предложил теорию строения живого вещества, согласно которой оно представляет собой комплексы белков и липидов, чувствительные к внешним воздействиям, и названные *витапротеидами*, или *витаидами* [325]. Эта теория, впрочем, нещадно критиковалась [332; 92, р. 62] и далее им не отстаивалась.

Затем свой вклад внес Росс Гортнер (1885—1942), более четверти века возглавлявший кафедру агробиохимии в Миннесотском университете, который был видным сторонником представления о существовании в клетках *связанной воды*. Он однажды отправил на заседание Общества Фарадея обращение к группе ученых, непосредственно изучавших различные проблемы воды, которое было опубликовано в *Новостях общества Фарадея* [80] под заголовком: «Состояние воды в коллоидных и живых системах». В этом обращении Гортнер изложил гипотезу, что, по меньшей мере, часть воды в клетках находится не в обычном жидком состоянии, а в связанном.

Одним из критериев, отличающих связанную воду от обычной, по Гортнеру, является ее сниженная растворяющая способность по сравнению с обычной водой. Отсюда другое название связанной воды из лексикона Гортнера и его сотрудников — «нерастворяющая вода».

Забегая вперед (см. гл. 11), хочу упомянуть, что Гортнер ссылался на экспериментальные доказательства существования многослойной адсорбции воды в неживых системах. Правда, позже он занял сдержанную позицию: «К сожалению, свойства воды, организованной в упорядоченные адсорбционные слои, охарактеризо-

ваны еще недостаточно полно, чтобы можно было с уверенностью сказать, та ли это вода, которую биолог мог бы назвать «связанной» [80, р. 684—685].

Обращение Гортнера было благосклонно принято на заседании Общества Фарадея. Большинство его участников проявили интерес к его предположениям, причем некоторые выразили особый энтузиазм. Однако среди них был и тот самый Арчибалд Хилл, чьи весомые доказательства существования свободной клеточной воды были кратко представлены в разделе 5.1.

Хилл фактически единолично остудил всеобщее воодушевление в отношении идеи «связанной воды» и не оставил от коллоидного подхода к физиологии клетки камня на камне. В этом инквизиторском порыве он опирался на результаты своего единственного опыта с мочевиной, для которой, как он показал, растворяющая способность клеточной и внеклеточной воды были одинаковыми [81]. Следовательно, «нерастворяющей» воды в клетках нет. Позднее другие ученые установили, что *этиленгликоль* также хорошо растворяется в воде мышечных клеток и эритроцитов, как и в простой воде [82]. Если клеточная вода действительно не отличается от обычной, то веществами, создающими осмотический противовес среде, содержащей такие осмолиты, как свободные Na^+ и Cl^- , могут быть лишь свободный K^+ и свободные анионы внутри клетки. Выходит, что все говорит в пользу обоих постулатов мембранной теории: *внутри клеток нет ни связанной воды, ни связанных ионов K^+* [81].

Енё Эрнст, венгерский биофизик, присутствовавший при этих событиях, вспоминал, как научные авторитеты, определявшие общественное мнение того времени — У. Фенн и Ф. Бюхтал (в том числе Рудольф Хёбер, чьи собственные исследования электропроводности доказывали обратное) — единодушно отrekliсь от гипотезы связанной воды и K^+ , и полностью присоединились к теории, что клетки представляют собой мембранные пузырьки с разбавленным раствором осмолитов, подчиняющиеся осмотическому закону Вант-Гоффа [83, р. 112]. Каждый признал, что изменить свою позицию его побудили однозначные результаты эксперимента Хилла с мочевиной и его убедительная логика.

В 1940 году ведущий англоязычный журнал, посвященный коллоидной химии — *Journal of Colloidal Chemistry* (Журнал коллоидной химии), — был объединен с *Journal of Physical Chemistry* (Журналом физической химии). Несколько лет после объединения журнал еще носил название *Journal of Physical and Colloidal Chemistry* (Журнал физической и коллоидной химии). Затем слова «и коллоидной» тихо исчезли. Правда, кончина ведущего периодического издания еще не означала конец самой коллоидной химии. Еще продолжали выходить такие периодические издания, как *Zeitschriften für Kolloid Chemie*, *Kolloid Beihefte* и даже *Protoplasma*. Однако едва окрепшему коллоидно-протоплазматическому направлению в физиологии клетки был нанесен незаслуженный и тяжелый удар.

ИТОГИ РАЗГРОМА

8.1. Венгерская группа под руководством Енё Эрнста

8.2. Ленинградская школа Насонова—Трошина

Последствия разгрома клеточных физиологов протоплазматического толка, учиненного Арчибальдом Хиллом, были катастрофическими. Свежие, зачастую блестящие идеи и смелые голоса Мартина Фишера, Герберта Роуфа, Бенджамина Мура, Росса Гортнера, В. В. Лепешкина исчезли с научной сцены. Именно в мертвой тишине тех лет начиналась моя карьера физиолога в Чикаго.

Лишь годы спустя после защиты диссертации я мало-помалу стал понимать, что у мембранной теории и тогда была альтернатива. А еще позже мне стало известно, как однажды физиологи протоплазматического направления Америки и Европы на мгновение с надеждой подняли было голову, но вскоре снова ушли в тень. Исключением оставались лишь две изолированные группы ученых в далекой коммунистической Восточной Европе. Одну в Венгрии, в городе Печ, возглавлял Енё Эрнст; другую — в Советском Союзе, в Ленинграде, — Дмитрий Насонов.

8.1. Венгерская группа под руководством Енё Эрнста

Подобно Фишеру, Муру, Роуфу и другим предшественникам, Енё Эрнст (1895—1981) считал мембранную теорию ошибочной [83]. Он также не был согласен с тем, что клеточная вода — обычная вода из-под крана, а клеточный K^+ находится в свободном состоянии.

С его точки зрения, K^+ в клетке существовал по большей части в *неионизированной, недиссоциированной и негидратированной форме* [83, p. 152]. Эрнст разделял взгляды Макаллума и др. (см. 10.2, п. 5), что K^+ в поперечнополосатых мышечных волокнах не распределен равномерно, а сосредоточен в А-дисках [84], и что значительная часть клеточной воды представляет собой «отёчную воду» или «асимилированную воду» (*Schwellungswasser, Quellungswasser*), «скованную» белками мышечных клеток [399]. В доказательство Эрнст и его сотрудники показали, что хотя и NaCl, и желатин снижают относительное давление водяного пара, желатин в этом отношении во много раз эффективнее. А раз так, утверждали они, мышца лягушки больше напоминает желе, чем разбавленный раствор NaCl [83, p. 112; 399].

Предваряя работу, которая будет описана ниже (раздел 11.2), я хотел бы уже сейчас пояснить, что Эрнст изучал сорбцию воды в мышцах лягушки и желатине при гораздо меньших значениях относительного давления пара, чем это имеет место в физиологических условиях. Фактически, большая часть данных его опытов на мышцах

лягушки относится к свойствам лишь 10% клеточной воды, если не меньше. А немногие экспериментальные значения, полученные при более высоком давлении пара, определены со слишком большой экспериментальной ошибкой, чтобы можно было уверено судить об их достоверности. Возможно, такой разброс обусловлен весьма малым временем, отведенным экспериментатором для установления диффузионного равновесия — от 2 до 3 дней [399], на самом деле для этого может потребоваться гораздо больше времени (см. конец раздела 11.2).

Профессор Эрнст скончался в 1981 году. Его работы в Печском университете продолжил ученик Йожеф Тидьи, а затем и Миклош Келлермайер со своей группой [85]. В 1994 году я был удостоен почетной докторской степени университета города Печ.

8.2. Ленинградская школа Насонова—Трошина

Дмитрий Николаевич Насонов (1895—1957) родился в Варшаве, в семье профессора зоологии. Свою научную деятельность он начал гистологом, одно время обучался в Колумбийском университете в Нью-Йорке под руководством цитолога Эдмунда Уилсона, упоминавшегося выше. За доблесть, проявленную при обороне осажденного Ленинграда во время Второй мировой войны, Насонов был удостоен военных наград. После войны он вернулся в науку. В 1957 году основал Институт цитологии и стал его первым директором.

Благодаря солидному гистологическому фундаменту научную деятельность Насонова в области физиологии клетки отличала стойкая убежденность, что понимание физиологии клетки немыслимо без понимания ее анатомии. А также, что понимание анатомии клетки немыслимо без принятия во внимание того важного обстоятельства, что клетка является сплошным телом, фазой, материалом которой является протоплазма. Общее направление научной деятельности его самого и его ближайших сотрудников можно проиллюстрировать на примере его *белковой теории повреждения и возбуждения клетки* [86].

Насонов также предложил *фазовую теорию* проницаемости и биоэлектрических потенциалов: он утверждал, что у клеток нет мембран с их изменчивой проницаемостью [86, с. 164], и что разность электрических потенциалов по сторонам клеточной поверхности может возникать лишь при повреждении протоплазмы; у клеток в покое такой разности потенциалов нет. Сам Насонов объяснял это так: «С нашей точки зрения электродвижущая сила создается лишь в момент повреждения или возбуждения, когда электролиты освобождаются от связи с белковым субстратом. В этом отношении наша точка зрения приближается к старой альтерационной теории Германа (1885 г.)» (86, с. 178).

Мои взгляды в разной степени расходятся с этими идеями Насонова. Так, двухкратное повышение проницаемости для сахарозы «раневой» поверхности клетки (в опытах с рассечением мышеч-

ных волокон) свидетельствует о том, что диффузионный барьер (или клеточная мембрана) на поверхности клетки все же существует (см. табл. 1 и раздел 13.6). А результаты опытов со стеклянными микроэлектродами Джерарда—Грэхем—Линга [88] заставляют признать существование разности потенциалов на мембране и у покоящейся клетки. К тому же это согласуется с «теорией предсуществования» клеточных потенциалов, предложенной учителем Лудимара Германа, Эмилем Дюбуа-Реймоном [89]. Я позднее вернусь к вопросу, почему Насонов считал, что клеточной мембраны не существует.

Несмотря на расхождение взглядов по отдельным вопросам, я глубоко восхищаюсь отвагой и незаурядностью этого выдающегося ученого. Описанная в разделе 4.1, п. 3 его работа, выполненная в соавторстве с Айзенбергом и Камневым, показавшая, что сморщивание (сжатие) клеток в гипертонических растворах вещества происходит несмотря на то, что это вещество *проникает* в клетку — лишь одно из целого ряда открытий, которыми он и его сотрудники обогатили науку. О других заслугах советской школы перед физиологией клетки можно узнать из монографии Насонова «Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение» [86] и монографии его ученика, А. С. Трошина (1912—1985), которая будет рассмотрена в следующей главе.

Институт цитологии в Ленинграде выжил и после смерти Насонова в 1957 году: пост директора перешел к его лучшему ученику, Афанасию Семеновичу Трошину.

СОРБЦИОННАЯ ТЕОРИЯ ТРОШИНА

Свои взгляды на проблему клеточной проницаемости А. С. Трошин изложил в монографии, опубликованной в 1956 году [90], впоследствии она была переведена на немецкий [91], китайский и английский языки. Английское издание носит название "Problems of Cell Permeability" [92]. Однако содержание этой книги не совсем соответствует ее названию. Проницаемость — это *кинетический процесс*, а в монографии речь, по большей части, идет о распределении веществ между клеткой и средой, которое и Трошин, и другие ученые, включая меня, исследовали как *равновесное явление*. Возможно, Трошин специально определил предмет книги как «проблему проницаемости», чтобы расширить свою аудиторию — ведь подавляющее большинство ученых являлось сторонниками теории мембранного насоса и ошибочно считало равновесное распределение веществ следствием проницаемости именно мембраны с ее особой ролью в клетке.

Трошин особо подчеркивал в предисловии к русскому изданию, перепечатанном и в переводе на английский: «Мы пришли к заключению, что теория эта (мембранная, — *прим. ред.*) дает совершенно превратное представление о строении клетки и о состоянии содержащихся в протоплазме веществ. Вместе с тем мембранная теория, вследствие кажущейся простоты и схематичности в способах объяснения многих загадочных явлений, приобрела большую популярность среди физиологов и, как нам кажется, повела их по ложному пути теоретических исканий [90, с. 3]».

А вот как Трошин сам представил свою книгу: «Согласно теории, созданной Лепешкиным, Насоновым, Фишером и рядом других ученых, большая или меньшая проницаемость клетки для любого вещества объясняется не большей или меньшей способностью этого вещества проникнуть через клеточную мембрану, а различиями в растворимости вещества в воде протоплазмы и окружающей водной среде, и различиями в способности веществ, проникших в клетку, адсорбироваться клеточными коллоидами или химически связываться с ними» [92, р. 3].

Несмотря на эти скромные слова, я убежден, что именно Трошину принадлежит львиная доля заслуг в создании «сорбционной теории» распределения веществ в клетках. Конечно, и Мур с Роуфом, и Фишер, и Лепешкин, и Насонов, и все остальные высказывали ее основные идеи и до него, и каждый из этих пионеров также достоин всяческих почестей. Но лишь Трошину удалось объединить все

эти идеи в рамках количественных измерений и придать им форму математических выражений. Но прежде, чем перейти к работам Трошина, я хотел бы познакомить вас с более ранними опытами И. Е. Камнева.

В 1938 году Камнев опубликовал в русскоязычном журнале «Архив анатомии, гистологии и эмбриологии» скромную, но очень важную статью под названием «Проницаемость поперечнополосатой мышцы лягушки для сахаров» [34]. Он сообщил в ней, что при погружении живой мышцы в раствор Рингера с сахарозой или галактозой оба сахара легко проникали в мышечные волокна, достигая в них некой постоянной концентрации, которая оказывалась ниже их концентрации в окружающем растворе (рис. 2). В погибших же волокнах концентрация сахарозы либо галактозы почти выравнивалась с их концентрацией в окружающей среде.

Камнев, анализируя полученные результаты, исходил из допущения, что межклеточное пространство составляет 9% от объема мышцы [86, с. 117], и что вся обнаруженная в мышце сахароза (или галактоза) сверх того количества, что заполнило межклеточное пространство, очевидно, находилась внутри мышечных волокон. Однако в литературе можно найти и другие данные об объеме межклеточного пространства в мышце, — вплоть до 35% [336, р. 677], — так что правомерность выводов Камнева целиком зависит от того, правильной ли была цифра в 9%.

Результаты работ, проведенных в моей собственной лаборатории, свидетельствуют о его правоте. Так, в период с 1967 по 1975 год мной и моими сотрудниками величина доли внеклеточного пространства была исследована *пятью* независимыми методами, четыре из которых были совершенно новыми: проба с инулином в низких концентрациях — 10,3%; проба с полиглутаматом — 8,9%; моноволоконный сахарозный тест — 9%; метод анализа выхода ⁸⁶Bг — 8,2%; метод центрифугирования — 9,4% [49, р. 136]. Среднее значение доли межклеточного пространства мышцы лягушки составило 9,2% со среднеквадратичным отклонением $\pm 0,69\%$, что почти соответствует тем 9%, из которых исходил Камнев. Полученные нами доказательства способности сахарозы проникать в мышечные клетки лягушки приведены в табл. 1. Они подтверждают ключевой вывод Камнева о способности сахарозы преодолевать поверхностный диффузионный барьер клетки.

Камнев пришел к заключению, что равновесный уровень сахаров в мышечных клетках определяется не мембранными механизмами, а их растворимостью в саркоплазме, чем придал высказанной ранее мысли Мартина Фишера [7] более универсальный характер. Камнев высказал убеждение, что саркоплазма ведет себя по отношению к воде окружающей среды как фаза, и ее свойства как растворителя отличаются от обычной воды.

Через десять лет после статьи Камнева Трошин продолжил эту мысль, указав, что не только концентрация галактозы и сахарозы,

но и других неэлектролитов внутри клетки может быть только ниже, чем концентрация этих веществ в окружающей среде [93]. Именно высокая и на удивление одинаковая скорость проникновения этих веществ в мышцы лягушки и в другие клетки (см. 16.6, п. 3.2), но при этом разная конечная (равновесная) внутриклеточная концентрация побудила, видимо, Насонова предположить, что клеточной мембраны вовсе не существует [86, с. 164—165]. (Я уже говорил, что не разделяю этого мнения Насонова. Правда, мы оцениваем рассматриваемую проблему уже с высоты знаний, полученных благодаря технологии радиоактивных меток, которой во времена Насонова и Трошина еще не было.)

Вслед за Бунгенберг-де-Йонгом, Лепешкиным, Дюкло, Гийермоном, Опариним и остальными [324; 92, р. 58] Трошин предположил, что клетки по своей физико-химической природе близки к комплексным коацерватам. Опираясь на результаты работы лаборатории Бунгенберг-де-Йонга, наряду со своими собственными данными, Трошин продемонстрировал, что концентрация различных веществ в воде простого желатинового коацервата, как и в клеточной воде, ниже, чем в окружающем растворе. Однако ни Камнев, ни Трошин не предложили какого-либо объяснения, почему вода внутри клеток отличается от обычной объемной воды, и почему сахароза и галактоза хуже растворяются в клеточной воде. Они также не смогли объяснить, почему мочевины и этиленгликоль, напротив, распределяются так, что их равновесная концентрация по обе стороны клеточной поверхности одинакова [см. раздел 5.1].

Вот что писал Трошин о влиянии метаболизма на распределение веществ: «Сорбционная способность протоплазмы поддерживается на определенном уровне благодаря метаболизму... При прекращении метаболизма этот уровень меняется: растворимость веществ в протоплазме возрастает, а связывание некоторых веществ клеточными коллоидами снижается» [92, р. 373—374]. Он, однако, не высказал каких-либо предположений о механизме увеличения растворяющей способности воды протоплазмы и снижения ее сорбционной способности после прекращения метаболизма. Четырьмя годами ранее Насонов свою главу «Биоэлектрические потенциалы и клеточный метаболизм» завершил выводом о том, что энергия, очевидно, необходима для существования некоторых неустойчивых химических соединений, в том числе для поддержания структуры белков [86, с. 202—203]. Однако он, опять же, не объяснил, каким именно образом энергия поддерживает структуру белков и других неустойчивых веществ.

Созвучно идеям, впервые высказанным Мартином Фишером (и отчасти Муром и Роуфом), Трошин делил все вещества внутри клетки на две категории: *адсорбированные* (или связанные каким-то иным образом) и *растворенные в клеточной воде*. Он также предложил уравнение A1 (см. приложение), в которое вошел линейный параметр, характеризующий концентрацию растворенного в клеточной

воде вещества в соответствии с законом Генри (или, точнее, — в соответствии с законом распределения Бертло—Нернста, лишь частным случаем которого для *газов* является закон Генри [13, р. 696—697]), а также «функция с насыщением» — изотерма адсорбции Ленгмюра [117]. Трошин также показал, как описывать равновесное распределение разных веществ между клеткой (или коацерватом) и средой, используя это уравнение. Я не раз предлагал назвать это уравнение «уравнением Трошина» в честь его автора, умершего от рака в 1985 году [173, р. 20; 174, р. 285].

После смерти Трошина дух и философия протоплазматически ориентированной цитофизиологии в Институте цитологии начали понемногу угасать. Только с приходом в него Владимира Васильевича Матвеева (в 1997 г.), ранее работавшего в Институте биологии моря Академии наук СССР и получившего образование в Лаборатории физиологии клетки Ленинградского государственного университета под руководством учеников Насонова — И. П. Суздальской и В. П. Трошиной, в Институте появился человек, который продолжает отстаивать значение научного наследия школы Насонова и необходимость возвращения к ее ценностям [554]*. Однако вернемся в 1951 год, когда молодой Трошин опубликовал серию из пяти коротких статей о распределении веществ между коацерватами/клетками и средой [93]. В том же году я написал небольшую работу, где представил суть того, что позже будет названо теорией фиксированных зарядов Линга [94].

* См. также: Matveev V. V. Protoreaction of Protoplasm. Cell. Mol. Biol. 2005, 51(8): 715—723. Прим. ред.

ТЕОРИЯ ФИКСИРОВАННЫХ ЗАРЯДОВ ЛИНГА

Я уже упоминал, что мое обучение цитофизиологии начиналось в известном на весь мир отделе физиологии Чикагского университета под руководством профессора Ральфа Джерарда. Подобно всем моим ровесникам, я был полностью убежден, что мембранная теория — это единственная путеводная звезда на небосклоне науки. Логично, что мои первые серьезные публикации, написанные в соавторстве с профессорами Джерардом и Вудбери, были посвящены «мембранному потенциалу» [95], сам термин, и концепция которого рождены логикой мембранной теории.

Вскоре после проведения на кафедральном семинаре презентации «теории натриевого насоса» [49, р. 124], подготовленной мною исключительно на основе данных литературы, я уже и сам начал проводить несложные опыты. Моей целью было проверить, на самом ли деле, как следует из этой теории, одновременное воздействие метаболических ядов и низкой температуры (0 °С) резко снижает уровень K^+ в мышце лягушки. Результат оказался весьма неожиданным. Вплоть до окончания пятичасового эксперимента уровень K^+ оставался неизменным (см. табл. 8.4 в статье [49]). И чем дальше я углублялся в этом новом направлении, тем больше я сомневался в основах теории натриевого насоса.

Я потратил массу времени и фантазии, чтобы придумать какой-нибудь альтернативный энергосберегающий механизм распределения K^+ и Na^+ между клеткой и средой взамен принятому на веру невероятно расточительному натриевому насосу. Проходили годы, а я все топтался на месте. Но однажды я копался в библиотеке Уэлча Медицинской школы Джонса Хопкинса в Балтиморе, и вдруг меня осенило. Возникшая идея стала основой того нового подхода, который впоследствии был назван теорией фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ) [96], явившейся первым шагом к созданию единой теории цитофизиологии — теории ассоциации-индукции (теория АИ) [98]. Суть этой теории будет изложена здесь, а также в главах 11, 14 и 15.

Насколько мне известно, мысль, что калий внутри клетки адсорбируется предпочтительней натрия, была впервые высказана в 1908 году Гербертом Роуфом и Бенджамином Муром. Тем не менее, как я уже подчеркивал, до появления ТФЗЛ ни они, ни кто-либо другой не предложил количественного молекулярного механизма, объясняющего столь странную способность клетки делать различие между этими столь близкими по свойствам ионами. Также никто

10.1. Теория избирательного накопления K^+ в присутствии Na^+

10.2. Экспериментальное подтверждение ТФЗЛ (и некоторых положений теории АИ)

не попытался объяснить, как белкам, — наиболее вероятным кандидатам на роль субстрата, избирательно связывающего K^+ в присутствии Na^+ , — удастся выполнять эту функцию в живой клетке, и почему неоднократные попытки воспроизвести это явление *in vitro* неизменно проваливались [99; 41, p. 120]. Никто не смог также объяснить на молекулярном уровне, почему способность к избирательной адсорбции (если она существует) мгновенно теряется при гибели клетки. Теория фиксированных зарядов Линга — результат моих первых попыток ответить на эти вопросы.

10.1. Теория избирательного накопления K^+ в присутствии Na^+

Для создания логически последовательной теории (ТФЗЛ) предпочтительной адсорбции K^+ и сопряженных с этим явлений, о которых кое-что уже сказано выше, были введены три новые теоретические концепции. В библиотеке мне тогда пришла в голову лишь одна из них — под номером 3.

1. Усиление ассоциации противоионов (или нейтральных молекул) с центром связывания, если он становится неподвижным, фиксированным

Эта концепция была представлена в 1952 году. Она заключается не в утверждении самого факта существования фиксированных зарядов, — он был установлен гораздо раньше [100], — а в том, что фиксированное состояние заряда приводит к такому усилению его взаимодействия со свободными противоионами, которое создает предельное насыщение пространства вокруг него этими противоионами (*теория полной ассоциации*), такими, например, как K^+ или Na^+ . Именно эта концепция и отличает ТФЗЛ и теорию ассоциации-индукции от всех остальных «теорий фиксированных зарядов» прошлого и настоящего [101]. Ведь без предельного сближения противоионов избирательная адсорбция K^+ в присутствии Na^+ , в соответствии с предложенной мною моделью избирательности (см. ниже п. 3) и соответствующих механизмов, рассмотренных в разделе 14.1, была бы попросту невозможна.

Под влиянием великих теорий ионной диссоциации Аррениуса [102], а также Дебая и Хюккеля [103], принято считать, что в разбавленном водном растворе (в клетке, например) одновалентные ионы одного электрического заряда и одновалентные ионы противоположного знака полностью диссоциированы вне зависимости от того, фиксирован ли один из этих ионов в пространстве или нет. (Насколько глубоко укоренилось это убеждение, см. следующие иллюстрации: рис. 1 в [104]; рис. 5 в [100]; рис. 1 в [105]). В полном соответствии с верой во всемогущество ионной диссоциации, влиятельный датский ученый Кай Ульрик Линдерстрём-Ланг, занимавшийся химией белков и возглавлявший Карлсбергскую лабораторию в Копенгагене, описывал молекулу белка как эллипсоид, электрический заряд которого равномерно распределен по его поверхности, окруженный диф-

фузным облаком противоионов, количество которых соответствует избытку зарядов противоположного знака на молекуле белка [467]. По мнению Линдерстрёма-Ланга, белки не вступают в непосредственный контакт с противоионами. Этот пример покажет читателю, насколько резко моя точка зрения, которую я изложу ниже, выбивается из общего потока мнений.

Одной из двух названных мной в 1952 году причин усиления ассоциации противоионов при *пространственной фиксации* одного из них независимо от его знака [96, р. 769] было перекрытие электрических полей соседних фиксированных зарядов противоположных знаков. Это перекрытие — не что иное, как микроскопическая реализация так называемого *закона макроскопической нейтральности* [97, р. 330—331]. При перекрытии полей не только возрастает *прочность связывания* иона (см. раздел 14.2, п. 1), но и диссоциировавший противоион надежнее удерживается на близком расстоянии от фиксированных ионов [96, р. 769]. Это пространственное ограничение его подвижности означает снижение *энтропии диссоциации* противоиона и увеличение, в конечном счете, вероятности его связанного состояния. Действительно, если K^+ связывается с фиксированным анионом, окруженным фиксированными катионами, то энергия его связывания с анионом возрастает из-за того, что диссоциация в направлении к одноименным фиксированным зарядам становится менее энергетически выгодной. Кроме того, и достаточно плотное расположение фиксированных анионов также значительно увеличивает вероятность связанного состояния K^+ или другого катиона.

Вторая причина усиления ассоциации, также высказанная мною в 1952 году, — чисто кинетическая по своей природе. Однако *именно здесь и сейчас впервые будут детально изложены ее особые механизмы*. Считается, что шанс образования ассоциированной пары катион-анион почти не зависит от того, фиксирован ли один из них в пространстве. Однако в случае фиксации одного из ионов вероятность диссоциации пары под ударами молекул воды, например, уменьшается как минимум вдвое из-за того, что фиксированная часть пары остается на месте, не движется навстречу другой молекуле, в результате скорость их столкновения значительно снижается (по меньшей мере, на 50%), соответственно снижается и вероятность того, что налетевшая молекула выбьет связанный катион. Результат, опять же, — усиление ассоциации. Обратите внимание, что первая причина (перекрытие полей) относится лишь к заряженным частицам (т. е. ионам), тогда как вторая (кинетическая) не зависит от заряда и, таким образом, относится к любому локальному акту *адсорбции* — ионов, воды и других веществ.

Теория усиления ассоциации противоионов (и нейтральных адсорбатов) с фиксированными центрами связывания в последующие годы неоднократно рассматривалась в моих публикациях [98, р. 17—28; 106, р. 152—155; 107, р. 39—41]. Ее решающее значение для возникновения прочной ассоциации в живых системах отражено

и в самом названии итоговой теории — теории *ассоциации-индукции*. Не успела она появиться на свет, как стало ясно, что факты, которые она предсказывает, уже имеются в литературе о состоянии ионов [469; 98, р. 17—22; 107, р.40] и воды [470] в модельных системах. Вот один из них.

Керн продемонстрировал, что коэффициент активности Na^+ в растворах натриевой соли изомасляной кислоты ($\text{CH}_3\text{CHCOONa}$) концентрацией 12,5—200 мМ варьирует от 0,90 до 1,00, то есть не менее 90% Na^+ находится в свободном состоянии. Если же мономеры изомасляной кислоты соединены в линейный полимер — полиакриловую кислоту ($\text{CH}_2\text{CHCOONa}$)_n, — то карбоксильные группы оказываются в этом случае *зафиксированными в пространстве*, вернее, их подвижность по сравнению с мономером, оказывается в этом случае значительно более ограниченной. Коэффициент активности Na^+ в том же самом диапазоне молярных концентраций полимера падает до 0,168—0,315, то есть 68—83% ионов Na^+ оказывается связанными карбоксильными группами полимера [469].

2. Теория белковых солевых связей и значение АТФ в их динамике

Как гласит ТФЗЛ, отрицательно заряженные β - и γ -карбоксильные группы изолированных нативных белков участвуют большей частью в образовании *солевых связей* с фиксированными катионами (например, с положительно заряженными ϵ -аминогруппами и гуанидиновыми группами остатков соответственно лизина и аргинина) [108], что лишает их способности адсорбировать свободные катионы, в частности, K^+ . Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), связываясь с *кардинальными центрами адсорбции* (см. раздел 14.3, п. 3), играющими ключевую регуляторную роль, приводит к разрыву солевых связей между остатками аминокислот и освобождает фиксированные заряды соответствующих белков для взаимодействия с ионами K^+ и другими заряженными частицами.

В этих ранних представлениях механизм действия АТФ сводится к тому, о чем уже писали Райзман и Кирквуд, когда объясняли, почему АТФ препятствует самосокращению или спонтанному укорочению сократительных белков (таких, как миозин), которые эту кислоту связывали: АТФ, связанная *in vitro* с белками, придает им значительный отрицательный заряд, который препятствует сворачиванию полипептидной цепи, удерживая ее в «спрямленном» состоянии [109]. Позднее, в теории ассоциации-индукции, я предложил несколько иной (хотя и сходный) механизм (см. раздел 14.3). АТФ, бесспорно, является аккумулятором энергии. Ее решающее значение в поддержании избирательной адсорбции K^+ белками, согласно ТФЗЛ, объясняет, почему при повреждении или гибели клетки, когда метаболизм в ней замедляется или прекращается вовсе, прекращается и синтез АТФ, кардинальные центры адсорбции освобождаются от взаимодействия с АТФ, в белках снижается количество свободных для взаимодействия фиксированных зарядов, и K^+ выходит из клетки.

3. Электростатическая модель избирательного накопления в клетке K^+ в присутствии Na^+ , созданная в 1952 году

Приняв во внимание явление *диэлектрического насыщения* [110], возникающее при электростатическом взаимодействии между фиксированным анионом и свободным одновалентным катионом в реальной среде, а не в вакууме, можно вычислить вероятность, с которой он может находиться на том или ином расстоянии от отрицательно заряженного атома кислорода \ominus - или \square -карбоксильной группы остатков соответствующих аминокислот (кривая 2 на рис. 6). Резкое снижение относительной диэлектрической проницаемости среды при

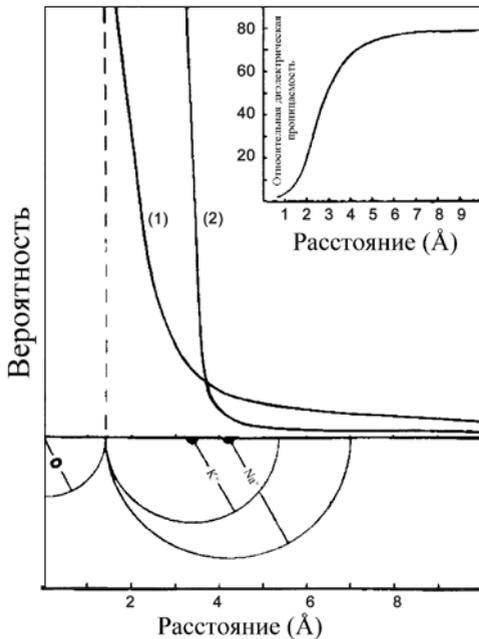


Рис. 6. Схема, объясняющая природу избирательной адсорбции K^+ в присутствии Na^+ фиксированным анионом. Эта модель впервые представлена в 1952 году как составная часть теории фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ). При расчетах учтено не только расстояние между зарядами, но и снижение относительной диэлектрической проницаемости среды по мере сближения зарядов (показано на врезке). Кривая 2 показывает зависимость вероятности нахождения одновалентного катиона (к примеру, K^+ или Na^+) на определенном удалении от кислородсодержащей кислотной группы (O, в левом нижнем углу графика) в зависимости от расстояния между их центрами (в Å, ось абсцисс). O — кислород карбоксильной группы остатка бикарбонной аминокислоты. В нижней части рисунка схематически изображены гидратированные ионы Na^+ и K^+ . Обратите внимание, что лишь гидратированный ион K^+ , имеющий меньший радиус, может войти в «область высокой вероятности ассоциации» с атомом кислорода (3—4 Å) и, в результате, избирательно адсорбироваться, тогда, как центр более крупного гидратированного иона Na^+ остается за пределами этой области (дальше 4 Å от атома кислорода) [96].

сближении заряженного центра и иона, показано на рис. 6 (врезка). При удалении заряженных частиц друг от друга, между ними оказывается все больше и больше молекул воды, относительная диэлектрическая проницаемость, или постоянная, которой приближается к 80 (диэлектрическая постоянная показывает, напомним, во сколько раз взаимодействие между зарядами слабее в данной среде, чем в вакууме).

В нижней части рис. 6 приведены диаметры гидратированных ионов — K^+ , меньшего по размеру, и на 40% более крупного иона Na^+ [98, р. 548; 111]. Обратите внимание, что гидратированный ион K^+ способен подойти так близко к фиксированному аниону, что вероятность его захвата будет гораздо больше, чем у Na^+ , отделенного

от аниона более толстой гидратной оболочкой. В этом и кроется секрет избирательного связывания K^+ , которому присутствие Na^+ помехой быть не может.

То, что изображено на рис. 6, — первый в своем роде *количественный молекулярный механизм избирательной адсорбции K^+ в присутствии Na^+* . Прежде чем перейти к более подробному описанию этого механизма (см. раздел 14.1), мне хотелось бы выразить его простыми словами: из-за того, что фиксированный анион и K^+ разделяет меньшее расстояние, чем в случае с Na^+ , ионы K^+ оказываются в области с большей *напряжённостью электростатического поля* не только в силу закона Кулона, но и из-за меньшего значения диэлектрической постоянной среды. В результате ион K^+ адсорбируется на β - и γ -карбоксильных группах более прочно по сравнению с ионом Na^+ , в чем и заключается количественный молекулярный механизм избирательного накопления клетками K^+ в присутствии Na^+ , не требующий непрерывного потока энергии для поддержания асимметричного распределения ионов между клеткой и средой (более подробное описание этой модели см. [98, р. 54—57]).

Необходимо отметить, что миозин мышечных волокон несет множество β - и γ -карбоксильных групп (как и другие белки, сходные с ним в этом отношении). При адсорбции АТФ на регуляторные *кардинальные центры* (см. раздел 14.3, п. 3) миозина количество β - и γ -карбоксильных групп, способных связывать либо K^+ , либо Na^+ значительно возрастает. Но поскольку размеры гидратированного иона K^+ меньше, чем Na^+ , адсорбция первого энергетически более выгодна. В результате K^+ избирательно накапливается клеткой, в отличие от Na^+ .

Остается добавить, что именно с этой мысли в 1952 году началась ТФЗЛ и теория ассоциации-индукции. Предложенные тогда механизмы остаются в силе и по сей день, как будет видно из следующего раздела.

10.2. Экспериментальное подтверждение ТФЗЛ (и некоторых положений теории АИ)

Работа над экспериментальной проверкой ТФЗЛ заняла более 40 лет. Ее результаты я резюмирую ниже.

1. Цитоплазма, а не клеточная мембрана, избирательно аккумулирует K^+ в клетке и вытесняет из нее Na^+

На рис. 7 изображен препарат *безнасосной незамкнутой клетки* (БНК), изготовленный из портняжной мышцы лягушки [112, 113]. Такая мышца содержит около 1000 тончайших мышечных волокон (клеток), каждое при ширине около 0,006 см и длиной 2,5—3,0 см; все они идут параллельно друг другу и тянутся от одного конца мышцы до другого. Тазовый конец мышцы закреплен на фиксирующей струне (f), а другой, большеберцовый (или дистальный) — свободно выходит в раствор через плотно пригнанную, заполненную вазелином

щель (g) в пробке из силиконовой резины, закупоривающей устье стеклянной пробирки. Затем выступающий в раствор конец мышцы отсекается непосредственно под силиконовой пробкой, клетки «открываются» и цитопlasма каждого мышечного волокна одновременно приходит в соприкосновение с радиоактивными изотопами ^{42}K и ^{22}Na , добавленными в раствор Рингера (e), омывающий «открытые», «незамкнутые» мышечные клетки. Остальная часть мышцы подвешена в пробирке и находится частью в вазелиновом масле (c) и большей частью — во влажном воздухе над вазелином. Я уже

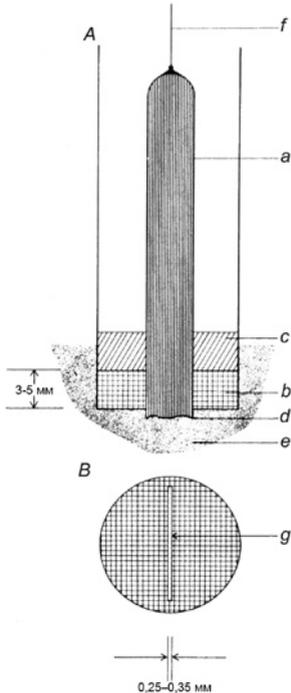


Рис. 7. Препарат безнасосной незамкнутой клетки (БНК), приготовленный из портняжной мышцы лягушки (дистальный конец внизу). А — вид сбоку; В — вид снизу. Лишь рассеченный конец (d) портняжной мышцы (a) находится в контакте с радиоактивно меченым раствором Рингера (e). Рассеченная мышца одним концом плотно закреплена в щели (g) пробки из силиконовой резины (b), другим — присоединена к фиксирующей струне (f). Вазелин (c), заполняющий нижнюю часть стеклянной пробирки и щель между мышцей и пробкой, препятствует просачиванию через эту щель раствора Рингера. Препарат предложен Лингом [112].

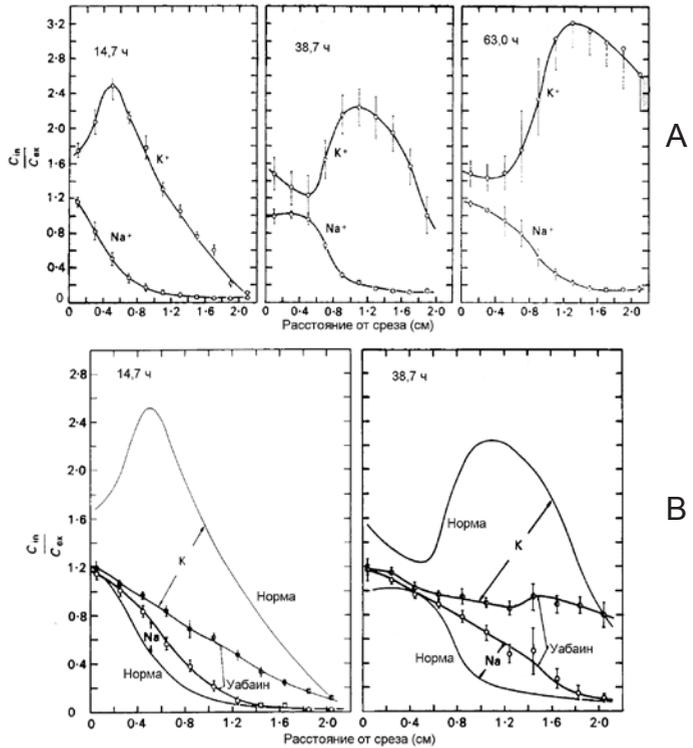
говорил, что специальные исследования позволили удостовериться в том, что регенерации клеточной мембраны на рассеченном конце мышечных волокон не происходит [42; 113], раздел 4.1, п. 4.

Поскольку ни вазелин, ни влажный воздух не содержат никаких ионов и физически не способны быть средой, с которой клетка могла бы обмениваться чем бы то ни было, то натриевый насос (реальный или гипотетический) оказывается при таких обстоятельствах не у дел и уже не может привлекаться для объяснения тех или иных изменений в ионном составе клеток. В этом смысле такой препарат можно назвать безнасосным. Если верить мембранной теории, с течением времени концентрации K^+ и Na^+ по всей длине мышечных волокон такого препарата должны постепенно сравняться с их концентрациями в растворе Рингера, поскольку мембрана, регулирующая обмен

ионами со средой, отсутствует, а внутриклеточные ионы свободны и ничто не мешает им двигаться в соответствии с концентрационными градиентами.

Но в эксперименте распределение меченых ионов оказалось совершенно иным. Весьма любопытные данные представлены на рис. 8. В неповрежденной части мышцы (на некотором удалении от среза) содержание радиоактивного изотопа K^+ по мере инкубации неуклонно *возрастало*, достигая значений много выше, чем в растворе Рингера (в 2,5 раза через 15 часов и в 3,2 раза через 63 часа; панель А); уровень же меченого Na^+ оставался на отметках, характерных для

Рис. 8. Изменение внутриклеточного содержания меченых ионов K^+ и Na^+ в зависимости от расстояния от места среза (ось абсцисс) в препаратах «безнасосных незамкнутых клеток» (БНК, рис. 7) портняжных мышц лягушки. Измерения проводили по окончании инкубационного периода, продолжительность которого при температуре $25^\circ C$ указана на соответствующих графиках. Панель А: раствор Рингера с мечеными катионами без уабаина. Панель В: раствор Рингера с мечеными катионами и с уабаином ($10^{-4} M$). На оси ординат отложено отношение концентрации меченого K^+ или Na^+ внутри клетки ($C_{ин}$) к их концентрации в растворе Рингера (C_{ex}). (По Лингу [112]).



нормальных клеток (0,1—0,2 от концентрации в омывающем растворе). В сегментах мышечной клетки, более удаленных от среза, содержание метки снижалось в силу диффузионных ограничений.

Важно также отметить, что уровень меченого Na^+ в *межклеточном пространстве* (на том коротком участке, который не был защищен от проникновения в него раствора Рингера силиконовой пробкой и вазелиновым маслом) быстро выравнивался с уровнем метки в растворе Рингера и оставался *одним и тем же на любом удалении от среза* (об этом следует помнить и при анализе экспериментов с меченым K^+). Это означает, что снижение содержания натриевой метки

в мышечных волокнах по мере удаления от среза нельзя объяснить выходом метки в межклеточное пространство, так как концентрация метки в нем такая же, по условиям опыта, как и в волокне.

Рассмотренные данные глубоко противоречат теории мембранного насоса и полностью согласуются с ТФЗЛ и теорией АИ в том, что содержание K^+ и Na^+ в клетке определяется свойствами цитоплазмы, и лишь в малой степени движение этих ионов связано с клеточной мембраной, но эта связь, пусть и малая, не имеет никакого отношения к якобы существующим натриевым насосам.

2. *Факты, подтверждающие, что образование солевых связей — главная причина неспособности изолированных белков избирательно связывать K^+*

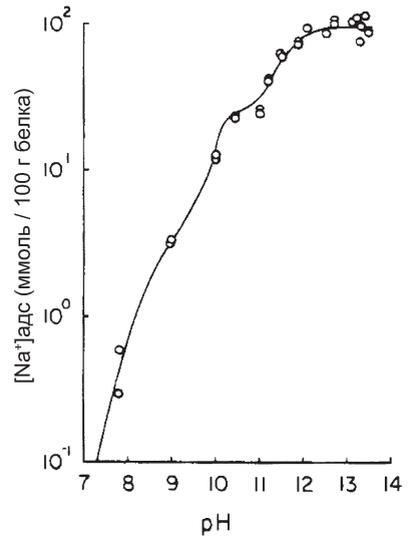
Данные о том, что выделенные нативные белки не способны избирательно связывать K^+ (или Na^+) в заметных количествах [99], в значительной степени способствовали усилению позиций теории мембранного насоса [41, р. 120]. Однако причина отрицательных результатов может крыться в образовании между фиксированными ионами белка *солевых связей* (как я это впервые предположил в 1952 году), а не в принципиальной неспособности белков адсорбировать ионы K^+ и других щелочных металлов; участие β - и γ -карбоксильных групп в солевых мостиках лишает их способности взаимодействовать с ионами металлов [108; 96, р. 774—781; 107, р. 37, п4].

Тридцать шесть лет спустя Линг и Чжан подтвердили «теорию солевых связей». При помощи Na^+ -селективного стеклянного электрода [114] они установили, что если создать условия, при которых солевые связи разрываются (титрованием $NaOH$), карбоксильные группы освобождаются от взаимодействия с фиксированными противоионами и оказываются доступными для взаимодействия со свободными катионами; при этом наблюдается стехиометрическая адсорбция ионов Na^+ и других щелочных металлов на *всех* β - и γ -карбоксильных группах нативного бычьего гемоглобина, выделенного в чистом виде.

На рис. 9 показано, насколько точно количество *адсорбированного Na^+* совпадает с кривыми *титрования различных фиксированных катионов* (настолько близкими друг к другу, что они сливаются в одну кривую), отражающими динамику разрыва солевых связей между фиксированными ионами (или, иными словами, динамику взаимодействия анионов OH^- с фиксированными катионами). Таким образом, на каждый вырванный из солевой связи фиксированный анион (β - или γ -карбоксильная группа) приходится один катион Na^+ . Этот эксперимент доказывает, что при определенных условиях β - и γ -карбоксильные группы белка *способны адсорбировать интересующие нас ионы*, в том числе делать это избирательно. По степени сродства β - и γ -карбоксильных групп к катионам они располагаются в следующем порядке: $Na^+ > Li^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$. Но кроме прямого взаимодействия между свободными и фиксированными ионами существует сильное *автокооперативное* взаимодействие между адсорбирующими центрами в процессе адсорбции (раздел

14.3, п. 2). В данном случае, в случае гемоглобина, связывающего Na^+ , параметр $-\gamma/2$ (характеризующий степень автокооперативности) = 0,824 ккал/моль, что соответствует значению коэффициента Хилла (n) 4,05. Такое значение рассматриваемого параметра свидетельствует о выраженном взаимовлиянии соседних фиксированных анионов гемоглобина в процессе адсорбции Na^+ (о связи коэффициента Хилла с кооперативностью см. раздел 14.3, п. 2). Установлено, что не только гемоглобин взаимодействует с рассматриваемыми ионами металлов; взаимодействие с ними показано еще у пяти нативных белков [114].

Рис. 9. Количественная связь между числом фиксированных катионов гемоглобина, нейтрализованных анионами OH^- , и количеством адсорбированного Na^+ . При увеличении pH (раствор гемоглобина титровали раствором NaOH) увеличивается количество разорванных солевых связей между фиксированными протононами (фиксированные катионы имеют большее сродство к ионам OH^-) и, соответственно, — количество фиксированных анионов, способных связывать Na^+ . Количество фиксированных катионов и связанного Na^+ дано в миллимолях/100 г гемоглобина. Точками показаны экспериментальные данные о количестве Na^+ , адсорбированного бычьим гемоглобином (10% раствор) при различных pH. Кривая — консолидированные кривые титрования каждого из трех типов фиксированных катионов: α - и ϵ -аминогрупп и гуанидиновых групп, содержащихся в 100 г бычьего гемоглобина; кривая титрования отражает зависимость числа взаимодействий фиксированный катион— OH^- от pH. (По Лингу и Чжану [114]).



В эритроцитах человека 97% всех внутриклеточных белков составляет гемоглобин [140, р. 389]. Содержание же в них K^+ составляет 96—100 ммоль на литр свежих эритроцитов. Если весь этот K^+ действительно адсорбирован на β - и γ -карбоксильных группах (а подтверждение этому будет дано ниже в подразделе 4.2), их львиная доля должна приходиться именно на гемоглобин. Однако нативный гемоглобин *in vitro* при нейтральном pH не адсорбирует K^+ [484], хотя и делает это в щелочной среде. Но внутри клеток среда именно нейтральна [505], так что во внутриклеточной среде что-то должно имитировать условия щелочной среды и тем самым освободить β - и γ -карбоксильные группы для избирательной адсорбции K^+ . И этим «что-то», согласно ТФЗЛ и теории АИ, является АТФ. В разделе 10.2, п. 6 этой главы и в разделе 15.1, п. 1 и 2 вы найдете экспериментальное подтверждение этого принципиального теоретического постулата.

3. Основная масса клеточного K^+ не является свободной

Ниже я изложу три группы независимо полученных экспериментальных данных, которые в совокупности доказывают связанное состояние K^+ внутри клеток. Они также дают ключ к истинному пониманию имеющихся «доказательств» свободного состояния внутриклеточного K^+ (см. гл. 5, раздел 5.2) и подтверждают, с другой стороны, результаты еще более ранних работ Хёбера, которые рассмотрены в том же разделе.

3.1. Подвижность внутриклеточного K^+

Из раздела 5.2 вы узнали об опытах Ходжкина и Кейнса, результаты которых привели их к выводу, что K^+ в аксоне кальмара находится в свободном состоянии и обладает такими же свойствами, как и ионы калия в растворе KCl концентрацией 0,5 М [263]. Эти выводы затем подтвердили Кушмерик и Подольский в своем исследовании внутриклеточной диффузии в мышечных сегментах [264]. Однако результаты этих и других авторов противоречат данным о проводимости, полученным Рудольфом Хёбером, которые были неоднократно подтверждены [265; 266; 15, р. 244]. Возникает законный вопрос: не было ли методических различий между экспериментами Хёбера (и его сторонников) и опытами Ходжкина—Кейнса—Кушмерика—Подольского?

Ответ однозначен: были! Хёбер и его единомышленники работали только на целых *интактных* мышечных волокнах, а Ходжкин—Кейнес—Кушмерик—Подольский — только на *рассеченных*.

Опыты с препаратами БНК показали, что цитоплазма мышечных волокон вблизи срезов быстро разрушается. Это сопровождается выходом из волокна K^+ и ростом содержания Na^+ в этой области (рис. 8А) (см. также [112, Fig. 6]). Возможно, Кушмерик и Подольский [264], ставившие опыты на коротких (длиной всего 3—6 мм) фрагментах мышц, не подозревали, что исследовали разрушающуюся или даже погибшую цитоплазму, так как поверхности срезов были *слишком близки друг к другу*.

Ходжкин и Кейнес, со своей стороны, изучали *фрагменты* гигантских аксонов каракатицы. Во время исследований они следили за жизнеспособностью аксонов, время от времени проверяя их электрическую возбудимость. Из одиннадцати экспериментов в трех аксоны теряли свою возбудимость еще до конца опыта. Несмотря на явные различия в функциональном состоянии препаратов, подвижность меченого K^+ во всех одиннадцати экспериментах была примерно одинакова, поэтому авторы решили: «Во всяком случае, нет никаких доказательств, что потеря возбудимости существенно влияет на подвижность» [263, р. 523].

На рис. 8А можно легко выделить область повреждения вблизи среза и заметить, как она расширяется со временем (см. также [86, р. 42—43]). Данные этого же рисунка показывают, что неповрежденный конец мышечного волокна остается живым несколько дней: это

видно по нормальному уровню K^+ и Na^+ [112, Fig. 6]. Следовательно, для корректного определения подвижности клеточного K^+ необходимо исключить из эксперимента области вблизи сечения и сосредоточиться на *неповрежденных участках* клетки. Именно эта мысль была заложена в исследование Линга и Оксенфельд, в котором мы измеряли коэффициент диффузии K^+ (меченного радиоактивным ^{42}K) и радиоактивной тритиевой воды в препаратах БНК из портняжных мышц лягушки [312].

Тогда, в 1973 году, мы впервые предприняли следующий эксперимент: изолированную портняжную мышцу лягушки инкубировали в физиологических условиях с радиоактивным ^{42}K (а также с тритиевой водой H^3HO или без нее) до достижения диффузионного равновесия по меченому K^+ в специальной инкубационной среде (раствор 731), разработанной для длительного содержания мышц лягушки в условиях изоляции [381]. Затем мы изготавливали из этой мышцы препарат БНК (см. рис. 7), срез которого омывался большим объемом раствора Рингера, не содержавшего радиоактивных меток. Выход меченого K^+ и воды из мышцы в среду через срез представлен на рис. 10.

Важнейшим результатом проведенной работы явилось обнаружение существенных различий скорости диффузии в поврежденных и неповрежденных частях клетки. Одни экспериментальные данные хорошо аппроксимируются при использовании в расчетах одного коэффициента диффузии (панели F—L), для аналитического выражения других — необходимо два. Действительно, экспериментальные значения, полученные вблизи среза, отражают более высокую скорость диффузии, чем соответствующие данные для неповрежденных участков мышечного волокна (панели B—E).

Были проведены 72 (семьдесят две!) независимые серии экспериментов, по результатам которых можно заключить, что в неповрежденной цитоплазме, вдали от среза, коэффициент диффузии K^+ (D_K) равен всего лишь *одной восьмой* ($1/8$) от D_K в растворе KI концентрацией 0,1 M. В мышцах же, отравленных метаболическим ядом иоацетатом натрия, D_K незначительно отличался от D_K свободного K^+ , составляя около $3/4$ от величины последнего (это еще до наступления полного окоченения мышцы — панели I—L — и при сохранении прижизненной длины покоя). А в убитой цитоплазме, посмертные изменения в которой завершились, D_K занимает промежуточное положение, составляя около $1/3$ от коэффициента диффузии свободного K^+ .

Коэффициент диффузии тритиевой воды в неповрежденных участках тех же мышечных волокон, в которых измеряли D_K , был всего в два раза меньше коэффициента диффузии тритиевой воды в обычной воде, что не сравнимо с восьмикратным уменьшением коэффициента диффузии клеточного K^+ . Эта огромная разница между водой и K^+ резко противоречит данным Кушмерика и Подольского, что коэффициент диффузии каждого из шести разных веществ в два

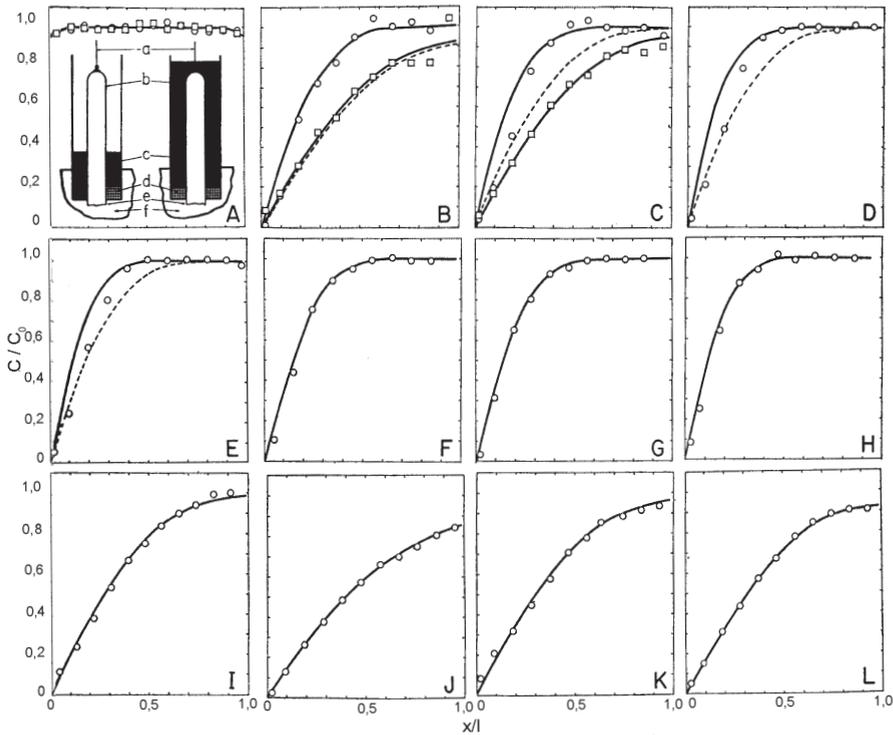


Рис. 10. Диффузионный выход меченого K^+ из мышечных волокон живых (В—Н) и убитых метаболитическим ядом (I—L) портняжных мышц лягушки в физиологический раствор без метки (выход осуществлялся только через поверхность поперечного среза препарата БНК). На оси ординат — отношение остаточной концентраций (C) меченого K^+ (панели А—L) или тритиевой воды (панели А—С) в мышечном волокне к их начальной концентрации (C_0), принятой за 1. На оси абсцисс — расстояние (x) от среза в долях от длины усеченного волокна (l), также принятой за 1. Кружочки соответствуют $^{42}K^+$, квадратики — тритиевой воде. Кружочки и квадратики в верхней части рисунка А обозначают соответственно содержание ^{42}K и тритиевой воды в самом начале эксперимента в разных сегментах портняжной мышцы лягушки в виде препарата БНК после нагрузки мышечных волокон мечеными ионами K^+ и меченой водой до насыщения (такие, исходные, препараты отправляли на анализ после кратковременного контакта с омывающим раствором, когда выход меток едва начинался). Препарат БНК, показанный на панели А, более подробно изображен на рис. 7. Кривые, иллюстрирующие выход метки, — результат аналитического представления экспериментальных данных на основе теории диффузии [277]. В диффузионных уравнениях, использованных для описания экспериментальных данных на панелях F—L, оказалось достаточным использование одного коэффициента диффузии в выражении $D_K \cdot t/l^2$, где D_K — коэффициент диффузии K^+ , t — продолжительность эксперимента, а l — длина мышцы в препарате БНК. На графиках В—Е пунктирными и сплошными линиями показаны расчетные кривые, каждая из которых лишь частично описывает экспериментальные данные (кривым соответствуют разные значения D_K). На графиках I—L представлены экспериментальные данные для мышц, предварительно обработанных метаболитическим ядом иодуксусной кислоты, вызвавшей их гибель. Ко времени изготовления препарата БНК они были полностью окоченевшими, однако эксперимент ставился так, чтобы их длина в препарате БНК была равна длине покоя соответствующей части интактной мышцы. (По Лингу и Оксенфельд [312]).

раза ниже в клетке, чем в воде *независимо* от химической природы соединения [264].

Наши результаты позволяют предположить, что Ходжкин, Кейнес, Кушмерик и Подольский получили высокий D_K потому, что проводили эксперименты с серьезно поврежденной или даже убитой цитоплазмой. В наших экспериментах мы тщательно контролировали физиологическое состояние клетки и пришли к очевидному выводу: если у клеточного K^+ коэффициент диффузии в восемь раз меньше, чем у свободного, то это свидетельствует о том, что его основная масса в мышечных волокнах лягушки явно находится в связанном состоянии.

В свою очередь, у Кушмерика возникло подозрение [270], что наш коэффициент диффузии оказался таким небольшим из-за потенциала, возникающего на срезе (что-то вроде потенциала покоя), который замедляет выход K^+ . Такая возможность была, однако, отвергнута как опытами, так и теоретическими выкладками [271].

Я экспериментально показал, что скорость диффузионного выхода радиоактивно меченных ионов через срез портняжной мышцы в препаратах БНК (рис. 7) *не меняется* после компенсации электрического потенциала на нем (какой бы величины он ни был). Полная деполяризация поверхности среза достигалась погружением мышцы в изотонический раствор KCl до и во время эксперимента [271]; использованный раствор KCl является эффективным средством для достижения этой цели [292]. Таким образом, даже если по сторонам среза мышечного волокна и существует какая-либо разность электрических потенциалов, она не влияет на скорость выхода ионов из волокна через поверхность среза; у нас еще будет возможность убедиться в справедливости этого вывода.

Независимый от других ионов выход через срез сколько-нибудь заметного количества положительно заряженного K^+ невозможен [97, р. 330—331], так как противоречил бы закону макроскопической электронейтральности. Следовательно, диффузия K^+ из мышечного волокна должна сопровождаться либо диффузией в этом же направлении эквивалентного количества анионов, либо обменом на эквивалентное количество наружных катионов, либо же обоими этими процессами. *Эти сопряженные процессы строго сбалансированы, не ведут к появлению асимметрии в распределении зарядов и потому их конечный результат — электрическая нейтральность; значит их течение, в конечном счете, безразлично к наличию или отсутствию разности электрических потенциалов на поверхности сечения.*

3.2. Дисперсионный рентгеновский микроанализ

При прохождении через тонкий слой водного раствора пучка рентгеновских лучей с узким спектром, компоненты раствора поглощают фотоны определенной длины волны в зависимости от химического состава (K^+ , Na^+ и др.) и электронных состояний атомов (зависящих

от ближних взаимодействий), с которыми фотоны взаимодействуют. В результате, получив *тонкую структуру спектра поглощения*, можно установить характер микроокружения поглощающих энергию атомов или ионов. Хуан с сотрудниками установили, что тонкая структура спектра поглощения для K^+ в эритроцитах лягушки существенно отличается от таковой в растворе соли калия той же концентрации [115]. Из этого различия они сделали вывод, что в эритроцитах K^+ находится в связанном состоянии.

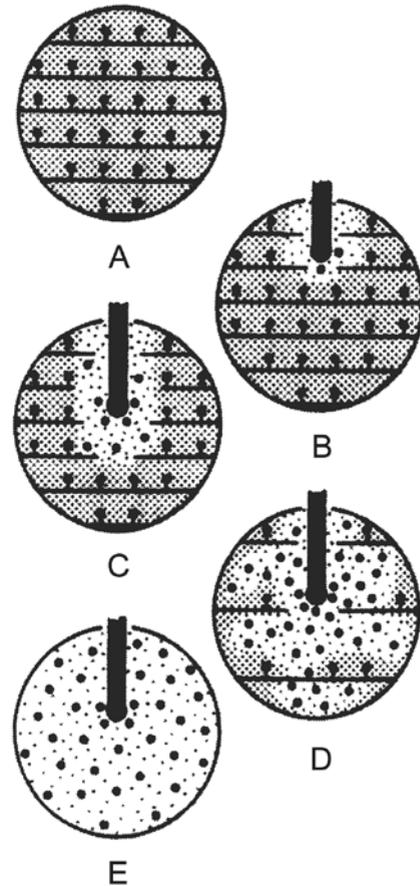
3.3. Активность K^+ внутри клетки, измеренная при помощи K^+ -селективного микроэлектрода

Если калий внутри клетки так же свободен, как и в разбавленном растворе KCl (согласно мембранной теории), то при введении калий-селективного микроэлектрода мы должны обнаружить почти одну и ту же активность этого катиона во всех клетках и во всех растворах с физиологической ионной силой.

Однако эксперименты не подтверждают этого унылого предсказания мембранной теории. В период с 1972 по 1981 год были исследованы самые разные типы клеток, и активность в них K^+ колебалась в значительных пределах ($a_K = \gamma_K [K^+]_{in}$, где a_K — активность клеточного K^+ , γ_K — его коэффициент активности, а $[K^+]_{in}$ — его внутриклеточная концентрация), что выражалось в существенных колебаниях соответствующих коэффициентов активности (γ_K) между величинами значительно меньше единицы (в кишечных клетках *Amphitua*, например, 0,27) и превышающими ее (в кишечных клетках лягушки-быка — 1,20) (сводку данных, опубликованных до 1981 года см. [15, Table 8.2]).

Это разнообразие коэффициентов активности K^+ явно противоречит главному принципу мембранной теории — принципу свободного состояния K^+ : согласно этому принципу, как я уже сказал, данный коэффициент должен быть *одинаков* во всех клетках с одинаковой внутриклеточной концентрацией K^+ . Однако эти колебания нетрудно объяснить, если исходить из очевидных фактов и опираться на логику ТФЗЛ и теории АИ: 1) электрод может «ощущать» активность K^+ лишь в том микроскопически тонком слое жидкости, который непосредственно прилегает к поверхности электрода; 2) связанный клеточными структурами K^+ недоступен электроду и не может с ним взаимодействовать; 3) вода в клетках в состоянии покоя *связана и структурирована* и это снижает растворимость в ней K^+ (см. раздел 11.3, п. 5); 4) растворимость K^+ в *десорбированной* и потому деструктурированной воде такая же, как в обычной (объемной) воде (то есть — выше), или близка к ней, в зависимости от доли воды, оставшейся в связанном состоянии; 5) введение микроэлектрода может сопровождаться от опыта к опыту разной степенью повреждения протоплазмы [129, р. 1220—1222], а это означает, что десорбция K^+ может быть незначительной, значительной или не происходить вовсе; масштабы разрушения структурированной воды при повреждении

Рис. 11. Схема, поясняющая разницей в результатах измерения активности K^+ (a_K) во внутриклеточной среде с помощью K^+ -селективных микроэлектродов, показанных черными вертикальными полосками с закругленным нижним концом. В результате применения этого инвазивного метода может иметь место локальное повреждение нативной структуры цитоплазмы, масштабы которого могут меняться в зависимости от условий конкретного эксперимента, размера электрода и чувствительности клетки к повреждающему воздействию; при определенных условиях могут быть запущены механизмы распространяющегося повреждения. Черные точки, соединенные с горизонтальными линиями обозначают K^+ , адсорбированный белками. Мелкая сетчатая штриховка обозначает структурированную воду. Хаотично разбросанные крупные и мелкие точки обозначают соответственно свободные ионы K^+ и свободные молекулы воды, освобожденные от связи с белками в результате повреждения. А. Цитоплазма в состоянии покоя со связанной водой и адсорбированным K^+ . Активность K^+ низкая. В. Цитоплазма с минимальным повреждением в области введения микроэлектрода. Умеренное высвобождение K^+ и образование небольшого количества свободной воды в зоне, непосредственно прилегающей к поверхности электрода. Величина a_K выше, чем в интактной клетке, но ниже максимально возможной активности, если бы весь K^+ клетки был десорбирован и его концентрация достигла величины C_K , то есть имеет место соотношение $a_K < C_K$ вместо $a_K \ll C_K$. С. Умеренное повреждение цитоплазмы вокруг электрода. Произошло освобождение K^+ и воды в значительной по объему области вокруг микроэлектрода при сохранении неповрежденных участков цитоплазмы на удалении от него; в этих условиях у поверхности электрода уже соблюдается равенство $a_K \ll C_K$. D. Повреждение цитоплазмы развивается в еще большем объеме вокруг электрода. K^+ и вода освобождаются в значительной по размеру области вокруг электрода, при сохранении в удаленных пограничных областях структурированной воды и интактного белкового матрикса; часть K^+ , спонтанно десорбирующегося в интактной зоне, граничащей с зоной повреждения, вытесняется структурированной водой (со сниженной растворяющей способностью) из интактной области в приэлектродную (вклад этого явления возрастает, по сравнению с ситуацией С, из-за резкого увеличения поверхности поврежденной области с ростом ее объема: пропорционально кубу радиуса). В результате притока некоторого количества K^+ из интактной зоны в поврежденную его концентрация в приэлектродной области может превысить обычный физиологический уровень. Это превышение регистрируется электродом как $a_K > C_K$. E. Заключительная фаза повреждения. Вся внутриклеточная вода и K^+ свободны. Оставшиеся небольшие объемы неповрежденной цитоплазмы уже не способны повлиять на концентрацию K^+ в обширной поврежденной области вокруг электрода, поэтому K^+ -селективный электрод регистрирует, что $a_K \ll C_K$. (По Лингу [15]).



микроэлектродом также могут существенно различаться от клетки к клетке, от эксперимента к эксперименту.

На рис. 11 показано, как можно объяснить широкий разброс активности K^+ , полученный в экспериментах на различных объектах, с позиций ТФЗЛ и теории АИ; интерпретация строится на сочетаниях пяти факторов, упомянутых выше.

Другая группа доказательств связанного состояния K^+ в мышечных волокнах лягушки, основана на результатах ЯМР-исследований Na^+ , стехиометрически замещающего K^+ , см. разделе 15.1, п. 3.

Предъявив доказательства связанного состояния клеточного K^+ , я перейду к описанию того, как и где происходит это связывание.

4. Клеточный K^+ адсорбируется β - и γ -карбоксильными группами со стехиометрией одна группа — один ион

Согласно ТФЗЛ, большинство внутриклеточных ионов K^+ находится в связанном состоянии в результате их адсорбции на β - и γ -карбоксильных группах клеточных белков; адсорбция является результатом прямого (а не опосредованного) взаимодействия K^+ с фиксированным анионом со стехиометрией «один ион — одна группа». Это положение было проверено нами двумя способами.

4.1. Адсорбция K^+ отвечает требованиям модели Ленгмюра

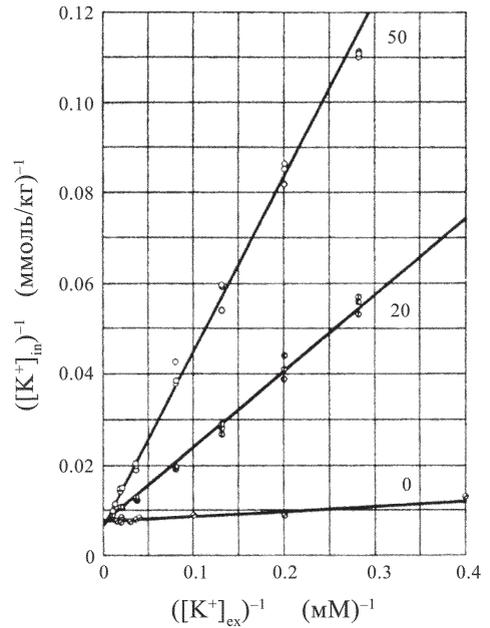
Линг и Оксенфельд измерили равновесные концентрации радиоактивно меченного K^+ в мышцах лягушки ($[K^+]_{in}$), инкубированных в растворах, содержавших меченый K^+ в различных концентрациях ($[K^+]_{ex}$) и конкурирующий с ним щелочной ион — допустим, немеченый K^+ — в фиксированной концентрации. Затем мы построили графики зависимости обратной величины $[K^+]_{in}$ от обратной величины $[K^+]_{ex}$. В результате были получены соответствующие линейные зависимости, наклон которых определяется концентрацией конкурирующего немеченого K^+ так, что все они пересекают ось ординат в одной точке (рис. 12).

Такой ход прямых в координатах рис. 12 хорошо знаком читателю по графикам *конкурентного ингибирования* в ферментативной кинетике [446, р. 171—181]. Но здесь мы имеем дело не с *кинетическим* явлением, как в случае с активностью ферментов (или с ионной проницаемостью, раздел 13.2), а с *равновесной* адсорбцией ионов. Однако и уравнение ферментативной кинетики Михаэлиса—Ментен, и наше собственное уравнение распределения веществ между клеткой и средой (уравнение А11 в приложении) содержат изотерму адсорбции Ленгмюра [117], подразумевающую взаимодействие типа «один субстрат (в нашем случае — один ион) — один ферментативный центр (в нашем случае — один адсорбционный центр)», то есть такие взаимодействия, которые удобно анализировать именно в координатах рис. 12.

При этом Линг и Оксенфельд подчеркивали, что схождение прямых в одной точке (рис. 12) само по себе еще не доказывает

адсорбцию «один-на-один» и прямое взаимодействие между адсорбируемым ионом и фиксированным зарядом. Например, подобный график, хоть и не столь строгий, может быть получен и в случае доннановского равновесия [116, р. 822]. Чтобы окончательно развеять сомнения, что в нашем случае происходит адсорбция «один-на-один» с прямым, «лоб в лоб», взаимодействием иона со связывающим центром, нам надо было показать, что одновалентные катионы *разных размеров* — допустим, немеченый крупный ион цезия (Cs^+) и немеченый *небольшой* ион K^+ — по-разному влияют на равновесное распределение изучаемого меченого иона (к примеру, Cs^+).

Рис. 12. Зависимость содержания меченого K^+ ($[\text{K}^+]_{\text{in}}$) в клетке от концентрации метки в среде ($[\text{K}^+]_{\text{ex}}$) в равновесных условиях (показаны обратные величины этих параметров) в присутствии 0, 20 и 50 мМ немеченого K^+ (и меченый, и немеченый K^+ использовали в форме ацетата) при 24 °С. Мышцы нагружали меткой в течение 26 часов. Величина, обратная равновесной внутриклеточной концентрации меченого K^+ , обозначена $([\text{K}^+]_{\text{in}})^{-1}$ и исчисляется в обратных единицах миллимоль иона на 1 кг сырого веса мышц: $(\text{ммоль/кг})^{-1}$. Величина, обратная концентрации меченого K^+ в среде, обозначена $([\text{K}^+]_{\text{ex}})^{-1}$ и исчисляется в обратных единицах миллимоль/л: мм^{-1} . Каждая точка соответствует данным исследования одной портяжной мышцы лягушки. Экспериментальные данные аппроксимированы линейными функциями, рассчитанными методом наименьших квадратов. Общее содержание K^+ -адсорбирующих центров в мышце, рассчитанное по экспериментальным данным, варьирует от 137 до 154 ммоль/кг сырого веса мышц. Вычисленная таким образом средняя константа адсорбции K^+ равна 665 $(\text{моль/л})^{-1}$. Подробности в тексте. (По Лингу и Оксенфельд [116]).



Ведь если эти ионы, вопреки ТФЗЛ, не адсорбируются по принципу «один-на-один» и не взаимодействуют с фиксированным зарядом напрямую, а действуют издалека, представляя собой, таким образом, лишь диссоциировавшие противоионы, то немеченые K^+ и Cs^+ будут влиять на них одинаково: ведь все они, при таком подходе, представляют собой просто кулоновские заряды одного знака, разнесенные в пространстве. С другой стороны, если адсорбция реализуется через прямое, непосредственное взаимодействие, то различие в размерах гидратированных немеченых K^+ и Cs^+ окажется существенным фактором, по-разному влияющим на связывание метки (в данном случае меченого Cs^+) с адсорбентом. Иными словами, конкурентное влияние немеченых K^+ и Cs^+ на связывание меченого Cs^+ будет в таком случае разным.

В самом деле, как показано на рис. 12 и 13, немеченый K^+ подавляет накопление меченого K^+ и Cs^+ в мышцах лягушки неодинаково. Одно это уже доказывает, что данные ионы адсорбируются «одина-на-один», непосредственно взаимодействуя с центром связывания, что согласуется, вспомним, с теорией усиления взаимодействия противоионов, если один из них является фиксированным, как это имеет место с анионными группами изолированных белков, взаимодействующих с рассматриваемыми катионами (см. раздел 10.1, п. 1). Эти и другие данные (см. далее рис. 15 и 58, а также работы Ментен [378]) доказывают, что Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ и Tl^+ — все связываются с одни-

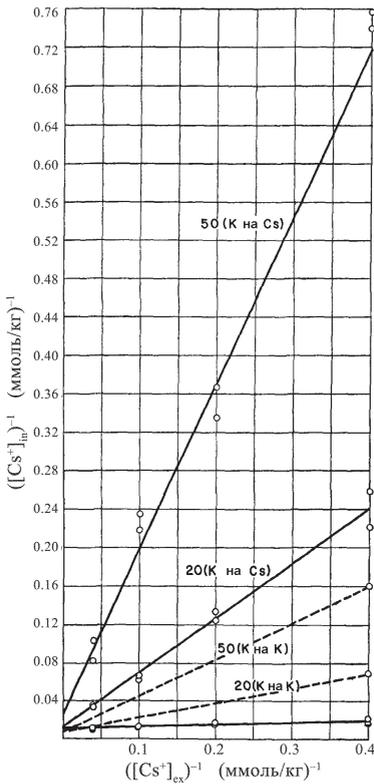


Рис. 13. Зависимость содержания меченого Cs^+ в клетке ($[Cs^+]_{in}$ в ммоль/кг сырого веса мышц) от концентрации меченого Cs^+ в среде ($[Cs^+]_{ex}$) в присутствии 0 (самая нижняя прямая), 20 и 50 мМ (сплошные линии) немеченого K^+ (использовали ацетаты) при 24 °C (на осях указаны обратные величины концентраций). Мышцы нагружали меткой в течение 45 часов. Каждая точка соответствует данным исследования одной портяжной мышцы лягушки. Экспериментальные данные аппроксимированы линейными функциями, параметры которых получены методом наименьших квадратов. Данные, показанные пунктирными линиями, взяты из рис. 12 для сравнения; обозначение «50(К на Cs)» следует читать: распределение меченого Cs^+ в присутствии 50 мМ немеченого K^+ в среде. Сравнение данных показывает, что влияние одной и той же концентрации немеченого K^+ (например, 50 мМ) на адсорбцию меченого K^+ и меченого Cs^+ резко отличается. Вычисленная по данным одной из серий опытов (кажущаяся) константа адсорбции Cs^+ составила 488 (моль/л)⁻¹. Для сравнения см. подпись к рис. 12. (По Лингу и Оксенфельд [116]).

ми и теми же анионными центрами в мышечных волокнах лягушки, что дает зеленый свет экспериментам для всестороннего изучения адсорбции K^+ в клетках с использованием *суррогатных* одновалентных катионов — Tl^+ и Cs^+ , сходных с K^+ по ряду характеристик (см. далее подраздел 5). А теперь мы исследуем природу K^+ -адсорбирующих центров в мышечных волокнах, чтобы удостовериться, в самом ли деле это β - и γ -карбоксильные группы, как гласит наша теория.

Поскольку в п. 1 этого раздела мы показали, что клеточная поверхность (мембрана) не является той исключительной структурой,

которая обеспечивает избирательное накопление в клетке того или иного иона, то больше нет необходимости считать, что и фиксированные анионные центры на этой же поверхности играют какую-либо ключевую роль в этом отношении. Данные рис. 12 и 13 — лишнее тому подтверждение.

4.2. K^+ адсорбируется на β - и γ -карбоксильных группах

Мы решили двумя путями доказать, что именно β - и γ -карбоксильные группы являются теми самыми центрами в саркоплазме мышечных волокон лягушки, которые адсорбируют K^+ , Cs^+ , Tl^+ и Na^+ . Во-первых, мы ввели внутрь мышечного волокна карбодимид, который способен химически модифицировать карбоксильные группы боковых цепей аминокислот [118]. Если мы правы, то с уменьшением числа карбоксильных групп будет снижаться и количество адсорбированных противоионов, например, Na^+ . Этот катион, предварительно меченый, начнет выходить из волокна и на исследовании этого процесса мы остановили свой выбор на этот раз. Во-вторых, мы определили константы диссоциации (pK) центров, адсорбирующих меченый Na^+ внутри волокон, ожидая, что они окажутся такими же, как известные нам pK β - и γ -карбоксильных групп.

Правда, решить эти задачи на интактных волокнах невозможно. Поэтому мы исследовали фрагменты мышечных волокон длиной 2—4 мм с незамкнутыми концами, хотя это и исключало изучение накопления ионов вблизи поверхности сечения, так как цитоплазма в прилегающей к срезу области, как правило, повреждена (рис. 8). Для того, чтобы получить возможность изучать сорбционные процессы в более глубоких, неповрежденных, участках необходимо было увеличить время инкубации сегментов в омывающем растворе. Для этого потребовалось изменить раствор Рингера так, чтобы он достаточно долго поддерживал в жизнеспособном состоянии мышечные волокна до завершения интересующих нас диффузионных процессов (особенно в случае карбодимида). После многих проб и ошибок мы остановились на модифицированном растворе Рингера, основным компонентом которого был полиэтиленгликоль, или ПЭГ 8000 (молекулярная масса 6000—9000) [119].

Предполагалось, что обработка волокна карбоксильным реагентом — карбодимидом — приведет к исчезновению β - и γ -карбоксильных групп, вместе с которыми исчезнут центры связывания K^+ и Na^+ . На деле же карбодимид оказался столь токсичным для мышечных волокон, что пришлось ограничиться временем экспозиции, достаточным для выхода только половины адсорбированного Na^+ [107, р. 63, Table 4.2]. Мы исследовали в этом опыте Na^+ (меченый изотопом ^{22}Na) лишь потому, что это был единственный имевшийся у нас радиоактивный изотоп щелочного металла; ни средств, ни особой нужды в приобретении других изотопов у нас тогда не было. Если бы мы работали вместо него с меченым K^+ , то получили бы принципиально те же результаты. Как было отмечено в разделе 4.1

этой главы, все ионы щелочных металлов, а также P^{1+} , конкурируют за одни и те же центры связывания в мышечных волокнах и, таким образом, взаимозаменяемы в такого рода исследованиях (см. ниже раздел 5).

Возникает вопрос, насколько избирательно действие карбодимида. В самом деле, ведь карбодимид приводит к химической модификации *всех* карбоксильных групп, а не только тех, что интересуют нас. Однако преимущество выбранного нами объекта для исследования состоит в том, что в мышечных волокнах карбоксильные группы представлены главным образом β - и γ -карбоксильными

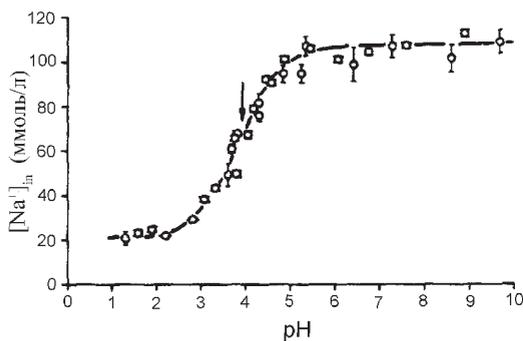


Рис. 14. Поглощение меченого Na^+ двухмиллиметровыми сегментами мышечных волокон (с открытыми, без мембран, концами) при различных pH (0 °C). Концентрация ПЭГ-8000 в инкубационной среде — 16,7%. Каждая точка соответствует среднему значению по данным исследования 4 образцов \pm стандартная ошибка. При pH 7,5 и ниже использовали буферные растворы H_2SO_4 — Na_2SO_4 . При pH выше 7,5 — систему глицин— NaOH . На оси ординат отложена молярная концентрация меченого Na^+ в тканевой воде (вода клеток и межклеточного пространства). Обратите внимание, что при pH ниже 2,3 и выше 7 концентрации Na^+ перестает зависеть от pH потому, что при низких pH ионы H^+ полностью вытесняют Na^+ с адсорбента, а при высоких — все места связывания оказываются занятыми ионами Na^+ . Понятно, что при предельно низких pH внутри мышечных волокон остается только свободный меченый Na^+ . Стрелка указывает на середину титрационной кривой, которая соответствует «усредненной» pK кислотных групп образца. (По Лингу и Оксенфельд [122]).

ми группами сократительных белков [116, р. 841, 842] одного функционального назначения, способными удерживать более 80 мМ адсорбированных мышечными волокнами Na^+ (или K^+) в пересчете на клеточную воду (рис. 14). Поэтому нет сомнений в том, что большую часть карбоксильных групп, модифицируемых карбодимидом, составляют именно β - и γ -карбоксильные группы, участвующие, по нашему представлению, в сорбционных процессах.

Изменяя pH омывающего раствора и определяя то значение pH, при котором адсорбция меченого Na^+ снижалась вдвое по сравнению с максимумом, мы рассчитали pK адсорбирующих анионных центров в мышечных фрагментах. Как показано на рис. 14, кривая титрования имеет правильную S-образную форму, которая свидетельствует об однородности титруемых групп, а легко определяемая точка перегиба соответствует pH 3,85 — что как раз попадает в диапазон pK β - или γ -карбоксильных групп белков (3,65—7,30) [120; 121, р. 112].

Итак, и рК карбоксильных групп, и данные экспериментов по их модификации карбодимидом оказались в полном соответствии с положением ТФЗЛ (и теории АИ): практически все ионы щелочных металлов в мышечных волокнах лягушки адсорбированы на β - и γ -карбоксильных группах внутриклеточных белков.

5. В поперечнополосатых мышечных волокнах большинство β - и γ -карбоксильных групп, адсорбирующих K^+ , принадлежит миозину

В 1952 году я отмечал, что один только белок миозин в поперечнополосатых мышцах лягушки может иметь «достаточно или почти достаточно» β - и γ -карбоксильных групп для адсорбции всего клеточного K^+ [96, р. 774]. По оценкам Линга и Оксенфельд 1966 года, 60% всех β - и γ -карбоксильных групп в мышечных волокнах лягушки принадлежит миозину [116]; по более поздним нашим оценкам — 47% [122]. Поперечнополосатое мышечное волокно, напомню, имеет чередующиеся темные (А-диски) и светлые (I-диски) зоны (рис. 15А). Известно, что миозин сосредоточен исключительно в А-дисках [123] и предсказание ТФЗЛ в таком случае напрашивается само собой: основная часть K^+ (или похожих на него ионов — Cs^+ , Tl^+ , Na^+ , если исследуется их распределение) внутри мышечного волокна должна аккумулироваться именно в А-дисках.

И вновь, как это уже случалось, экспериментальные наблюдения, подтверждающие это предположение, появились раньше самой теории (я имею в виду данные Макаллума [84] и Ментен [378]). Я вернусь к их работам после рассказа о некоторых более поздних данных.

Для проверки предположения, что K^+ сосредоточен в А-дисках поперечнополосатых мышц, Людвиг Эдельман и я, независимо друг от друга, воспользовались вместо короткоживущего изотопа K^+ более стабильными радиоактивными изотопами Cs^+ и Tl^+ (^{134}Cs и ^{204}Tl), которые позволяли получать не только автордиограммы, но и контрастные электронно-микроскопические снимки (клеточные структуры, содержащие эти сравнительно тяжелые элементы лучше рассеивают электронный луч микроскопа).

На рис. 15, на панелях В, С и D воспроизведены автордиограммы лиофилизированных мышечных волокон, в которых большая часть ионов K^+ была до лиофилизации заменена в физиологических условиях на Cs^+ , меченный ^{134}Cs . Обратите внимание, что зерна серебра, образовавшегося благодаря расположенным в соответствующих местах радиоактивным ионам Cs^+ , сосредоточены преимущественно над А-дисками. Это особенно хорошо видно на снимках В и С, где только *часть* мышечного волокна была покрыта фотоэмульсией [124].

В экспериментах Людвиг Эдельмана препараты готовили мгновенным замораживанием, с последующей лиофильной сушкой в сочетании с заливкой специальным материалом; затем изготавливали

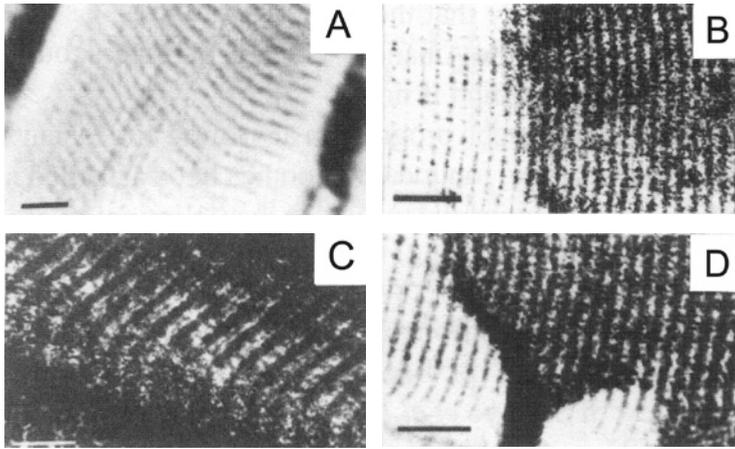


Рис. 15. Авторадиограммы лиофилизированных мышечных волокон. А. Фрагмент мышечного волокна, обработанного так же, как и остальные показанные здесь волокна, но не нагруженного радиоактивным изотопом (контроль). В, С и D — авторадиограммы лиофилизированных мышечных волокон, прижизненно нагруженных радиоизотопом ^{134}Cs непосредственно перед замораживанием. Препараты В и D покрыты фотоэмульсией (темные области) не полностью. Препарат В перед замораживанием был слегка растянут. На снимках В и D можно заметить, что зерна серебра, образующиеся в фотоэмульсионном слое над структурами, содержащими радиоактивные элементы, формируются именно над А-дисками. Если присмотреться, можно обнаружить, что зерна серебра в некоторых проекциях А-дисков на эмульсионный слой образуют две линии, а над центром I-дисков (также местами) заметна тонкая линия зерен серебра — там, где под эмульсией оказываются Z-линии. Длина масштабной метки соответствует 10 мкм. (По Лингу [124]).

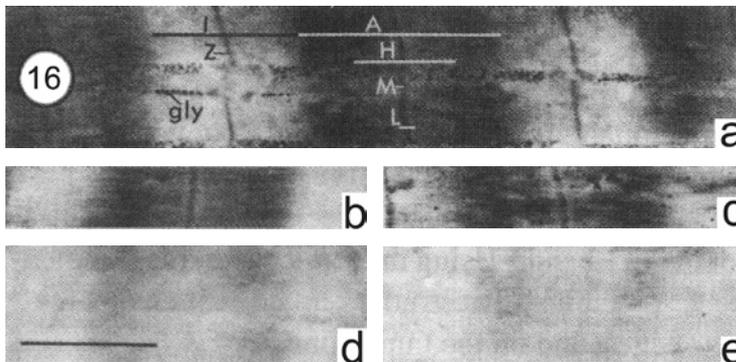


Рис. 16. Электронные микрофотографии тонких срезов лиофилизированных препаратов волокон портянковой мышцы лягушки, не подвергавшихся обычной фиксации солями тяжелых металлов. Перед замораживанием (с последующей лиофилизацией и заливкой) волокна были нагружены Cs^+ (а) и Tl^+ (b, c) в физиологических условиях. Препарат «с» был получен после часовой экспозиции среза волокна в физиологический раствор с ионами Tl^+ при комнатной температуре. (d) — центральная часть препарата (а) после вымачивания в дистиллированной воде в течение 2 дней; (e) — снимок среза, приготовленного из интактного мышечного волокна. А — А-диск; Н — Н-зона; М — М-линия; L — L-зона; I — I-диск; Z — Z-линия; gly — гранулы гликогена. Длина масштабной метки соответствует 1 мкм. (По Эдельману [125]).

срезы для исследования в электронном микроскопе (рис. 16). Здесь лучше видно, что ионы, моделирующие K^+ — Cs^+ и Tl^+ — накапливаются в основном в А-дисках, как это и ожидалось (но не равномерно по диску, а большей частью в широких полосах по краям), но оказалось, что они обнаруживаются еще и в Z-линиях [125].

Со времени этих экспериментов Эдельман продвинулся значительно дальше, подтвердив свои первые наблюдения новыми более совершенными методами. Особенно важно, что та же локализация ионов была подтверждена в *сверхбыстрозамороженных* препаратах, в которых исключались возможные искажения, связанные с образованием микрочастиц льда, а также в препаратах, приготовленных с использованием такого деликатного метода, как замораживание-замещение, обходившегося без стадии лиофилизации, также потенциально опасной в качестве источника артефактов [392].

Неравномерное распределение катионов в клетке было подтверждено также с помощью дисперсионного рентгеновского микроанализа Тромбиташом и Тидьи-Шебешом [431], Эдельманом [432] и фон Зглиници [433] (о несостоятельности критики этих работ со стороны группы Сомлио [434] см. [432] и [107, р. 48]). На основе экспериментальных данных фон Зглиници, исследовавшего тонкие срезы сердечной мышцы, Линг и Оксенфельд пришли к выводу, что от 67 до 80% β - и γ -карбоксылных групп, адсорбирующих K^+ , принадлежит миозину.

Рассмотрев эти более поздние работы мы можем вернуться к вышеупомянутым экспериментам Макаллума и Ментен, поставленным в начале XX века.

Макаллум использовал K^+ -специфичный химический реагент — кобальтонитрит натрия $Na_3[Co(NO_2)_6]$ [84], который образует с K^+ нерастворимые в воде оранжево-желтые кристаллы. Чтобы сделать их более заметными под микроскопом, он обрабатывал препараты сульфидом аммония, после чего микрочастицы кобальтонитрита калия становились черными. Макаллум обнаружил K^+ в виде упомянутой соли в А-дисках, а вот I-диски осадка не содержали. С помощью этого же метода Ментен [378] показала, что преципитат K^+ сосредоточен в основном в А-дисках и распределен в них не равномерно, а больше по широким краям, а также в Z-линиях, совсем как на рис. 16.

Итак, большая и скрупулезная работа Эдельмана [125; 126; 432], одно мое собственное автордиографическое исследование, дисперсионный рентгеновский микроанализ Тромбиташа и Тидьи-Шебеша, фон Зглиници и, в придачу, более ранние работы Макаллума и Ментен — подтверждают предсказание теории, что K^+ в *поперечнополосатых мышечных волокнах сосредоточен преимущественно в А-дисках*. Кроме того, Эдельман, я и все остальные упомянутые ученые подтвердили правоту Макаллума и Ментен, первыми обнаруживших такое распределение K^+ (а не модельных ионов) в поперечнополосатых мышцах.

Ментен так прокомментировала изменения в локализации K^+ в мышечных волокнах насекомых, вызванные сокращением мышцы: «То, что это перераспределение (K^+) тесно связано с активностью мышцы, становится очевидным... там, где по мышце прошла волна сокращения. В нижней части рисунка калий сосредоточен в тусклых дисках; в верхней части, где прошло сокращение, он оказывается вблизи светлых дисков, в остальных местах распределение K^+ представлено различными градациями между указанными выше крайними состояниями» [378, р. 413—414].

Главное в этих словах — то, что данные Ментен согласуются с моделью мышечного сокращения, изложенной впервые в принципиальной форме в рамках теории АИ в 1962 году [98, р. 437—454; 15, Ch. 16; 122]. В этой мо-

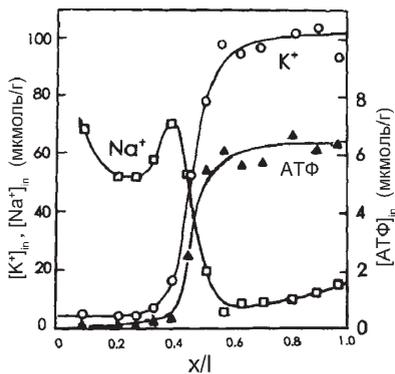


Рис. 17. Распределение K^+ , Na^+ и АТФ вдоль портняжной мышцы лягушки на разном удалении « x » от разреза (в долях от 1, за которую принята длина « l » усеченной мышцы). Данные получены при исследовании препарата БНК (рис. 7) по истечении 50 часов стерильной инкубации при 25 °С. Раствор Рингера, омывающий усеченный конец мышцы, исходно содержал 100 мМ Na^+ , 2,5 мМ K^+ и 1 мМ 2,4-динитрофенола. Содержание K^+ и Na^+ (в мкмольях на грамм сырого веса) определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии, уровень АТФ (в мкмольях на грамм сырого веса) — методом «светлячка» — внутриклеточным введением фермента люциферазы. (По Лингу и Блекману, не опубликовано. Рисунок — новая версия рисунка, опубликованного в 1992 году [107]).

дели центральным событием мышечного сокращения является замещение связанного K^+ фиксированными катионами, образующими солевые связи с β - и γ -карбоксильными группами. Более поздняя версия этой концепции, связывающая образование солевых связей с десорбцией воды (разделы 15.3, п. 2 и 16.6, п. 5.3), предполагает, что ионы K^+ , вытесненные фиксированными катионами, сбрасываются с фиксированных анионов и мгновенно заполняют собою А-диски, запуская стремительную цепную реакцию десорбции воды в соседних I-дисках. В результате, между этими дисками возникает значительный осмотический градиент — источник энергии мышечного сокращения.

Идея Ментен получила экспериментальное подтверждение. Во-первых, демонстрацией обратимого высвобождения K^+ при каждом цикле сокращения сердечной мышцы черепахи (Уайльд и О'Брайен [390; 142, р. 157]) и при контрактуре перфузируемой икроножной мышцы собаки (Вуд и сотр. [412]), и этот выход K^+ происходит, несмотря на отсутствие каких-либо изменений проницаемости мембраны к меченому K^+ во время таких сокращений (Нунан и сотр. [458]). Во-вторых, демонстрацией под электронным микроскопом обратимого перераспределения модельного по отношению к K^+ иона, а именно Tl^+ , при тетаническом сокращении мышечных волокон лягушки (Эдельман [327]).

6. Взаимосвязь между количеством адсорбированного K^+ и АТФ

На рис. 17 представлены полученные Лингом и Блекманом при помощи препарата БНК (рис. 7) [107, р. 198; 128] данные о распределении K^+ , Na^+ и АТФ вдоль усеченной портняжной мышцы

по истечении 50 часов стерильной инкубации при 25 °С. Обратите внимание, что механическое повреждение волокна и воздействие на него токсичного агента (2,4-динитрофенола) вызвали изменение концентраций K^+ , Na^+ и АТФ, охватившее к этому времени половину длины волокна.

Данные, показанные на рис. 8 и 17, получили подтверждение в работе Эдельмана, посвященной электронно-микроскопическим исследованиям усеченных портняжных мышц лягушки (рис. 18). Буквами (с) и (d) обозначены электронно-микроскопические снимки срезов, которые по удаленности от усеченного конца и сроку экспо-

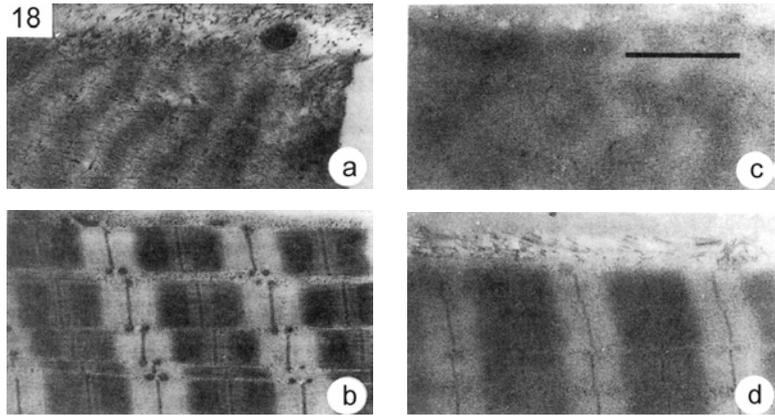


Рис. 18. Электронные микрофотографии срезов (0,2 мкм) мышечного волокна лягушки, располагавшихся вблизи (а, с) и на некотором удалении (b, d) от места усечения мышцы (препарат БНК); а — препарат, «окрашенный» солями урана и свинца по обычной методике (раневая поверхность видна у верхнего края фотографии); b — участок, удаленный от разреза на 0,4 мм и приготовленный так же, как и препарат а; с и d — препараты, приготовленные методом «адсорбционного окрашивания» Эдельмана из тех же участков волокна, что и препараты а и b соответственно. Суть метода заключается в «фиксации» фрагментов мышечного волокна раствором, содержащим 100 мМ LiCl и 10 мМ CsCl. Обратите внимание на плохое (диффузное) связывание ионов тяжелых металлов с клеточными структурами (препарат а) вплоть до полного отсутствия связывания, что видно в верхней части этого препарата. Столь же диффузно связывается с клеточными структурами и Cs^+ (препарат с). В то же время неповрежденные участки волокна (удаленные от среза) сохраняют свою структуру после фиксации и хорошо связывают Cs^+ и тяжелые металлы, которые распределяются внутри волокна неравномерно, сосредоточиваясь в основном в А-дисках (препараты b и d). (По Эдельману [129]).

зиции усеченной мышцы в соответствующем растворе аналогичны соответственно препаратам (а) и (b). Однако препараты (с) и (d), в отличие от (а) и (b), не фиксировали перед заливкой (и последующим изготовлением срезов) солями тяжелых металлов для придания структуре препаратов большей контрастности. Вместо этого их *сразу после* удаления замерзшей воды замещением, заливки и получения

ультратонких срезов (0,2 мкм толщиной) обрабатывали электроноплотным Cs^+ при помощи изобретенного Эдельманом оригинального метода, названного им «адсорбционным окрашиванием» [282].

Как видите, образец, взятый на расстоянии 0,4 мм от разреза мышцы, при «адсорбционном окрашивании» Эдельмана (d) выглядит примерно так же, как и при обычном контрастирующем окрашивании соединениями урана и свинца (b). На обоих снимках хорошо видно, что периферические участки А-дисков и Z-линия особенно хорошо аккумулируют тяжелые металлы и Cs^+ , что напоминает рис. 15 (a) и 15 (b). А вот образцы, взятые вблизи разреза (из поврежденной области), диффузно «окрашиваются» тяжелыми металлами (18, a), и Cs^+ (18, c) и связывают эти катионы в меньших количествах. Если учесть разницу в длительности инкубации, то состояние мышцы на расстоянии 0,4 мм от разреза на рис. 18, b, d примерно соответствует состоянию мышцы на расстоянии 0,6 условных единиц от разреза на рис. 17 или еще дальше. То есть можно с уверенностью констатировать, что в структуре волокна на таких удалениях от среза признаки повреждения отсутствуют.

Из сопоставления данных, представленных на рис. 17 и 18, можно сделать следующие выводы: во-первых, в области повреждения способность А-дисков и Z-линий адсорбировать K^+ или Cs^+ снижена либо полностью утрачена; во-вторых, при повреждении ослабляется или полностью утрачивается способность цитоплазмы вытеснять Na^+ ; в-третьих, в области повреждения уровень АТФ снижается до нуля или почти до нуля.

Первые два вывода согласуются с идеей, впервые высказанной в 1952 году в ТФЗЛ, что уровень АТФ (а не скорость ее гидролиза) стехиометрически связан с количеством K^+ , адсорбированного на β - и γ -карбокисильных группах, которые в мышцах принадлежат преимущественно миозину [96]. А высокая константа связывания АТФ с миозином (о чем будет сказано в разделе 14.3, п. 4) не оставляет никаких сомнений, что вся АТФ в покоящейся клетке (в пределах экспериментальной погрешности) находится в связанном состоянии.

Гулати с сотр. [130] провели более глубокое исследование стехиометрической связи между уровнем АТФ и K^+ в мышце лягушки, и его результаты показаны на рис. 19. Обработка десятию различными токсинами, независимо от механизма их токсического действия, позволила обнаружить примерно одно и то же количественное соотношение: *на каждую связанную молекулу АТФ приходилось около 20 адсорбированных ионов K^+* . В том, как одной молекуле АТФ удастся инициировать связывание такого большого количества ионов K^+ мы попробуем разобраться в разделе 14.3.

7. Итоги раздела 10.2

1) Структурой, обеспечивающей избирательное накопление K^+ в присутствии Na^+ , является вовсе не клеточная мембрана и ее гипотетические насосы, а протоплазма в целом;

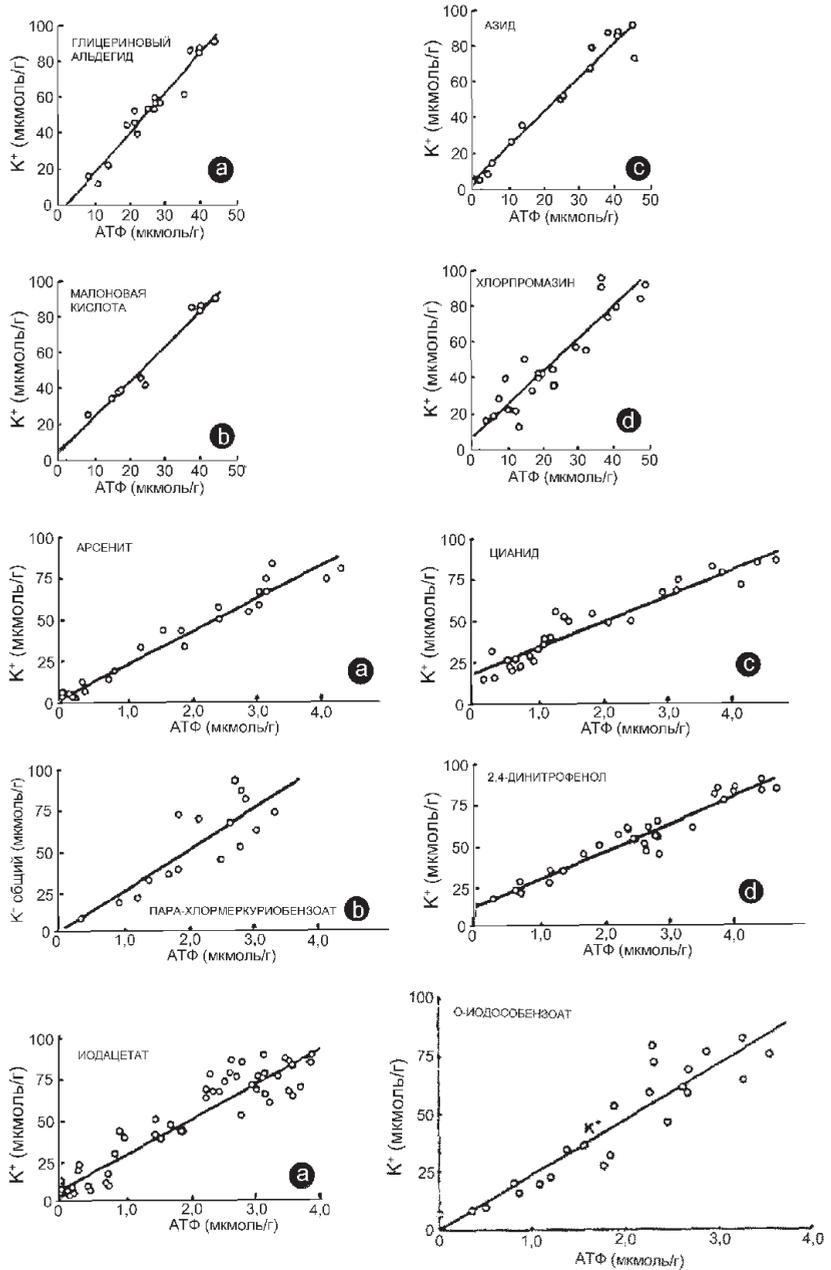


Рис. 19. Корреляционная связь между равновесными концентрациями K^+ и АТФ в мышцах лягушки, подвергнутых действию разных токсинов (инкубация при 25 °С). Инкубационный раствор с мышцами, помещенный в колбу Эрленмейера, постоянно перемешивали с помощью шейкера с частотой 150 колебаний в мин. Продолжительность действия токсинов варьировали, чтобы получить разный уровень АТФ. (По Гулати и сотр. [130]).

2) Избирательной адсорбции ионов щелочных металлов β - и γ -карбоксильными группами так называемых «нативных» глобулярных белков *in vitro* препятствует образование в таких белках солевых связей между фиксированными анионами и фиксированными катионами;

3) Особенности электропроводности клеток в покое, низкая мобильность внутриклеточного K^+ , данные рентгеновского микроанализа, а также коэффициенты активности K^+ , измеряемые K^+ -селективными микроэлектродами — все указывает на *связанное* состояние клеточного K^+ ;

4) Исследования конкурентных отношений между одновалентными катионами щелочных металлов, обладающих различными характеристиками ближнего взаимодействия, доказали, что *связывание* обеспечивается прямым взаимодействием «один ион — один адсорбционный центр»;

5) Обработка карбодиимидом, приводящая к исчезновению β - и γ -карбоксильных групп, а также титрование центров адсорбции доказывает, что внутриклеточный K^+ связывается β - и γ -карбоксильными группами остатков дикарбоновых аминокислот, как это и следует из ТФЗЛ (и теории АИ);

6) Авторадиография, просвечивающая электронная микроскопия (на различных препаратах, включая тонкие *лиофилизированные* срезы мышечных волокон), дисперсионный рентгеновский микроанализ, как и более ранние методы внутриклеточного осаждения калия — все они свидетельствуют, что K^+ в поперечнополосатых мышечных волокнах адсорбирован именно на β - и γ -карбоксильных группах, принадлежащих соответственно остаткам аспарагиновой и глутаминовой кислот белка миозина, особенно в той части его молекулы, которая расположена между Н-зоной и краем А-диска. Клеточный K^+ адсорбируется также белками Z-линии, хотя и в меньшем количестве, но зато с высокой плотностью;

7) Изменение уровня K^+ вдоль волокна портняжной мышцы лягушки, начиная с усеченного конца, сопряжено с соответствующим изменением уровня АТФ. Равновесные концентрации K^+ в мышечных волокнах, которые подверглись действию 10 разных токсинов с разной степенью ингибирования метаболизма, также коррелируют с уровнем АТФ в этих мышцах: чем меньше в клетке АТФ, тем ниже в ней содержание K^+ . Это полностью подтверждает постулат ТФЗЛ (и теории АИ), что именно присутствие адсорбированной на белках АТФ определяет количество K^+ , избирательно адсорбируемого β - и γ -карбоксильными группами миозина и других внутриклеточных белков.

Как я уже говорил, ТФЗЛ — это тот центр кристаллизации, из которого выросла теория ассоциации-индукции, основные положения которой будут подробно рассмотрены в главах 14 и 15. А сейчас я хотел бы рассказать еще об одной вспомогательной теории — *теории многослойной организации поляризованной воды в клетке*, которая была включена в состав теории АИ через три года после выхода в свет ее первой версии.

ТЕОРИЯ МНОГОСЛОЙНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОЛЯРИЗОВАННОЙ ВОДЫ В КЛЕТКЕ

11.1. История вопроса

11.2. Теория многослойной организации поляризованной воды в клетке и ее мировое признание

11.3. Следствия теории МОПВ для теории и практики и их подтверждение

11.1. История вопроса

Прежде чем начать рассказ о теории многослойной организации поляризованной воды (МОПВ), давайте окинем взглядом те гипотезы об упорядочивании воды вокруг белковых и других макромолекул, которые появились раньше (подробная история вопроса в [155]).

Бертил Якобсон кратко в 1953, и более развернуто в 1955 году, предложил свою «гипотезу структуры воды», пытаясь объяснить диэлектрическое поведение водных растворов макромолекул. Он писал: «Если на поверхности макромолекулы имеется много атомов кислорода и азота, причем их расположение идеально соответствует пространственной решетке воды, это производит сильный эффект упорядочивания и создает почти идеальную структуру, где каждая молекула воды соединена с четырьмя другими» [334, р. 2923; 384]. Образующиеся при этом гидратные оболочки Якобсон назвал «льдоподобными», чтобы акцентировать внимание на особенностях этой структуры, в отличие от структуры обычной воды, в которой имеются отдельные ассоциаты, каждая молекула в которых также может быть связана водородными связями с четырьмя другими [385; 386], но доля таких ассоциатов в общем объеме невелика, а сами ассоциаты непрочны.

Двумя годами позже лауреат Нобелевской премии Альберт Сент-Дьёрдьи развил идею воды, подобной льду. Согласно «теории айсберга» Сент-Дьёрдьи, молекулы белков в клетках окружены *кристаллами льда* [387, р. 32—37]. Кроме того, идею льдоподобной воды вокруг белков также поддерживал Клотц [388]. Однако против всех теорий айсберга есть серьезное возражение.

Чамберс и Хейл, изучавшие замораживание переохлажденных мышц лягушки [389], обнаружили (а Миллер и Линг подтвердили [297; 107, р. 103]), что в точках контакта кристаллов обычного льда с цитоплазмой *переохлажденного* мышечного волокна лягушки мгновенно образуются кристаллы льда. От них к концам мышечного волокна быстро вырастают длинные ледяные неветвящиеся лучи, прямые или искривленные в зависимости от того, вытянуто волокно или искривлено. Этот пример показывает, что если бы в живой клетке постоянно существовали кристаллы льда, как утверждает теория айсберга, то ее переохлаждение сопровождалось бы спонтанным

образованием льда вокруг этих кристаллов, как центров кристаллизации, и быстрым оледенением всей клетки, чего в реальности не наблюдается.

Тем не менее, и Якобсону, и Альберту Сент-Дьёрдьи — пусть их предположения и не оправдались — надо отдать должное за прекрасную аргументацию и интересные эксперименты, которые вновь привлекли внимание к столь важной проблеме, почти уже канувшей в лету после опытов Хилла с мочевиной (см. главу 7).

11.2. Теория многослойной организации поляризованной воды в клетке и ее мировое признание

Теория многослойной организации поляризованной воды (МОПВ) в клетке, неотъемлемая часть теории ассоциации-индукции (АИ) [154; 15, р. 271—310; 107, р. 69—110], была опубликована спустя три года после выхода в свет собственно теории АИ [98]. Однако я решил сначала рассказать о теории МОПВ, а потом уже — о собственно теории АИ, так как теория МОПВ, как и ТФЗЛ, касается *статических* свойств живых клеток. *Динамические* же, или *индуктивные* их свойства, которые всегда являются производными свойств статических, будут представлены позже при рассмотрении теории АИ.

Согласно теории МОПВ, вся или почти вся вода покоящейся клетки имеет отличную от обычной воды структуру динамического характера, возникающую главным образом благодаря взаимодействию воды с сетью «полноразвернутых» белковых цепей, присутщей во всем клеткам.

Под *полноразвернутым* состоянием молекулы белка я понимаю такое ее состояние, при котором ни одна NH- или CO-группа полипептидной цепи не участвует в образовании иных водородных связей, кроме как с водой. Не следует путать полноразвернутую конформацию с «развернутой», как иногда называют β-складчатую конформацию белка [485, р. 501]. При некоторых допущениях полноразвернутую конформацию можно отождествить с так называемым «случайным клубком» и с тем, что Бунгенберг-де-Йонг называл *линейной* конформацией (раздел 6.2, п. 1). Однако, по теории МОПВ, полноразвернутые белки и вода, которую они вокруг себя организуют, распределены в клетке отнюдь не беспорядочно (раздел 15.1, п. 1).

Пептидный остов (цепь пептидных связей) белковых молекул представляет собой не что иное, как геометрически правильное чередование электрических диполей: отрицательно заряженных CO-групп (обозначаемых как N-центры, «отрицательные центры») и положительно заряженных NH-групп (обозначаемых как P-центры, «положительные центры»), каждая из которых доступна клеточной воде, если белковая цепь полностью развернута, то есть не содержит элементов вторичной структуры. Одномерную (линейную) систему центров обозначим NP-системой. Двухмерную систему (поверхность) N- и P-центров, расположенных в шахматном порядке, обозначим как NP–NP-систему. Трехмерную сеть (или матрикс) подобных

полноразвернутых белковых цепей можно назвать системой NP—NP—NP-типа, или NP—NP—NP-системой. Системой NO—NO—NO или PO—PO—PO-системой назовем трехмерную систему отрицательных (N) или положительных (P) зарядов, правильно чередующихся с незаряженными (нейтральными) функциональными группами — O [155].

Наличие нейтральной группы между двумя ближайшими N- или P-центрами оказывает сильное влияние на свойства матрикса потому, что от этих «вставок» зависит расстояние между соседними N- или P-центрами.

Структура молекулы воды такова, что ее атомы располагаются в вершинах треугольника с атомом кислорода в вершине тупого угла. Каждая из связей кислорода с водородом представляет собой диполь с положительным (водород) и отрицательным (кислород) полюсами. Поскольку положительно заряженные полюса находятся относительно атома кислорода асимметрично, молекула воды имеет *дипольный момент*, равный в вакууме 1,85 дебая. Однако важно помнить, что эта величина не остается постоянной, она изменяется в зависимости от природы межмолекулярных контактов. Так, дипольный момент воды в жидком состоянии выше (2,9 дебая), чем в газообразном потому, что в присутствии других диполей или зарядов степень поляризации данного диполя обычно возрастает, он поляризуется.

Все N- и P-центры полипептидного остова, расположенные вдоль него в геометрически правильном порядке, доступны воде, если белковая молекула полностью развернута. Взаимодействие этих центров с водой поляризует ее, делая водородные связи с другими молекулами более прочными, а NP-матрица определяет структуру первого слоя связанной воды таким образом, что дипольные моменты соседних молекул направлены в противоположные стороны (рис. 20). Этот первый слой, представляющий в свою очередь упорядоченную матрицу из полюсов диполей, адсорбирует следующий слой воды, дипольный момент которых при этом также возрастает. Формирование многослойной структуры будет продолжаться до образования мощной *динамической структуры* поляризованных и ориентированных в пространстве молекул воды, «скрепленных друг с другом» более прочными водородными связями, чем в объемной воде. Структура, показанная на рис. 20, — лишь стоп-кадр непрерывных изменений, способный создать ложное впечатление, что слои поляризованной воды предельно упорядочены и устойчивы.

Необходимо лишь раз обратить внимание на понятие «поляризованная вода». Что оно означает в этой книге? Поскольку молекула воды обладает дипольным моментом, то она уже поляризована. Однако принципиальным положением теории МОПВ является следующее: при взаимодействии с другими диполями или зарядами асимметрия зарядов в молекуле воды *усиливается*, ее дипольный момент *возрастает*. Именно эта *дополнительная* поляризация объясняет все свойства связанной воды в клетке и в модельных систе-

мах, отличающие ее от свойств объемной воды. Главным фактором, усиливающим дипольный момент воды, является полипептидный остов белков, и чем большая его часть доступна воде, тем больше воды будет модифицировано, будь то в клетке или в модельной системе. В полной мере это относится к любым другим макромолекулам, способным усиливать дипольный момент молекул воды и служить, как белки, матрицей для упорядоченной их адсорбции. Для простоты словоупотребления под «поляризованной водой» мы будем понимать воду с увеличенным дипольным моментом (наведенная поляриза-

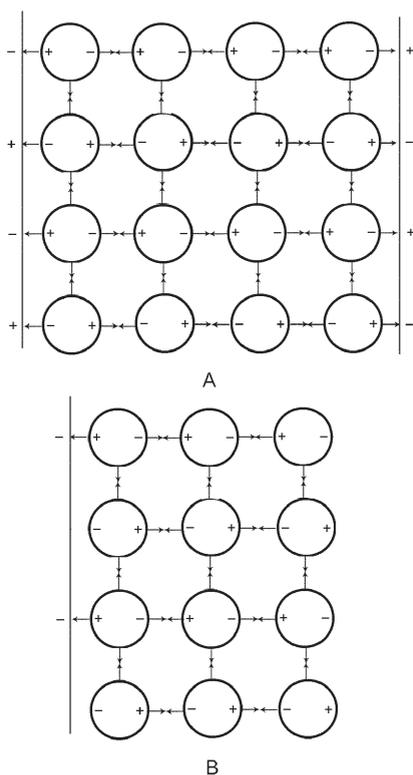


Рис. 20. Возникновение многослойной структуры поляризованной воды (кружки) под влиянием линейного матрикса из цепей полимера с чередующимися положительно и отрицательно заряженными фиксированными центрами (NP-система). Водные структуры, образовавшиеся на параллельно расположенных поверхностях (NP–NP-поверхность, не показана; ее плоскость перпендикулярна плоскости страницы) с чередующимися в шахматном порядке положительно и отрицательно заряженными фиксированными центрами (панель А) могут объединяться с образованием более толстых слоев поляризованной воды. На панели В показано, что многослойные структуры из поляризованной воды могут образовываться и на линейном матриксе, имеющем пробелы между заряженными группами (NO-система). В данном случае, на месте, где должен находиться положительный заряд, нет значимой для рассматриваемого процесса группы (NO–NO-поверхность не показана; ее плоскость перпендикулярна плоскости страницы). Совокупность плоских матриц образует трехмерную матрицу, заполненную ориентированными молекулами воды, организованными в многослойные структуры. Начало формированию такой структуры кладут взаимодействия фиксированных зарядов/диполей белка или другой макромолекулы с диполями воды, а сама водная сеть стабилизируется латеральными (внутрислойными) и радиальными (межслойными) водородными связями между самими молекулами воды. Первый слой адсорбированной воды, является матрицей для образования второго слоя и т. д. Поляризация молекул воды белком, передающаяся от слоя к слою, приводит к упрочению водородных связей и, соответственно, к увеличению устойчивости многослойной структуры связанной воды в целом (электростатические взаимодействия показаны стрелками). По этому принципу выстраивается кооперативная структура связанной воды. (По Лингу [155]).

ция), несколько превышающим дипольный момент молекул объемной воды.

В клетке (например, в мышечном волокне лягушки) толщина слоя поляризованной воды между соседними полноразвернутыми цепями белков составляет в среднем шесть молекул. Казалось бы, немного, однако на самом деле этого хватает, чтобы связать всю воду внут-

ри мышечного волокна, превратив ее в многослойную *динамичную структуру* [156, р. 201]. А что значит «динамичная структура», спросите вы?

Тадж Махал не может сдвинуться со своего места — это пример статической структуры. Журавлиный клин — совсем другая структура: каждый ее элемент беспрестанно перемещается относительно некой средней позиции, но вместе они образуют всегда узнаваемую *динамичную* структуру. Точно так же, согласно теории МОПВ, ведет себя и вода в клетке. Испытаем теперь эту теорию в эксперименте.

В такой сложной науке, как физиология клетки, создание и проверка новых теорий значительно упрощается, если уже на ранних этапах исследований имеется хорошая искусственная модель, демонстрирующая явления, предсказываемые теорией. Само существование убедительной искусственной модели, отвечающей требованиям теории, которая при этом, несмотря на свою простоту в сравнении с исследуемым живым прототипом, недвусмысленно воспроизводит то или иное его свойство — свидетельство истинности теории. И наоборот, если упорные поиски искусственной модели не увенчались успехом, это должно наводить на мысль об ошибочности теории — что, собственно, и имеет место, например, в случае с теорией мембранных потенциалов, о чем речь пойдет ниже, в разделе 15.5, п. 1. История теории МОПВ в этом смысле была совершенно иной. Уже с первых шагов был найден целый ряд интересных модельных систем в ее поддержку.

По причинам, которые будут изложены в разделе 11.3, п. 2, желатин, другие белки, денатурированные мочевиной и NaOH, а также линейные полимеры, несущие распределенные закономерным образом атомы кислорода или азота со *свободной парой электронов* [425, р. 131—133] — такие, как полиэтиленоксид (ПЭО), поливинилпирролидон (ПВП), поливинилметилловый эфир (ПВМЭ) и полиэтиленимин (ПЭИ), — все являются полноразвернутыми соединениями. Благодаря этому, любой участок их молекулы доступен воде и легко с ней взаимодействует. Такие полностью открытые для взаимодействия с водой макромолекулы будем называть *экстравертными моделями*.

Молекула полиэтиленоксида (ПЭО) $(-CH_2CH_2O-)_n$ служит наглядным примером важности постулата теории МОПВ о значительном влиянии, которое оказывает расстояние между заряженными центрами полимера (атомами кислорода в данном случае) на характер его взаимодействия с водой. ПЭО, в молекуле которого атомы кислорода разделены двумя метиленовыми группами, хорошо растворим в воде и способен связывать и поляризовать ее на своей поверхности. Однако удаление одной метиленовой группы из повторяющегося звена полимера, либо добавление новых делает полимер нерастворимым в воде [425, р. 132; 481, р. 113]. Это свидетельствует об особой комплементарности ПЭО и воды, о том, что геометрия расположения атомов кислорода в цепи ПЭО играет важную роль в образовании водородных связей с молекулами воды, а между структурой связанной воды и положением атомов кислорода в полимере имеется стерическое соответствие.

Большинство же нативных глобулярных белков, а также белки, денатурированные SDS и п-пропанолом, относятся к *интровертным моделям*, так как NH- и CO-группы их полипептидной цепи включены в α -спиральные или β -складчатые конформации и становятся недоступными воде.

По всему миру проводились исследования замечательных физико-химических свойств воды внутри клеток и клеточных моделей. Немало таких работ выполнено и в моей лаборатории, но, в отличие от остальных исследователей, изучавших либо клетки, либо модели, нас интересовала связь между ними.

У нас есть возможность провести сравнение результатов исследования клеток и модельных систем, полученных разными исследователями, по следующим направлениям (этот список мог бы быть значительно шире, если бы важность этой проблемы была очевидной для большего числа ученых): 1) осмотическая активность: на моделях [160] и клетках [107, р. 101; 296]; 2) набухание и сжатие: на моделях [161] и клетках [98, р. 246—247; 159; 199]; 3) понижение температуры замерзания воды: на моделях [162; 389] и клетках [297; 298; 107, р. 102—103]; 4) поглощение пара при его парциальном давлении, близком к насыщению: на моделях [163] и клетках [159]; 5) время вращательной корреляции ЯМР (τ_r): на моделях [164; 107, р. 93—95] и клетках [299; 300; 301; 302]; 6) время диэлектрической релаксации Дебая (τ_D): на моделях [303] и клетках [165]; 7) коэффициент вращательной диффузии по данным квазиупругого рассеяния нейтронов: на моделях [304] и клетках [166]; 8) растворимость веществ: на моделях [154—156; 168; 170; 172; 175; 306] и клетках [131, Fig. 6; 154; 156; 190; 307; 107, Ch. 8].

После сравнения результатов этих исследований стало очевидно, что вода, связанная экстравертными моделями, обладает теми же свойствами, что и вода в покоящейся клетке, тогда как у воды в интровертных моделях эти свойства отсутствуют или очень слабы — как это и следует из теории МОПВ. К сожалению, детально обсудить каждую из перечисленных характеристик не представляется возможным в рамках этой книги. Однако я постараюсь ответить на два важных вопроса: сколько свободной воды имеется в типичной клетке, — к примеру, в мышечном волокне лягушки, — и какая доля воды в мышечном волокне поляризована и структурирована. Отвечая на эти вопросы, мы фактически подвергнем строгой проверке саму теорию МОПВ, согласно которой вся или почти вся вода внутри клеток, находящихся в состоянии покоя, включена в упорядоченные слои, а свободная вода практически отсутствует.

Ответ на вопрос о количестве свободной воды напрямую вытекает из сопоставления результатов двух простых экспериментов. Линг и Уолтон разработали метод удаления межклеточной жидкости центрифугированием [516]: 4 минуты вращения в герметичном контейнере с ускорением 1000 g приводит к удалению всей свободной воды из межклеточного пространства портняжной мышцы лягушки,

не затрагивая воду внутри мышечных волокон. С помощью этого метода мы попытались выжать всю воду из портяжной мышцы, разрезанной на фрагменты длиной 2 и 4 мм. Оказалось, что количество выделенной таким образом воды равно количеству воды во внеклеточном пространстве [296]. Поскольку сверх этого количества из нарезанной мышцы выжать ничего не удалось (то есть внутриклеточная вода из разрезов не выходила), значит, свободной воды внутри самих мышечных волокон нет. Возможное возражение, что на поверхности разрезов быстро регенерировала мембрана, которая и заперла свободную воду во внутриклеточном пространстве, опровергается другим простым экспериментом, с очевидностью показавшим, что мышечные волокна лягушки не способны регенерировать плазматическую мембрану на усеченном конце (см. раздел 4.1, п. 4). Итак, в мышце мы нашли только одну фракцию свободной воды — воду межклеточного пространства, свободное состояние которой ни у кого не вызывает сомнений.

Прежде же чем ответить на вопрос, какая часть клеточной воды организована в упорядоченные слои, я коротко остановлюсь на истории изучения сорбции газов.

Зависимость количества газа, сорбируемого твердым телом, от парциального давления данного газа часто представляет собой S-образную кривую. Вначале она идет круто вверх, затем следует плато, переходящее во второй крутой подъем [532, р. 364—369]. Прежде этот второй подъем поглощения в области предельных значений парциального давления объясняли *капиллярной конденсацией* [532, р. 444]. Но в 1934 году де Бур и Цвиккер предложили новое объяснение, основанное на их *теории поляризации* [533]. Эта теория предполагает, что первый слой молекул газа адсорбируется на заряженные центры, расположенные в шахматном порядке на поверхности сорбента. При этом адсорбированные молекулы газа становятся электрическими диполями и, в свою очередь, поляризуют следующий слой молекул. Так адсорбируются все новые и новые слои молекул газа, образуя, в конце концов, многослойную структуру на поверхности твердого тела.

В 1952 году Брунауэр, Эмметт и Теллер подвергли теорию де Бура и Цвиккера резкой критике, указывая на то, что в результате электростатической поляризации может быть адсорбирован только один слой молекул, но не более того [534]. Они предложили собственную теорию, известную по первым буквам их фамилий как теория БЭТ. Согласно теории БЭТ, первый слой молекул газа адсорбируется в соответствии с изотермой Ленгмюра. Остальные молекулы наслаиваются на первый вследствие обычной конденсации, поэтому их состояние напоминает состояние жидкого газа.

Однако Брунауэр и его коллеги при этом ясно дали понять, что их критика теории де Бура и Цвиккера касается лишь адсорбции газов, близких по свойствам к благородным, — то есть не обладающих *собственным дипольным моментом*. А механизмы адсорбции газов, чьи молекулы обладают значительным собственным дипольным моментом (именно их исследовал Бредли [278]), под их критику не подпадают (напомню, что молекулы воды тоже обладают собственным дипольным моментом).

В 1965 году, представляя свою теорию МОПВ применительно к клетке, я отметил, что теория БЭТ способна удовлетворительно объяснить лишь

ограниченный круг сорбционных явлений, таких как поглощение воды овечьей шерстью и коллагеном при очень низком парциальном давлении водяного пара [154]. Данные же о поглощении воды различными белками и полипептидами в широком диапазоне парциального давления водяного пара, полученные Меллоном, Корном и Гувером [535], соответствуют изотерме Бредли.

Хотя Брунауэр и его коллеги не нашли аргументов против взглядов Бредли на сорбцию молекул газов с собственным дипольным моментом, они не стали углубляться в эту проблему. Возможность многослойной адсорбции молекул воды, обладающих значительным собственным дипольным моментом, определяется сочетанием двух важных факторов — *поляризацией* и *ориентацией* ее молекул матрицей N- и P-центров. Именно благодаря этой поляризации-ориентации исходный дипольный момент воды может несколько увеличиться. В результате адсорбированные молекулы воды ориентируются таким образом, что способны в свою очередь поляризовать и ориентировать в пространстве следующий слой молекул воды, а за ним еще и еще. В идеальных условиях — при достаточной плотности заряда на N- и P-центрах, и при температуре абсолютного нуля — энергия взаимодействия молекул воды в поляризованных и структурированных слоях будет оставаться неизменной *на любом удалении от поляризующей поверхности*. Хотя в реальности эти условия недостижимы, распространение эффекта поляризации и ориентации на сверхдлинные расстояния теоретически возможно, о чем уже есть сообщения [15, р. 279—280] (правда, теории МОПВ нет необходимости выдвигать столь суровые температурные и другие требования для того, чтобы обеспечить свою работоспособность).

Как я уже говорил, изотерма адсорбции Бредли [278] (уравнение A2 в приложении) имеет дело с многослойной адсорбцией, причем каждый слой представляет собой мозаику из «кусочков» правильной формы — молекул, сориентированных в определенном направлении в результате взаимодействий как с соседями по своему слою, так и с соседями из других слоев; такая модель работает, если адсорбированные молекулы имеют собственный дипольный момент, а на сорбционной поверхности имеются фиксированные заряды/диполи, расположенные на ней в правильном порядке (например, как клеточки шахматной доски). Согласно теории МОПВ, в нормальных клетках, *находящихся в состоянии покоя*, большая часть воды, если не вся, адсорбирована по Бредли (как и вода в экстравертных моделях на основе желатина или других сходных по свойствам макромолекул).

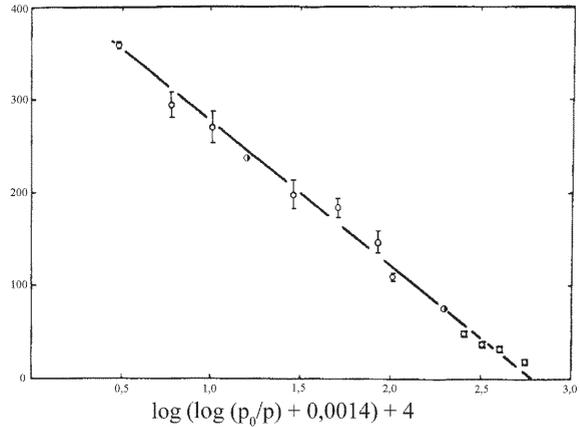
Для проверки этого предположения Линг и Негенданк исследовали в *стерильных* условиях при 25 °С равновесную сорбцию воды тонкими пучками мышечных волокон, выделенных из изолированных портяжных мышц лягушки [159]. Время установления диффузионного равновесия оказалось равным 7—8 суткам. Давление пара варьировали почти от нуля (0,043) до почти полного насыщения (0,996) с помощью растворов NaCl и серной кислоты разных концентраций. Полученные данные представлены на рис. 21 и из них следует, что состояние 95% воды в мышечных волокнах соответствует, как и предсказывала теория МОПВ, сорбционной модели Бредли. Остальные 5% также связаны, но свойства этой фракции отвечают требованиям однослойной адсорбции Ленгмюра; эта вода характе-

ризуется прочной связью с адсорбентом — очевидно, полярными боковыми цепями клеточных белков [426].

Данные Юлиуса Катца о сорбции воды желатином, опубликованные в 1919 году, также охватывают весь диапазон влажности [194]. Сделанный мной анализ этих данных показал, что и они подчиняются изотерме Бредли [15, р. 288—289].

В разделе 8.1 я рассказывал об исследованиях Енё Эрнста, Йозефа Тидьи и сотр. равновесной сорбции воды портняжными мышцами лягушки [399]. Большая часть их экспериментальных данных была получена на мышцах с содержанием воды не более 10% от нормы и характеризует поэтому только воду, прочно связанную белками.

Рис. 21. Сорбция воды пучками изолированных мышечных волокон лягушки при различном относительном давлении пара (p/p_0), где p — парциальное давление пара, а p_0 — давление насыщенного пара в этих же условиях (25 °С). Приведенные данные — обобщенное представление свойств 95% всей воды мышечных волокон, а остальные 5% — это фракция, адсорбция которой происходит в соответствии с изотермой Ленгмюра. Как следует из совпадения расчетной прямой с экспериментальными точками, данный процесс подчиняется изотерме многослойной адсорбции поляризованных молекул Бредли. Наполовину закрашенные кружки — результаты независимых экспериментов. (По Лингу и Негенданку [159]).



Бегло рассмотрев основные экспериментальные данные в пользу теории МОПВ, перейдем теперь к теоретическим и практическим следствиям, вытекающим из ее принципиальных положений.

11.3. Следствия теории МОПВ для теории и практики и их подтверждение

1. Изобретение магнитно-резонансной томографии (МРТ)

Молекулы поляризованной воды, образуя многослойную динамическую структуру, постоянно перемещаются, меняются друг с другом местами и т. д. Но если бы нам удалось сделать стоп-кадр, то оказалось бы, что взаимодействие большинства молекул с соседями (а также, опосредованно, с группами пептидной связи — СО и NH, — организующими и поддерживающими всю эту структуру) сильнее и устойчивее, чем в обычной воде именно благодаря поляризации — увеличению дипольного момента молекул воды. Существование такой сети межмолекулярных связей ограничивает и замедляет как поступательное, так и вращательное движение молекул воды. Ограничение свободы перемещения молекул воды и вхо-

дящих в их состав атомов водорода (или протонов) в многослойных структурах — одно из важнейших следствий теории МОПВ.

Фриман Коуп, получивший физическое образование в Гарварде и медицинское в Медицинской школе Джонса Хопкинса, одним из первых осознал, что, если утверждение теории МОПВ насчет ограниченной подвижности молекул воды в клетках истинно, то это можно обнаружить при помощи такого физического прибора как спектрометр *ядерного магнитного резонанса* (ЯМР) [339].

Этот прибор позволяет измерить *время вращательной корреляции* (τ_r) атомов или протонов водорода в молекулах воды, или время их релаксации T_1 и T_2 . Не вдаваясь в детали, скажу, что фиксация молекул воды (а, следовательно, и ядер атомов водорода) и ориентация их в пространстве *облегчает* размагничивание протонов, известное как *релаксация*. Согласно теории МОПВ, протоны клеточной воды менее мобильны, чем протоны обычной воды, поэтому время T_1 и T_2 для них должно быть короче. Вскоре Коуп подтвердил эту догадку [300]. Впрочем, не он один.

Одновременно с ним другой молодой физиолог Карлтон Хейзелвуд, также из Медицинской школы Джонса Хопкинса, сделал со своими коллегами это же открытие [301] (подробный анализ этого вопроса см. в работе [340]). Затем на сцену вышел третий молодой ученый по имени Реймонд Дамадьян. Взяв на время нужный ему прибор и выпросив у Института Слоуна и Кеттеринга несколько крыс, больных раком, он сделал выдающееся открытие [302; 339, р. 611].

Дамадьян показал, что вода в разных тканях отличается по временным параметрам T_1 и T_2 . А в злокачественных опухолях T_1 и T_2 протонов воды значительно больше, чем в клетках тканей, из которой эти опухоли произошли. Так, протоны воды в опухоли печени — *гепатоме* — имеют гораздо большие T_1 и T_2 , чем протоны в нормальной печеночной ткани.

Дамадьян сразу понял, что это различие в T_1 и T_2 может лечь в основу нового медицинского прибора, которого еще не существовало, и который позволит обнаруживать злокачественные опухоли, не нанося никакого вреда организму больного [302].

Таким образом, сбылись пророческие слова Альберта Сент-Дьёрдьи о том, что раковые клетки имеют «меньше водных структур», сказанные им в 1957 году в примечании к работе [387, р. 136]. Его мысль о меньшем количестве структурированной воды в опухолевых клетках вполне согласуется с теорией МОПВ. Однако дальнейшие исследования показали, что увеличение доли свободной воды — лишь *одна* из причин увеличения T_1 и T_2 в опухолевых тканях [340].

Еще не успели стихнуть насмешки критиков, когда Дамадьян с двумя аспирантами — Ларри Минкоффом и Майклом Голдсмитом — запустили девятый по величине сверхпроводящий электромагнит в мире и в мгновение ока соорудили на его основе первый аппарат ЯМР, окрещенный «Непобедимым» [305] и ныне стоящий в одном ряду с другими историческими изобретениями человечества.

А 15 июля 1988 года Дамадьян вместе с Полом Лотербуром, предложившим более совершенную технологию получения ЯМР-изображения, удостоились от президента Рональда Рейгана Национальной технологической премии за изобретение нового метода исследования, ныне известного как *магнитно-резонансная томография*, или МРТ. Дамадьяну, кроме того, 12 февраля 1989 года была посвящена церемония посвящения его в изобретатели Национального зала славы изобретателей США. Все эти награды и почести он заслужил по праву.

Но лучше всего мечтательную и благородную натуру этого человека характеризует следующее письмо, которое он написал мне 9 ноября 1977 года:

«Утром 3 июля, в 4:45 утра... мы в великом ликовании получили первое в мире МРТ-изображение тела живого человека. Это достижение стало возможным благодаря современным концепциям биофизики водных растворов, великим пионером в которой стали Вы с Вашим классическим трудом — теорией ассоциации-индукции» [15, p. vii; 107, p. xxv].

Немногие написали бы такое письмо другу (а тем более — неизбежному сопернику в науке). Но это благородство претворилось в еще нечто более важное — в поступок, когда он и созданная им компания Fonag, производящая аппараты МРТ, предложили поддержку и пристанище мне и моим коллегам Маргарет Оксенфельд и Чжэнь-дон Чэню после того, как моя лаборатория была закрыта на пике своей продуктивности [247] по инициативе моих научных оппонентов и примкнувшего к ним Национального института здоровья США. В 1988 году нам пришлось распрощаться с Пенсильванским госпиталем в Филадельфии, первой больницей в истории США и пристанищем для нас и наших исследований на протяжении 27 лет.

Вскоре молодой компании Fonag пришлось изо всех сил биться за выживание с такими гигантами мировой индустрии, как General Electric, Siemens, Phillips, Hitachi, Toshiba, не говоря уже о множестве других компаний поменьше. Однако в США сложилась самая совершенная на сегодня *патентная система* в мире, которая не только защищает и вознаграждает как мелких, так и крупных изобретателей, но и, что не менее важно, обеспечивает, благодаря своей открытости, широкий доступ к своим патентам по всему миру, что служит интересам научно-технического прогресса (см. статью [326] о том, как необдуманные изменения патентной системы США угрожают потерей этих преимуществ). В 1997 году Верховный суд США, утвердив решения суда низшей инстанции и Апелляционного суда, предписал компании General Electric, гиганту из гигантов индустрии, выплатить компании Fonag 128,7 миллионов долларов за нарушение ее патента на новаторский метод диагностики рака, а также еще одного патента [305]. Правда, немалая часть этих денег ушла адвокатской конторе «Robins, Kaplan, Miller and Ciresi», храбро и умело отстаивавшей иск Fonag.

Все то, что ныне нам известно о клеточной воде, стоило больших жертв и другим ученым. Один из первых исследователей клеточной воды методом ЯМР, Карлтон Хейзелвуд пережил гонения и суровые лишения за непоколебимость своих научных взглядов. Джим Клег, среди прочих своих научных достижений, подтвердил ограниченную подвижность клеточной воды, исследуя ее диэлектрические свойства в ультравысокочастотном электрическом поле [165]. Бад Роршах стал инициатором исследований коэффициентов вращательной диффузии методом квазиупругого рассеяния нейтронов [166; 304]. Трагедией стало самоубийство Фримана Коупа в 1982 году, после того, как была прекращена финансовая поддержка его научной работы.

2. Уникальные свойства желатина — ключ к новому пониманию коллоидов

В разделе 6.2, п. 4 я указал, почему было необходимо сформулировать новое определение коллоидов. Старое макромолекулярное определение не только вводило в заблуждение, но и никак не объясняло свойства желатина. А ведь желатин дал коллоидам их название, да и исторически это самый «заслуженный» коллоид. Вне всяких сомнений, несостоятельность определения коллоидов немало способствовала снижению интереса к коллоидной химии и ее невысокой оценке как науки со стороны определенной части научного сообщества (см. раздел 16.3).

Уникальные свойства желатина стали поддаваться объяснению после двух событий. Первое — установление своеобразного аминокислотного состава желатина, благодаря которому не менее 56% его полипептидной цепи [508; 157] постоянно находится в полноразвернутой конформации и потому полностью доступно воде. Это объясняется тем, что желатин на 13% состоит из остатков пролина и на 10% — из гидроксипролина, аминокислот, неспособных к образованию α -спиральной или β -складчатой структуры ввиду отсутствия атома водорода у их пирролидинового атома азота. Кроме того, 33% аминокислотных остатков принадлежит глицину — «разрушителю спиралей» (см. раздел 14.1, п. 3.1), а отсутствие в молекуле желатина дисульфидных мостиков ($-S-S-$), стабилизирующих третичную структуру, — еще одна причина открытости полипептидного остова этого белка воде [151]. Вторым событием стало появление и признание теории МОПВ, объясняющей характерные свойства коллоидов формированием на их основе поляризованной и ориентированной воды. С учетом сказанного и идей прошлого родилось новое определение *коллоидов*:

«Коллоид — это кооперативный ансамбль полноразвернутых макромолекул (или их агрегатов) и полярного растворителя (например, воды). Макромолекулы, формирующие коллоидную систему, характеризуются геометрически правильным чередованием диполей (групп NH и CO пептидной связи белков или диполей иной природы) или фиксированных зарядов вдоль полимерной цепи. При

растворении такие макромолекулы взаимодействуют с полярным растворителем, ограничивая подвижность его молекул в результате многослойной адсорбции на своей поверхности, правильно расположенные заряды которой ориентируют их в пространстве и поляризуют. Поляризованность (увеличение дипольного момента молекул растворителя) — важнейшая предпосылка для формирования многослойной структуры связанной воды» (первую, неполную версию этого определения см. в [158]).

Обратите внимание, что, согласно этому определению, коллоидом является экстравертная модель, тогда как интровертная им не является или ее коллоидные свойства выражены слабо. Большинство «нативных» [107, р. 37, п. 4], то есть глобулярных белков интровертны, большая часть их полипептидной цепи недоступна воде, поэтому их нельзя отнести к истинным коллоидам с точки зрения нашего подхода. Проведенное нами разграничение повторяет взгляды Томаса Грэма [53], заявлявшего, что вещества, образующие кристаллы, — не коллоиды, а *кристаллоиды*. Вот и в случае белков, оказалось, что нативные глобулярные белки способны формировать кристаллы в тех условиях, в которых *линейные или полноразвернутые* белки образуют коллоидную систему — *коацерваты* (раздел 6.2, п. 1). В следующем разделе (11.3, п. 3) мы увидим, что, согласно нашему определению, живые клетки являются коллоидами, тогда как мертвые утрачивают большую часть коллоидных свойств живой протоплазмы.

Но можно не сомневаться в том, что, несмотря на все наши усилия, нам вряд ли удастся полностью избавиться от наследия прошлого — череды ошибок и закоренелых представлений в этой области — и сразу убедить всех в плодотворности нашего определения. Как бы то ни было, *оно послужит важной цели — сосредоточит наше внимание на том, что коллоиды — это не только вещество (макромолекулы), но еще и поляризованная вода (или другой полярный растворитель), образующая многослойную структурированную оболочку вокруг этого вещества, несущего определенным образом организованную систему зарядов.*

3. Новая гипотеза коацервации, основанная на теории МОПВ

Коацервация — это расслоение гомогенного водного раствора на две несмешиваемые фазы с четкой границей между ними. Такой раствор непременно должен содержать полноразвернутые цепи макромолекул, к примеру, желатина (но не глобулярных белков), в достаточной концентрации. Как правило, процесс коацервации запускается повышением температуры. Хотя этот вопрос некогда был весьма популярен [321; 324; 325], до сих пор не существует объяснения, что представляет собой коацерват на самом деле, и почему он вообще образуется. Два взаимоисключающих определения коацерватов, предложенные творцом коллоидной химии и коацервации Бунгенберг-де-Йонгом, опровергнутые его же собственными экспериментами, говорят о том, что этот вопрос далек от решения.

Я предлагаю взглянуть на эту застарелую проблему иначе: коацервация — это *автокооперативный переход*, во время которого одновременно протекает три процесса: а) стягивание молекул воды вокруг поверхности полноразвернутой экстравертной молекулы (к примеру, желатина) и их ориентация и поляризация полярными группами макромолекулы (таких, как СО и NH пептидных связей) с образованием многослойной структуры вдоль макромолекулы; затем отдельные водо-белковые комплексы сливаются в единый ассоциат, в котором все макромолекулы целиком включены в общий водный «кокон»; б) вытеснение части избыточной воды ассоциата в фазу, бедную экстравертным веществом, в результате оптимизации структуры ассоциата; и, наконец, в) формирование поверхности коацервата из линейных макромолекул (со связанной и структурированной водой), ориентированных перпендикулярно поверхности раздела фаз и образующих с такими же соседними макромолекулами непрерывную структурированную водную оболочку вокруг коацервата; таким образом формируется граница между богатой экстравертным веществом коацерватной фазой и бедной экстравертным веществом фазой растворителя, молекулы которого по степени упорядоченности не отличается от обычной объемной воды; таким образом, граница раздела фаз — это граница раздела между двумя состояниями воды.

Причина, по которой процесс коацервации запускается при повышении температуры, состоит в вытеснении *наименее поляризованных* молекул воды из коацерватной фазы в среду в результате «стремления» поляризованных водных оболочек макромолекул к слиянию между собой, так как энергия взаимодействия поляризованных молекул воды между собой выше, чем «обычных» в силу более прочных водородных связей. В результате прирост энтропии системы коацерват—среда, связанный с выходом молекул воды из конденсированной фазы (так как доля структурированной воды в системе при этом снижается), начинает перевешивать вклад в термодинамику системы процесса слияния структурированных водных оболочек, снижающих энтропию и свободную энергию системы. Этот термодинамически выгодный процесс завершается дополнительным усилением поляризации молекул связанной воды и, как следствие, — утолщением водных слоев в пространстве между макромолекулами. Таким образом, рост энтропии системы в результате перераспределения воды между коацерватом и дисперсионной средой является движущей силой коацервации. В силу *автокооперативности* этот переход подчиняется правилу «*все или ничего*» (о кооперативности см. также раздел 14.3, п. 2 и раздел 4 приложения). Увы, точное количественное описание феномена трехмерного кооперативного перехода (частным случаем которого, согласно нашей теории, является коацервация) — одна из труднейших задач теоретической физики (см. Yang [541, p. 1], которая все еще ждет своего решения.

Ранее мы назвали NP–NP-системой двумерную сеть положительных (P) и отрицательных (N) центров, расположенных в шахматном порядке (элементарная NP–NP-система — две параллельно расположенные полноразвернутые макромолекулы). Две параллельные NP–NP-системы образуют элементарную трехмерную NP–NP–NP-систему. Предположим, что коацерват представляет собой систему NP–NP–NP, где имеется несколько параллельных полимерных цепей или несколько параллельных друг другу плоскостей. Введем обозначения: то, что раньше выглядело как система NP–NP, будет выглядеть как $(NP)^2$. Цепи желатина в коацервате, таким образом, будут обозначаться $(NP–NP–NP)^n$, где индекс n соответствует некоторому среднему количеству цепей, объединенных общей водной оболочкой, идущих параллельно друг другу и сгруппированных вокруг общей оси симметрии. Коацерват на основе поливинилметилового эфира $([-CH_2CH(OCH_3)]_n)$, содержащий вместо P-центров незаряженные группы (O-центры), следует обозначить так: $(NO–NO–NO)^n$; это значит, что коацерват образован на основе полимера, который представляет собой череду отрицательно заряженных атомов (в данном случае — кислорода), перемежающихся с нейтральными группами.

Представленная выше модель коацервации является ключом к пониманию ряда явлений. Во-первых, она дает объяснение резкой очерченности границы коацервата, а значит, и его способности не смешиваться с окружающей обычной водой. Насколько мне известно, до сих пор никому не удавалось предложить молекулярного механизма этой несмешиваемости. Во-вторых, модель объясняет, почему *только* полноразвернутые белковые цепи (или *линейные* белки, как их называл Бунгенберг-де-Йонг), могут образовывать коацерваты (см. раздел 6.2, п. 1): согласно теории МОПВ, получившей убедительные подтверждения, лишь полноразвернутые белковые цепи могут связывать воду в форме многослойной структуры поляризованных молекул, объем которой может быть значительным. В-третьих, она отвечает на вопрос, почему протоплазма из поврежденных клеток — от инфузории Дюжардена до клеток *Bryopsis* Лепешкина — не смешивается с водой: она просто представляет собой коацерват, что давно подозревал и Лепешкин, и другие ученые [321; 324], хотя они и не предложили этому физико-химического объяснения.

Читатель, вероятно, еще помнит, что электронно-микроскопические исследования с радиоактивной меткой позволили установить неспособность к регенерации мембраны клетками с плотной желеобразной протоплазмой как у мышечных волокон лягушки (раздел 4.1, п. 4). Однако я сразу тогда отметил, что эти данные не исключают возможности регенерации мембран клетками с менее вязкой протоплазмой, такой как на рис. 3. Теперь, вооружившись новым определением коацервата, продолжим исследовать эту тему.

Как я уже писал, именно регенерация мембран была центральной темой «Осмотических исследований» Пфедфера [18]. Он искренне верил, что протоплазма обладает способностью мгновенно образовывать новую мембрану, как только приходит в соприкосновение с «другим водным раствором» [18, р. 234]. Именно этот аргумент был разящим оружием в руках сторонников

мембранной теории в их борьбе с Кайтом, который утверждал, что клетки содержат несмешивающуюся с водой протоплазму. Однако обратимся к интересному наблюдению: в 50%-м растворе поливинилметилового эфира (ПВМЭ) при умеренном повышении температуры (до 34 °С), как и в растворе желатина, возникают коацерваты [15, р. 357], но, в отличие от желатина, в раствор ПВМЭ не нужно добавлять соль или гуммиарабик. При охлаждении коацерваты на основе ПВМЭ снова переходят в раствор. Эти опыты доказывают, что первопричина данных изменений лежит не в самом факте контакта субстрата с водным раствором, который «однозначно» запускает процесс формирования «мембраны», а в чем-то другом: ведь полимер контактирует с водой и *до*, и *после* перехода в коацерватную фазу.

Как будет показано в разделе 14.3, протоплазма любой клетки в состоянии покоя, согласно теории МОПВ, представляет собой матрикс NP–NP–NP-типа из *параллельно ориентированных* развернутых белковых цепей [306, р. 8; 425; 156, р. 202] и уже в силу этого не способна смешиваться с водой. При таком понимании нет необходимости в особых барьерах, отделяющих клетку от внешней среды. Интересную иллюстрацию этого утверждения мы находим у Лепешкина в его опыте с раздавленными клетками морской водоросли *Bryopsis*, из которых выделялись капли протоплазмы, способные в гипотоническом растворе образовывать внутри себя вакуоли (см. гл. 7). Обращаю ваше внимание и на то, что новая «водостойкая» граница вакуоль/протоплазма образовывалась вовсе не тогда, когда соответствующий участок протоплазмы «соприкасался с другим водным раствором» [18, р. 234]. Никакого «другого раствора» тут не было. Вакуоль возникает в объеме протоплазмы и содержит либо воду, выделившуюся из нее самой (гипотония — фактор повреждающий), либо воду, проникшую из окружающей среды [62, р. 289—290].

Не менее значимо наблюдение Лепешкина, что вакуоли в каплях протоплазмы *Bryopsis*, возникнув, исчезают при добавлении в гипотонический раствор морской воды для восстановления изотоничности среды [62, р. 289—290]. Из этого наблюдения с очевидностью следует, что если мембрана и возникает на поверхности раздела протоплазма/вакуоль, то она обладает фантастической способностью не только с легкостью появляться, но и бесследно исчезать. Вместо того, чтобы искать успокоения в голословных утверждениях об удивительных свойствах мембраны, лучше еще раз обратиться к простой и понятной модельной системе — раствору ПВМЭ, в котором, как и в протоплазме *Bryopsis*, запуск коацервации или обратного процесса определяется, по нашему убеждению, исключительно активностью воды в протоплазме (ее связанным или свободным состоянием) и чувствительностью этого состояния к физическим условиям среды (температуры, в данном случае), а не формированием такого сложного и стабильного надмолекулярного комплекса, каким нам всегда представлялась мембрана.

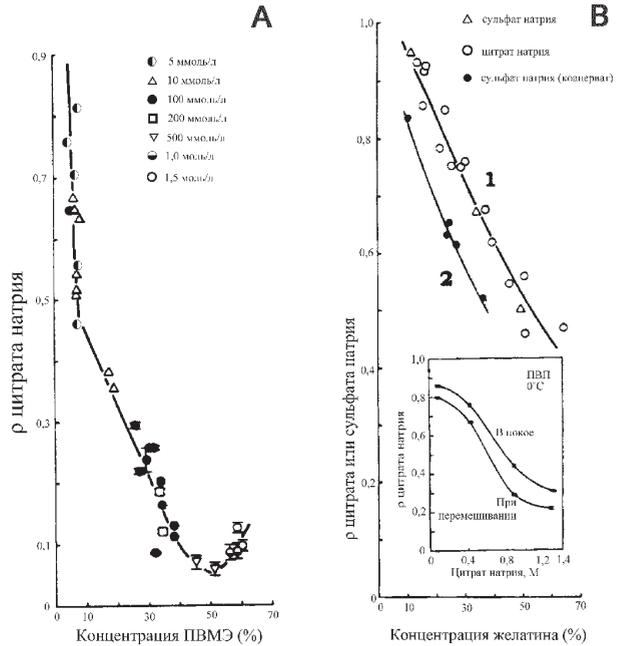
Несмешиваемость коацервата с водой не означает, что вблизи новой поверхности протоплазмы не происходит вторичной перестройки ее структуры. Как показали выдающиеся опыты Уеды, Инуе и их коллег по Хоккайдскому университету в Японии, образование новых поверхностей в каплях протоплазмы *Nitella* действительно влечет за собой вторичную перегруппировку [411]. Однако не эта перегруппировка обеспечивает несмешиваемость протоплазмы с водой. Будь протоплазма обычным водным раствором, она бы неизбежно стала растворяться в окружающей воде, особенно при встряхивании, и вместо тысяч мельчайших нерастворимых в воде капелек (которые

наблюдал Лепешкин) мы получили бы, в конце концов, протоплазматический бульон.

Итак, не мгновенная регенерация мембраны является причиной устойчивости капель протоплазмы, показанных на рис. 3. Протоплазма, как коацерват в силу своей внутренней структуры, а не только структуры поверхности, независимо от своей вязкости, не способна смешиваться с водой — что и предположил в общей форме Феликс Дюжарден, впервые описавший живое желе, выделенное из простейших и названное им саркодой.

Поскольку данные мною определения коацервации и коацервата публикуются здесь впервые, их проверка на практике пока остается

Рис. 22. Кажущийся коэффициент равновесного распределения (ρ) цитрата или сульфата натрия между содержимым диализного мешка и средой. Содержимое диализных мешков представляло собой растворы поливинилметилового эфира (ПВМЭ) (А) или желатина (В) в различных концентрациях. На панели А разными значками обозначена равновесная концентрация цитрата натрия в среде (максимальная из исследованных, 1,5 М, больше минимальной, 5 мМ, в 300 раз). На панели В данные для кривой 1 получены в опытах Линга и Оксенфельд [172] на простых вязких растворах желатина при температуре 25 °С, а данные для кривой 2, представляющей собой зависимость ρ для сульфата натрия в простом коацервате желатина при температуре 50 °С, взяты из работы Холлемана с сотр. [70]. Обратите внимание, что при равных концентрациях желатина значение ρ в коацервате значительно ниже, чем в простом растворе этого белка. На врезке к рис. 22В, взятой из работы Линга, Уолтон и Бесинджер [425], показана зависимость величины ρ для цитрата натрия в системе поливинилпирролидон (ПВП)/вода от равновесной концентрации соли в среде (при 0 °С) и влияние на эту зависимость перемешивания вязкого раствора полимера (начальная концентрация ПВП — 20%). Перемешивание осуществляли ритмичными перекачиваяниями свинцовой дробинки, покрытой силиконом, вдоль длинных натянутых диализных мешков диаметром 6,4 мм, заполненных раствором ПВП. Диализные мешки были, в свою очередь, помещены в пробирки с завинчивающейся крышкой, заполненные раствором цитрата натрия; пробирки закреплялись в специальном устройстве, которое периодически поворачивало их то пробкой вниз, то вверх. Движение дробинки заставляло раствор протекать через узкий зазор между дробинкой и стенкой диализного мешка. В этих условиях создается значительный гидродинамический градиент, в поле которого асимметричные макромолекулы ориентировались в одном направлении. Обратите внимание, что при одинаковых равновесных концентрациях цитрата натрия (а, следовательно, и при одинаковых конечных концентрациях ПВП) величина ρ после достижения диффузионного равновесия в перемешиваемом растворе ПВП была значительно ниже, чем в неперемешиваемом. (В основном по Лингу и Оксенфельд [172]).



делом будущего. Однако некоторые подтверждения этих представлений можно найти в наблюдениях прошлых лет.

На рис. 22А и 22В показаны зависимости величины ρ (кажущегося коэффициента равновесного распределения исследуемого вещества между раствором полимера и средой; «кажущегося» — потому, что в растворе полимера исследуемое вещество может находиться не только в свободном, но и в связанном состоянии; истинный коэффициент распределения, q , рассчитывается только для свободной фракции; если $\rho \leq 1$, значит связанной фракции нет и ρ приобретает физический смысл q) для иона Na^+ (в виде цитрата и сульфата) между растворами двух экстравертных полимеров — поливинилметилового эфира (ПВМЭ) и желатина — и омывающей водой в зависимости от концентрации полимеров (растворы полимеров помещали в диализные мешочки, проницаемые только для воды и ионов). Заметьте, что при концентрации ПВМЭ 10 об.% ρ составляет около 0,4, то есть при таком содержании полимера *не менее* 60% воды в диализном мешке теряет способность растворять цитрат натрия вследствие связывания растворителя макромолекулами. Как видно на рис. 22В, раствор желатина при комнатной температуре также обладает способностью снижать активность воды, но в меньшей степени: при той же концентрации желатина (10 об.%) ρ для цитрата и сульфата натрия оказывается более высоким — между 0,8 и 1,0.

Можно вспомнить о довольно давнем исследовании равновесного распределения сульфата натрия (Na_2SO_4) в системе желатин + Na_2SO_4 , проведенном Холлеманом, Бунгенберг-де-Йонгом и Модерманом [70] (см. раздел 6.2, п. 2). Правда, наш опыт (рис. 22В) проходил при температуре 25 °С (кривая 1), а их — при 50 °С (кривая 2), так как растворы желатина образуют *коацерваты* только при высокой температуре (см. раздел 6.2, п. 1). Тем не менее в обоих экспериментах было зафиксировано вытеснение соли натрия. Интересно, что упомянутые опыты с ПВМЭ (рис. 22А) также проводили при температуре 25 °С, то есть при температуре ниже температуры коацервации ПВМЭ (34 °С). Из этого следует, что коацервация вовсе не является обязательным условием для снижения активности воды и частичного вытеснения, вследствие этого, растворенного вещества в среду. Достаточно, чтобы в модельной системе имелись развернутые цепи белков или других полимеров, как и утверждает теория МОПВ. Кроме того, *гелеобразное* состояние полимерной системы также оказалось необязательным для превращения воды в плохой растворитель, хотя в свое время я настаивал на этом [155, р. 691]. Тем не менее полученные дополнительные данные только расширяют возможности теории. Известно, что протоплазма может находиться в состоянии геля либо временно, либо постоянно, как мы можем убедиться на примере эктоплазмы *Nitella* [63], миоплазмы мышечного волокна и аксоплазмы нерва [342], однако в любом из этих состояний (золя или геля), в клетке или в модельной системе обязательно присутствует связанная поляризованная вода в форме

многослойных структур, способных оказывать существенное влияние на распределение веществ между клеткой/моделью и средой.

Появление новой теории коацервации открыло новые перспективы. До сих пор считалось, что при качественном сходстве в способности экстравертных моделей и живых клеток вытеснять растворенные вещества — соли натрия, сахара и др., — в количественном отношении эти объекты отличаются значительно. Величина q в клетках была заметно ниже, чем в искусственных моделях. Как я предположил в свое время, причиной этому является «увеличенное количество слоев поляризованной воды в промежутках между параллельно ориентированными линейными белковыми цепями» [306, р. 8; 425; 156, р. 202] (см. также рис. 20В, кривые 1 и 2) или, другими словами, ассоциация белков бок о бок и слияние их водных оболочек в условиях очень высокой концентрации белка в живой клетке, часто недостижимой в искусственных системах.

Новое понимание явления коацервации также включает в себя наличие термодинамических предпосылок к увеличению количества параллельно ориентированных NP-цепей и росту, вследствие этого, объема адсорбированной воды. В результате такого роста в коацервате усиливается вытеснение свободных веществ во внешнюю среду и значение q в них становится ниже, чем в более «рыхлых» NP–NP–NP-системах на той же полимерной основе, но не являющихся коацерватами. Это ожидание подтверждается при сравнении величины ρ для сульфата натрия в растворе желатина (кривая 1 на рис. 22В) и в коацервате желатина той же концентрации (кривая 2 на рис. 22В). Кривая 2 проходит ниже кривой 1 значит величина ρ для сульфата натрия в желатиновом коацервате ниже, чем в растворе желатина.

Но надо помнить, что кривая 1 получена при более низкой температуре (25 °С), чем кривая 2 (50 °С). Могла ли эта разница температур стать причиной различий величин ρ ? Работы как Гари-Бобо с Линденбергом [351], так и Линга с сотр. [425, р. 127] показали, что повышение температуры *увеличивает* ρ для солей натрия. Поэтому более низкая величина ρ для сульфата натрия в случае коацервата желатина не может быть объяснена температурными различиями. Согласно новому представлению о структуре коацервата, предложенному здесь, снижение ρ в коацерватной модели является следствием консолидации макромолекул в параллельные структуры-ассоциаты, что приводит к росту количества слоев структурированной воды между ними и доли такой воды в коацервате в целом. В водных растворах экстравертных полимеров такая ассоциация менее выражена, но все-таки имеет место. Это подтверждают данные Линга с сотр. [425] и врезка на рис. 22В. На ней показано, что ρ для цитрата натрия в растворе экстравертной модели — поливинилпирролидона — *уменьшается*, если заставить полимеры выстраиваться в параллельные ряды *механическим* воздействием [425] (подробности — в подписи к рис. 22). Вёсснер и Сноуден, изучая высокомолекулярный полисахарид бактериального происхождения Kelzan®,

обнаружили увеличение упорядоченности этого полимера в растворе при помешивании [437].

О других воздействиях и условиях, способных снизить величину q для солей натрия и других молекул в клетках, будет рассказано чуть ниже, в п. 5.

4. Количественная теория распределения веществ между клеточной водой и водой окружающей среды вследствие их вытеснения из клетки или модельных систем

Для начала мне хотелось бы подчеркнуть, что я считаю *вытеснение веществ из клеточной воды явлением, в котором наиболее ярко проявляется живое состояние клеточного вещества. В отличие от некоторых данных, полученных другими экспериментальными методами, количественные исследования вытеснения растворенных веществ имеют под собой простую физическую основу и потому способны дать достоверные факты в пользу теории МОПВ, что и будет продемонстрировано ниже.*

В 1849 году Карл Людвиг, часто называемый отцом современной физиологии, провел эксперимент на мочевом пузыре свиньи [167] — почти через 100 лет после того, как аббат Нолле совершил первый в истории осмотический эксперимент на этом же биологическом объекте.

Людвиг исследовал поглощение *высушенным* мочевым пузырем водного раствора сульфата натрия. Оказалось, что в воде, поглощенной тканью, сульфата натрия было меньше, чем в омывающем растворе. Затрудняясь объяснить это, Людвиг писал: «Даже мельчайшая часть стенки пузыря обладает каким-то особым средством к воде; имеет ли эта способность химическую или физическую природу, однажды объяснит нам химия, восстав из своего теоретического убожества» [167].

Неспособность фундаментальной физики и химии объяснить сложные биологические явления вновь была отмечена 60 лет спустя Мартином Фишером. На заключительной странице своей диссертации «Отек» он написал: «Когда мы говорим о “сродстве” коллоидов к воде, как мы это делали на протяжении всей этой книги, мы используем это слово вовсе не по недомыслию. Хотя “сродство” не является четко определенной силой, мы выбрали это понятие, чтобы сгладить существующий пробел. Физическая химия пока не разъяснила нам, в чем суть этого понятия, но она настойчиво ищет ответ. Когда он будет найден, мы выбросим это неопределенное слово и заменим его названиями тех конкретных сил, которые физическая химия нам предпишет» [78, р. 657].

Удивительно, но первый количественный молекулярный механизм, объясняющий различие в поглощении воды и сульфата натрия, растворенного в ней, был предложен лишь в конце XX века, то есть полтора века спустя после выражения Людвигом своего недовольства химией. Теория о существовании многослойной структуры

связанной воды с усиленной поляризацией ее молекул (см. раздел 11.2) предложила разумный физико-химический механизм *средства* коллоидов к воде, явившись ответом на вопрос, поставленный Фишером. Рассмотрим экспериментальные данные в пользу этой теории.

Теория МОПВ, говоря о распределении веществ между клеточной водой и водой среды, предлагает две взаимосвязанные причины термодинамического характера, объясняющие низкий уровень Na^+ (и соответствующего аниона) или сахарозы в клетке по сравнению с их равновесной концентрацией во внешней среде.

Вот эти две причины: *энергия* (если быть точным, *энтальпия*, хотя особой разницы нет) и *энтропия*. Это значит, что образование многослойных структур воды с усиленной поляризацией ее молекул в условиях внутриклеточной среды термодинамически *выгодно*; в обычной воде предпосылок к образованию такой структуры нет [168].

Взаимодействие молекул структурированной, клеточной, воды друг с другом сильнее, чем в обычной воде, поэтому на образование «дыр» в клеточной воде для иона Na^+ (или молекулы сахарозы, или другого вещества) тратится больше энергии, чем ее выделяется при схлопывании таких «дыр» в обычной воде при переходе Na^+ из среды в клетку. *Это неравенство — основная энергетическая причина вытеснения растворенных веществ из клетки.*

Вторая причина также является результатом повышенной прочности адсорбированной воды как структуры. Сеть молекул структурированной воды ограничивает вращательные движения растворенных в ней молекул, поэтому их вращательная энтропия ниже в клетке, чем в среде. Поскольку вращательная энтропия составляет основную часть общей энтропии молекул вроде сахарозы и таких многоатомных образований, как гидратированные ионы Na^+ , уменьшение их энтропии в сочетании с энергозатратным «дырообразованием» в клетке делает растворение подобных веществ в клеточной воде термодинамически невыгодным. Это и приводит к положению, когда равновесная концентрация вещества в клеточной воде ниже, чем в среде.

Чем крупнее молекула вещества, тем больше сказывается влияние указанных термодинамических факторов, тем меньше их растворимость в клеточной воде. Отсюда вытекает *«правило размера»: истинный коэффициент равновесного распределения (q) вещества между клеточной водой (или водой, связанной экстравертной моделью) и внешней средой обратно пропорционален молекулярному объему вещества* [168; 169; 170]. Это одно из теоретических следствий теории МОПВ, которое было проверено в экспериментах.

На рис. 23 представлена зависимость равновесных концентраций 9 неэлектролитов в диализных мешках с 39% раствором нативного бычьего гемоглобина от концентрации этих веществ в среде [170]. Обратите внимание, что угол наклона всех полученных прямых близок к 45° — это означает, что *истинный коэффициент равновесного*

распределения (q) близок к единице. Таким образом, большая концентрация нативного гемоглобина не оказывает ощутимого влияния на растворимость в воде диализного мешка даже такого крупномолекулярного вещества, как раффиноза (трисахарид с молекулярным объемом 500 мл/моль). Объясняется это тем, что нативный гемоглобин — это интровертный белок. Большая часть его пептидного остова включена в α -спирали или участвует в других внутримолекулярных водородных связях и потому не способна связать существенное количество воды, содержащейся в диализном мешке. Слабый эффект

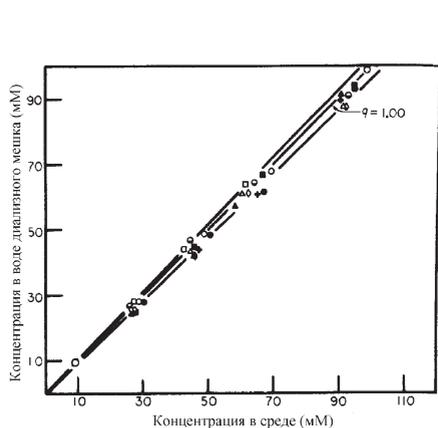


Рис. 23. Зависимость равновесного распределения веществ между диализным мешком (с раствором нативного бычьего гемоглобина, $39 \pm 1\%$) и омывающим раствором от их концентрации в среде. Диализ проводили в течение 5 дней при температуре 25°C . Внешний раствор на основе $0,4\text{ M NaCl}$ содержал: этиленгликоль \bullet , глицерин Δ , эритрит \square , D-ксилозу $+$, сорбит \blacktriangle , маннит \diamond , трегалозу \blacksquare , раффинозу \circ . (По Лингу и Ху [170]).

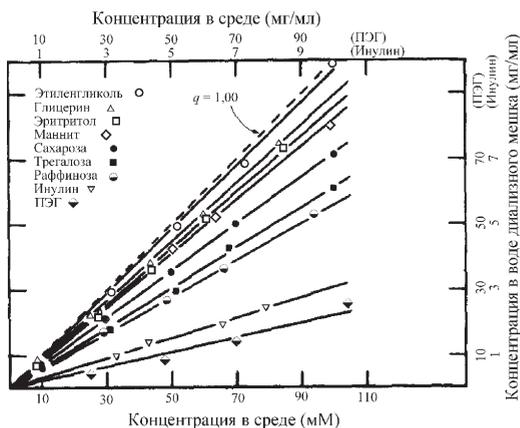


Рис. 24. Равновесное распределение девяти неэлектролитов между диализным мешком, содержащим 18% -ный раствор бычьего гемоглобина, денатурированного обработкой раствором $0,4\text{ M NaOH}$. Диализ проводили в течение 5 дней при температуре 25°C . (По Лингу и Ху [170]).

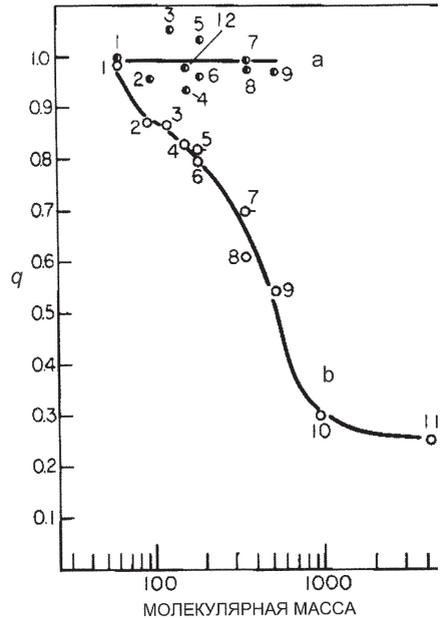
вытеснения вещества из концентрированных растворов таких белков можно обнаружить лишь в том случае, если молекулярный объем исследуемого вещества исчисляется тысячами мл/моль [171].

Совсем другую картину мы видим на рис. 24, на котором показано равновесное распределение тех же 9 неэлектролитов, что и на рис. 23, между диализным мешком с 18% -ным раствором бычьего гемоглобина и омывающим раствором [170]. На этот раз в мешках был не нативный, а *денатурированный* гемоглобин (денатурация проведена обработкой белка $0,4\text{ M}$ раствором NaOH). Как видно, зависимости остались линейными, но углы их наклона стали заметно отличаться от 45° . Методом наименьших квадратов можно найти

значение q для каждой прямой (q равно тангенсу угла наклона). Денатурация привела к разрушению в гемоглобине большей части вторичных структур и пептидные связи белка стали теперь доступны воде. Речь идет о том же препарате бычьего гемоглобина, что и на рис. 9 (но денатурированном), когда мы хотели титрованием раствором NaOH освободить из внутривеликовывих солевых связей все β - и γ -карбоксивные группы для того, чтобы дать им возможность адсорбировать Na^+ .

На рис. 25 приведена зависимость параметра q (полученного из данных предыдущего рисунка) от молекулярной массы исследован-

Рис. 25. Зависимость истинных коэффициентов равновесного распределения (q) различных неэлектролитов от молекулярной массы соответствующего вещества в двух модельных системах: между 39%-ным раствором нативного бычьего гемоглобина и средой (а), и между средой и 18%-ным раствором бычьего гемоглобина, денатурированного обработкой NaOH (b). Значения q , равные тангенсу угла наклона прямых (см. рис. 23 и 24), вычислены методом наименьших квадратов. 1 — этиленгликоль, 2 — глицерин, 3 — эритрит, 4 — D-ксилоза, 5 — D-маннит, 6 — сорбит, 7 — сахароза, 8 — трегалоза, 9 — раффиноза, 10 — инулин, 11 — полиэтиленгликоль (ПЭГ-4000). (По Лингу и Ху [170]).



ных веществ (кривая b). Видно, что с ростом молекулярной массы значение q уменьшается S-образно, в полном соответствии с «правилом размера», выведенного нами из теоретических соображений. А вот значения q для тех же веществ в растворе *нативного* гемоглобина (рис. 25, прямая а) расположились иначе — вокруг значения q , равного 1. Вот наглядная демонстрация истинности принципиального положения теории МОПВ о том, что лишь экстравертные модели оказывают выраженное влияние на растворяющую способность воды, тогда как интровертные модели влияют на нее незначительно. До сих пор мы рассматривали искусственные модели. Перейдем теперь к центральному объекту нашего внимания — к клеткам.

Линг, Нью и Оксенфельд исследовали равновесное распределение 21 неэлектролита между *изолированными мышцами лягушки* и сре-

дой при 0 °С [156]. При такой температуре ни одно из исследованных нами веществ не подвергается каким-либо химическим модификациям в клетке [156, Table 1]. К тому же такая температура хорошо переносится североамериканскими леопардовыми лягушками из штата Вермонт (*Rana pipiens pipiens*, Schreber), мышцы которых мы использовали в работе. Часть полученных результатов [156] показана на рисунках 26 и 27, но все они (исследовано 21 вещество), как мы это и ожидали из теоретических соображений, носили линейный характер. Зависимость параметра q от логарифма молекулярной массы соответствующего вещества показана на рис. 28.

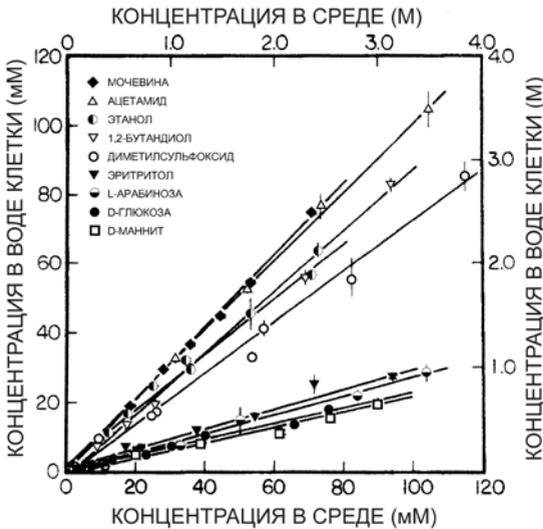


Рис. 26. Равновесное распределение 9 неэлектролитов между мышечными волокнами лягушки *Rana pipiens pipiens* и средой при 0 °С. Каждая точка соответствует среднему значению, полученному, по меньшей мере, из четырех образцов (показана стандартная ошибка измерения). Инкубационный период, необходимый для достижения диффузионного равновесия, в случае L-арабинозы и L-ксилозы составил не менее 6 суток, для остальных веществ — 24 часа (во всех случаях факт достижения диффузионного равновесия находился под контролем). Тангенс угла наклона прямых (истинный коэффициент равновесного распределения, q) рассчитывали методом наименьших квадратов. (По Лингу и др. [156]).

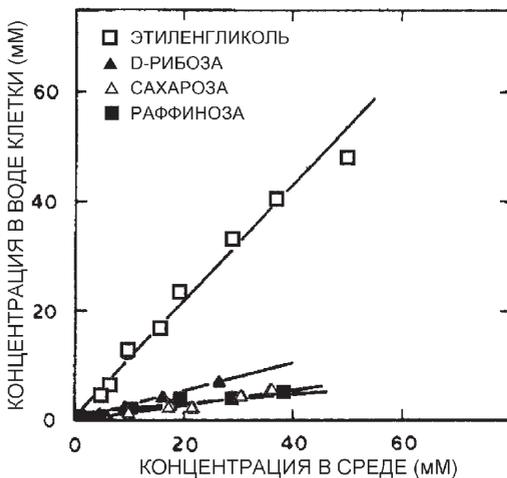
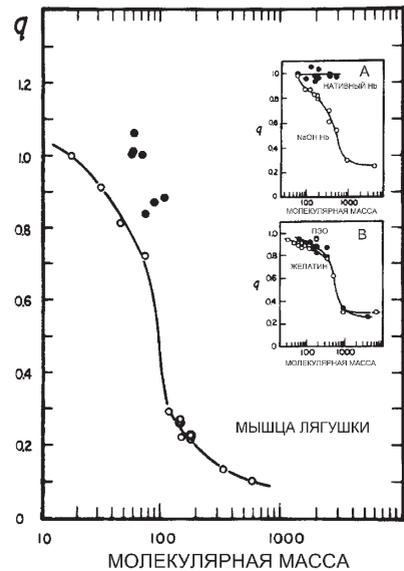


Рис. 27. Равновесное распределение 4 неэлектролитов между водой мышечных волокон лягушки *Rana pipiens pipiens* и средой при 0 °С. 24-х часов инкубации оказалось достаточным для достижения диффузионного равновесия. Подробности см. в подписи к рис. 26. (По Лингу и др. [156]).

И в случае мышечных клеток большинство точек приходится на S-образную кривую в соответствии с «правилом размера» (основная панель рис. 28). То есть мы сталкиваемся с той же закономерностью, что и в случае искусственных экстравертных моделей: с денатурированным гемоглобином (рис. 28А), с полиэтиленоксидом (ПЭО) и желатином (рис. 28В). Данные по желатину заимствованы из работы Гари-Бобо и Линденберга [351]. Они определяли коэффициент распределения веществ только в одном опыте и только с одной концентрацией исследуемого соединения, а мы сделали это в целом ряде экспериментов и для нескольких концентраций с последующей обра-

Рис. 28. Зависимость истинных коэффициентов равновесного распределения (q) 21 неэлектролита между водой мышечных волокон лягушки *Rana pipiens pipiens* и средой при 0 °С от их молекулярной массы. На врезке А приведены для сравнения зависимости q , полученные для тех же неэлектролитов в системах раствор гемоглобина/среда: прямая — для нативного гемоглобина (39%-ный раствор), S-образная кривая — для гемоглобина, денатурированного NaOH. На врезке В представлены те же зависимости (q от молекулярной массы), полученные для систем 18%-ный желатин/среда [351] и 15%-ный полиэтиленоксид/среда. Данные, полученные для желатина (показаны темными кружками на основной панели и светлыми — на врезке В) являются скорее кажущимся коэффициентом распределения (ρ), а не истинным (q); об этом см. текст. (По Лингу и др. [156]).



боткой полученных данных методом наименьших квадратов, как сказано выше. Строго говоря, Гари-Бобо и Линденберг получили *кажущиеся коэффициенты равновесного распределения* (ρ), хотя они в данном случае могут быть близки или даже равны соответствующим значениям q . Поэтому, видимо, семь темных точек Гари-Бобо и Линденберга оказались явно выше кривой, показанной на основной панели рис. 28.

Воспользовавшись методами *статистической механики*, я в 1993 году вывел формулу распределения веществ между клетками (или модельными системами) и средой [168] (уравнение А3 в приложении). На рис. 29 представлены те же данные о распределении 21 неэлектролита между мышечными волокнами лягушки и средой, что и на предыдущем. Но на этот раз здесь показана зависимость q не от молекулярной массы, а от *молекулярного объема* соответствующего вещества (в логарифмическом масштабе), а обе кривые получены аналитически при помощи уравнения А3. Важно отметить,

что, согласно параметрам этих уравнений, избыточная энергия взаимодействия молекул воды в мышечных волокнах лягушки, названная мною *напряжением вытеснения* (U_{vp}), составляет 126 кал/моль для обеих кривых (мы уже говорили о том, что энергия взаимодействия между молекулами воды в адсорбированных слоях выше, чем в обычной воде из-за дополнительной поляризации ее молекул, вызванной взаимодействием с другими диполями/зарядами).

Теперь мы видим, что положение семи точек, которые на рис. 28 оказались вне кривой, хорошо описывается тем же уравнением А3 и отличается от кривой, полученной из наших экспериментов, за

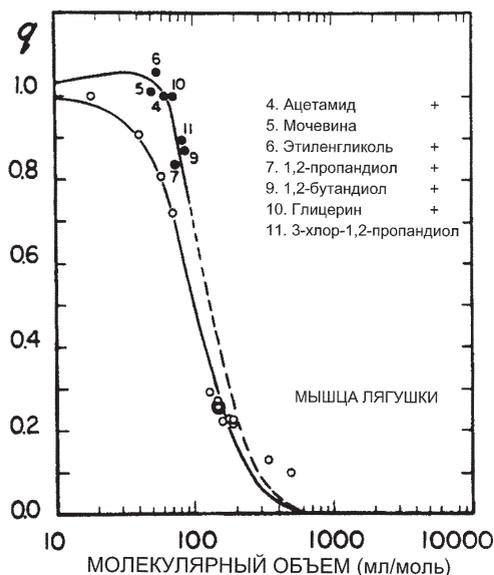


Рис. 29. Зависимость коэффициентов равновесного распределения (q) 21 неэлектролита между водой мышечных волокон и средой от их молекулярного объема. Представлены те же экспериментальные данные, что и на рис. 28 (верхняя кривая построена по данным работы [351], см. рис. 28). Аналитическим выражением для обеих эмпирических зависимостей является уравнение А3 (приложение). Согласно расчетным кривым, напряжение вытеснения (U_{vp}) поляризованной воды одинаково в обоих случаях и составляет 126 кал/моль. При этом поверхностная энергия поляризации (U_s) у них отличается и составляет для нижней кривой 119, а для верхней — 156 кал/моль воды (+30%). Вещества, помеченные крестиком, являются криопротекторами. (По Лингу и др. [156]).

счет большей, на 30%, величины параметра U_s — *поверхностного компонента энергии поляризации*. Иными словами, каждый из этих семи неэлектролитов сильнее других исследованных веществ взаимодействует со слоями адсорбированной воды (в которых вода имеет чуть больший дипольный момент), из них пять соединений (помечены крестиками) известны как *криопротекторы* — вещества, способные защитить клетки, ткани и даже человеческий эмбрион от повреждений при замораживании и оттаивании. Из сопоставления веществ, представленных в этом списке, можно сделать смелое предположение о том, что и мочевина могла бы быть криопротектором, если бы не ее способность разрушать структуру нативных белков.

Данные, приведенные на рис. 24, 26 и 27, позволяют оценить среднее количество слоев связанной воды, возникающих между соседними параллельными адсорбирующими структурами [156, р. 201], см. также рис. 20А. В целом, полученные результаты *подтверждают*

теорию многослойной организации поляризованной воды (МОПВ): действительно, вода и в мышечных волокнах лягушки, и в экстравертных моделях образует множество поляризованных слоев (см. раздел 11.2).

Подтверждение центрального положения теории МОПВ о многослойной организации поляризованной воды клеток и модельных систем само по себе стало бы важнейшим событием. Однако в процессе поисков возможностей для такой проверки были обнаружены совершенно новые факты, также заслуживающие пристального внимания.

Во-первых, как уже было сказано выше, в мышечных волокнах лягушки поляризующие структуры отделены друг от друга в среднем шестью слоями поляризованной воды. В масштабах всей клетки, с учетом большой концентрации белка в ней, эти шесть слоев включают в себя всю воду, содержащуюся в таком объекте, как мышечное волокно. Этот вывод соответствует более ранним экспериментам с центрифугированием мышечных сегментов, которые показали, что клетка в состоянии покоя свободной воды не содержит.

Во-вторых, согласно теории МОПВ, напряжение вытеснения ($U_{\text{вр}}$) и поверхностный компонент энергии поляризации ($U_{\text{с}}$) должны быть одинаковы в любой точке клетки, содержащей воду. Теоретически это означает неизменность энергии взаимодействия молекул воды друг с другом (повышенной по сравнению с обычной водой) во всех поляризованных слоях за пределами первого слоя воды, адсорбированного на N- и P-центрах и особенно прочно связанного с белком (см. текст в конце раздела 11.2, набранный мелким шрифтом). На практике, соответствие результатов экспериментов теоретическим расчетам (как мы это видим на рис. 29) подтверждает наше предположение о приблизительно одинаковой энергии взаимодействия молекул воды друг с другом во всем объеме клетки (независимо от локализации), что означает, как следствие, наличие условий для структурирования клеточной воды во всех частях клетки.

Третьим достижением нашей теории является разработка необычайно чувствительного метода определения избыточной энергии взаимодействия молекул связанной воды, величина которой зачастую ничтожна особенно в сравнении, например, со *скрытой теплотой парообразования* воды (9,7171 ккал/моль [436]). По точности наш метод можно сравнить с аналитическими весами, способными определить вес микроскопического образца массой на пять порядков меньше массы чаши весов.

В-четвертых, достижением теории является *убедительная демонстрация плодотворности предложенного нами термодинамического подхода для объяснения разной растворяющей способности клеточной и обычной воды: превышение энергии взаимодействия молекул воды в адсорбированных слоях по сравнению с объемной водой всего на 126 кал/моль способно привести к вытеснению из клеточной воды таких крупных ионов и молекул, как гидрати-*

рованный ион натрия или молекула сахарозы. Нет ничего проще принципа, лежащего в основе этого явления. Возьмем, для примера, сахарозу. Ее молекулярная масса составляет 342,3, а молекулярный объем — 338,8 мл/моль [156]. Молекулярный объем воды равен 18,02 мл/моль. Разделив 338,8 на 18,02, мы найдем количество молекул воды, вытесняемых одной молекулой сахарозы — 18,8. Умножив 126 на 18,8, получим 2369 кал/моль или 2,37 ккал/моль, что уже сопоставимо со скрытой теплотой парообразования. Таким образом, известное на протяжении всей истории физиологии клетки явление «непроницаемости клеточной мембраны» для сахарозы оказалось предсказуемым и объяснимым с более простых позиций наших представлений о физическом состоянии воды в клетках.

5. Почему величина параметра q для ионов натрия в клетках ниже, чем в экстравертных моделях?

Теперь, вооруженные количественной теорией вытеснения веществ (уравнение АЗ приложения), вновь попытаемся ответить на вопрос, заданный в разделе 11.3, п. 3: почему в мышечных волокнах лягушки величина q для солей натрия гораздо ниже, чем в растворе экстравертной модели, или даже в коацервате? Мы только что выяснили, что, согласно нашей теории, основным термодинамическим фактором, определяющим значение q вещества, является *напряжение вытеснения* ($U_{\text{вр}}$).

Мышечное волокно лягушки на 20% состоит из белков. Значение q для хлорида натрия в мышечном волокне лягушки составляет приблизительно 0,15 (см. рис. 54). Величина q для сульфата натрия в растворе желатина той же концентрации (20%) составляет 0,85 (кривая 1 на рис. 22В), а в коацервате желатина — 0,7 (кривая 2 на рис. 22В). Соответственно, напряжение вытеснения ($U_{\text{вр}}$) в растворе желатина составляет 16,5 кал/моль [168, р. 166], тогда как в мышечном волокне — в 7,6 раз больше, 126 кал/моль [156, р. 196].

Значение $U_{\text{вр}}$ в коацервате желатина пока неизвестно. Но можно предположить, что оно находится где-то между 16 и 126 кал/моль. Простая экстраполяция дает значение около 40 кал/моль. Пусть и *весьма* приближительная, такая величина позволяет все же предположить, что при переходе обычного раствора желатина в коацерват в границах коацервата существенно увеличивается доля многослойной поляризованной воды (из-за консолидации белкового матрикса), для которой, как мы говорили, характерны более прочные водородные связи, чем в обычной воде. Увеличение плотности упаковки белковых молекул в коацервате может достигаться в результате их ассоциации «бок о бок», что сопровождается слиянием их водных оболочек, возникновением более многочисленных слоев поляризованной воды. В клетках упаковка белков может быть значительно более плотной. В результате увеличения доли структурированной воды в коацервате величина q для растворенных веществ, особенно для крупных молекул, снижается. Эта тема поднималась в разделе 11.3, п. 3.

Однако не следует забывать, что цифры, полученные экстраполяцией, весьма приблизительны. Серьезная проверка новой теории коацервации, оценка роли плотной упаковки белковых цепей, поляризующих воду, еще предстоит.

6. *Ответ Арчибальду Хиллу на его аргумент в пользу свободной воды и K^+ в клетке*

Две работы Арчибальда Хилла, опубликованные в 1930 году (одна из них в сотрудничестве с П. С. Купаловым), нанесли сокрушительный удар по протоплазматическому направлению в физиологии клетки [81] в пользу мембранного. Продемонстрировав, что мочевины (а позже, и этиленгликоль) равномерно распределяются между водой мышечных волокон лягушки и водой среды, и что давление водяного пара над мышцей лягушки равно таковому над изотоническим раствором NaCl, они убедили многих влиятельных цитофизиологов в том, что клеточная вода, а вместе с ней и K^+ находятся в свободном состоянии (см. гл. 5 и 7).

Однако ценность этих данных как свидетельств в пользу двух основных принципов мембранной теории (свободное состояние K^+ и воды) целиком зависит от той концепции, которую Хилл хотел опровергнуть, а эта концепция выглядела тогда так: *связанная вода вообще ничего не растворяет*. Если же взгляд на клеточную воду как на «ничего не растворяющую» был ложен изначально, то все, что удалось Хиллу — это опровергнуть заблуждение. Проблема, таким образом, сводится к одному вопросу: является ли ложным представление о клеточной воде как о растворителе, который ничего не растворяет?

Рис. 26 и 27 наглядно демонстрируют, что внутриклеточная вода хорошо растворяет одни вещества, и плохо — другие. Значения q для мочевины и этиленгликоля, — тех самых веществ, которые исследовал Хилл и др., — близки к единице (1,05 и 1,02, соответственно) [156], что и объясняет полученные Хиллом с соавторами результаты, исходя из которых они сделали свои скоропалительные выводы. Однако распределение других веществ прошло мимо их внимания: значения q для сахарозы и NaCl, полученные для той же клеточной воды, значительно меньше единицы.

Это различие величин q для разных веществ, как мы уже знаем, подчиняется «правилу размера»: чем больше молекулярный объем, тем меньше значение q . Однако молекулы мочевины и этиленгликоля не только меньше молекулы сахарозы и гидратированного Na^+ , они еще и идеально встраиваются в структуру растворителя благодаря особенностям строения их молекул, и прочно в ней удерживаются (раздел 11.3, п. 4, рис. 29). Иными словами, небольшой размер и высокая энергия поверхностной поляризации (U_s) увеличивают значение q для этих веществ до единицы и выше, когда уже следует говорить о ρ (рис. 26 и 27), что означает, что и обычная вода, и поляризованная являются для них одинаково хорошими растворителями.

Дополнительные свидетельства в пользу такого взгляда были получены в опытах с равновесным распределением двух меченых веществ (одно было мечено ^3H , а другое — ^{14}C) между экстравертной моделью (диализный мешок с денатурированным белком) и средой. Так, усредненные коэффициенты распределения (q) мочевины, меченой тритием, и сахарозы, меченой по углероду, между растворами десяти белков, предварительно денатурированных мочевиной, и средой оказались разными: $1,006 \pm 0,008$ и $0,732 \pm 0,019$, соответственно [175, р. 28]; оба эти коэффициента определяли с использованием одного и того же диализного мешка с тем или иным денатурированным белком. Результат, полученный для меченого тритием этиленгликоля, оказался таким же, что и для мочевины: коэффициент его распределения между раствором денатурированного NaOH бычьего гемоглобина оказался равным 0,998, тогда как для меченой сахарозы — всего 0,627 (рис. 24).

Итак, демонстрация Хиллом равномерного распределения мочевины и этиленгликоля между клеткой и средой сокрушила бытовавшее тогда среди приверженцев цитоплазматического подхода заблуждение, будто бы клеточная вода совершенно не способна растворять что-либо. Но эти опыты вовсе не доказывают, что вся клеточная вода является обычной водой и, соответственно, что клеточный K^+ находится в свободном состоянии (читатель, ознакомившийся с разделами 10.2, п. 3 и 11.3, п. 4, мог уже догадаться, как связаны между собой состояние воды и K^+ в клетке).

Отметив ошибочность идеи «ничего не растворяющей» клеточной воды, спешу добавить, что с этой неудачной идеей связана лишь небольшая часть работ Росса Гортнера и его коллег, посвященных свойствам воды в коллоидах и в клетках. В этом можно убедиться, ознакомившись со статьей [80] и особенно [64]. Эта ошибка не может бросить тень на честность и мастерство исследователя, чего не скажешь о нередких случаях, когда ошибку признать не желают или не понимают ее истоков.

7. Осмотическая регуляция объема клетки

А теперь вернемся в XVIII век, к тому вопросу, с которого берет свое начало физиология клетки — а именно, к вопросу о регуляции клеточного объема. Как мы уже знаем, вещества, проникающие через мембрану, способны, вопреки мембранной логике, вызывать *стойкое* сжатие клетки в гипертонических растворах (рис. 2), а значит, механизм регуляции объема, предложенный Вант-Гоффом и Пфедфером, основанный на идее абсолютной непроницаемости мембраны для сахарозы, хлорида натрия и других осмотически активных веществ, оказался несостоятельным. Ниже я расскажу о новом механизме регуляции клеточного объема, основанном на теории МОПВ.

Одно время была весьма популярна *теория бомбардировки* Вант-Гоффа (см. [3] и гл. 3 здесь). В конце концов, было доказано, что она неверна (13, р. 664—670). Как известно, осмотическое

давление раствора нелетучего вещества связано с давлением пара растворителя следующим уравнением [13, p. 668—669]:

$$\pi V_1 = RT \ln(p^\circ/p), \quad (2)$$

где π , как и в уравнении (1), — осмотическое давление, V_1 — парциальный молярный объем нелетучего вещества в растворе (растворитель в данном случае — вода), R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, p° — давление насыщенного пара чистого растворителя, p — давление насыщенного пара растворителя над раствором. *Крушение теории бомбардировки, установление связи между осмотическим давлением и давлением водяного пара означает, что механизм регуляции объема клетки необходимо искать в самой клеточной воде, а не в гипотетических свойствах мембраны, принимающей на себя удары молекул растворенных веществ.*

Поскольку величина p°/p , обратная величине относительного давления пара (p/p°), является мерой *активности* воды, значит, осмотическая активность сахарозы, NaCl и других веществ объясняется тем, что они понижают *активность* воды, а не бомбардируют полупроницаемую клеточную мембрану. В 0,7% растворе NaCl мышечные волокна лягушки сохраняют свой обычный объем потому, что ионы Na^+ и Cl^- , концентрация каждого из которых составляет 0,118 моль/л, понижают давление пара над раствором до физиологического давления пара над живой тканью, а именно до 99,64% от давления пара над чистой водой.

При этом возникает новый вопрос: что внутри клеток играет роль противовеса ионам изотонического раствора NaCl или раствора Рингера, уравнивающего парциальное давление пара внутри- и внеклеточной среды?

7.1. Что снижает активность воды в клетке до активности воды раствора Рингера?

Когда в 1896 году Юлиус Катц сообщил, что мышцы позвоночных содержат большое количество ионов K^+ и фосфатов [75], многие решили, что именно эти компоненты и являются главными «осмотически активными» составляющими клеток, в том числе и мышечных [44].

Однако рассмотренные нами в разделе 10.2 данные почти не оставили сомнений в том, что основная масса клеточных ионов K^+ и анионов (например, АТФ [287], креатинфосфата [310]) *адсорбированы* (см. также у Ментен [378] свидетельства локализованной адсорбции хлоридов и фосфатов в мышцах). Адсорбированные ионы не могут понижать активность воды, в отличие от *свободных*. Значит, эту роль в клетке выполняет что-то другое. И это «что-то», согласно теории АИ, — в первую очередь *полноразвернутые* внутриклеточные белки. *Поляризуя и ориентируя воду внутри клетки, они понижают ее активность или, что то же, — относительное давление пара.*

Следовательно, *экстравертные модели, воспроизводящие свойства постулированных полноразвернутых белков клетки, адсорбирующие и поляризующие внутриклеточную воду* (раздел 11.2), должны адсорбировать столько воды при физиологическом давлении пара, сколько это необходимо для достижения физиологического парциального давления пара, характерного для внутриклеточной среды.

Однако наши ожидания, что количество адсорбированной макромолекулами воды будет столь большим, как этого требует наш подход, резко противоречат традиционным взглядам на количественные характеристики гидратирования белков.

Как известно, мышца лягушки на 20% состоит из белков, и на 80% — из воды. Если вся эта вода адсорбируется *всеми* белками клетки, то один грамм сухого белка в среднем должен адсорбировать 4,0 грамма воды, что намного больше общепринятых значений — 0,2—0,3 грамма воды на грамм сухого белка [155, p. 673—674].

Чтобы внести ясность, нам пришлось опытным путем определить, сколько же воды адсорбируется на самом деле экстравертными моделями, такими как желатин и ПЭО, в состоянии диффузионного равновесия при физиологическом давлении пара. Как вы, наверное, еще помните, Енё Эрнст уже предпринимал некоторые шаги в этом направлении, сравнивая сорбцию воды мышцами лягушки и желатином. Однако необходимо обратить внимание на то, что он и его коллеги работали при относительном давлении пара много ниже физиологического, так что их результаты мало нам помогут. А изучение сорбции воды при физиологическом давлении пара сопряжено с техническими трудностями.

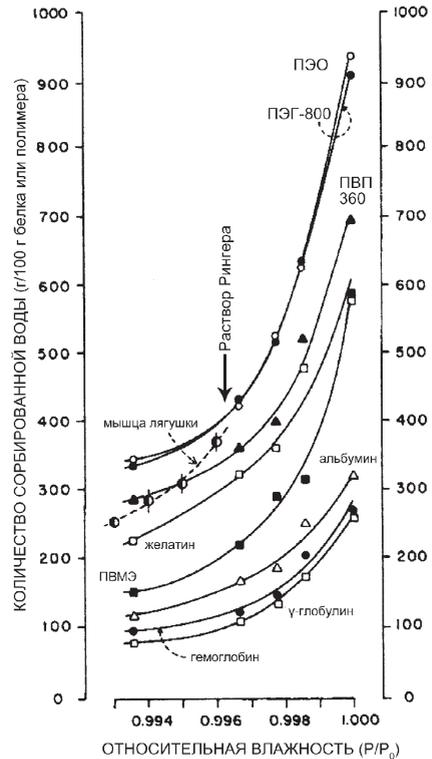
Хотя исследование сорбции воды изолированными белками уже давно стало привычным делом, пределом относительного давления пара для большинства экспериментов остается лишь 95% насыщения [192]. При этом в растворе Рингера (и в клетках лягушки, находящейся с ним в равновесии) относительное давление пара гораздо ближе к насыщению пара чистого растворителя и равно 99,64%. Несущественная, казалось бы, разница между давлением пара 95% и 99,64% (4,64%) оказывается на самом деле весьма значительной для исследований такого рода. Так, при давлении пара 95% от насыщения равновесное содержание воды в мышечном волокне лягушки составляет лишь 0,88 грамм на грамм сухого веса против 4,0 грамм на грамм сухого веса при давлении пара над раствором Рингера — 99,64% от равновесного давления пара чистой воды [159], то есть волокно обезвожено почти на 80% (!).

Признаться, до выхода в 1987 году статьи Линга и Ху [163] нам было известно лишь две публикации о гидратации биоматериалов при равновесном давлении пара чистой воды или при близких к этому пределу значениях. Я имею в виду опыты Спикмена с овечьей шерстью и другими материалами, опубликованные в 1944 [193], а также опыты Юлиуса Катца на различных биоматериалах, опубли-

ликованные еще в 1919 году [194]. Несмотря на огромную важность для физиологии таких экспериментов, немногие решались проводить их — очевидно, по причине медленного установления равенства давления пара между объектом и раствором с физиологическим равновесным давлением пара.

Действительно, опыты Юлиуса Катца продолжались месяцами, но и этого времени оказалось недостаточно. Линг и Ху [163] показали, что даже по истечении 319 суток при относительном давлении пара 0,99858 от насыщения над чистым растворителем масса экстравертной модели — поливинилпирролидона (ПВП-360) — продолжала расти. Чтобы решить эту проблему, Линг и Ху предложили новый

Рис. 30. Равновесная сорбция воды пятью экстравертными (желатин, ПЭО — полиэтиленоксид, ПВП-360 — поливинилпирролидон, ПВМЭ — поливинилметилловый эфир, ПЭГ-800 — полиэтиленгликоль) и тремя интравертными моделями (нативный бычий сывороточный альбумин, нативный бычий гемоглобин и нативный бычий γ -глобулин) при 25 °С. Данные получены методом «нулевой точки», предложенным Лингом и Ху [163] (см. текст). Стрелкой указано значение *относительного давления пара* нормального раствора Рингера (0,9966). Пунктирная кривая соответствует равновесной сорбции воды мышцами лягушки по данным Линга и Негенданка [159]. (По Лингу и Ху [163]).



метод. Названный *методом нулевой точки*, он уменьшил длительность каждого опыта до 5 дней и позволил нам получить следующие данные.

На рис. 30 показано, что при относительном давлении пара над раствором Рингера (0,9964) экстравертные модели ПЭО, ПЭГ-800, ПВП-360 и желатин сорбируют от 300 до 400 и более грамм воды на 100 грамм полимера или белка, что близко к физиологическим 400 граммам воды на 100 грамм белков мышц лягушки (пунктирная

линия на рис. 30). Даже *интровертные* модели, такие, как нативный гемоглобин и бычий сывороточный альбумин, связывают в этих условиях от 90 до 150 грамм воды на 100 грамм белка, или 0,9—1,5 грамм воды на грамм белка, что значительно выше цифр, получивших распространение в литературе (0,2—0,3 г/г) [155, р. 673].

Ни в одном опыте на экстравертных или интровертных моделях *in vitro* не было сделано попыток выстроить молекулы белка или полимера параллельно друг другу, кроме эксперимента с ПВП, проиллюстрированного на врезке к рис. 22. Остальные же полимеры и белки не были организованы *параллельно*, поэтому их состояние существенно отличалось от тех параллельно организованных полноразвернутых белков в клетках, существование которых постулирует теория МОПВ. Параллельная ориентация усиливает поляризацию воды и увеличивает число ее слоев, что доказано опытным путем в п. 3 этого раздела. Именно это усиление поляризации и ориентации воды при упорядочении белков могло бы еще более приблизить содержание воды в экстравертных моделях (3,0—4,0 грамм на грамм белка или полимера) к содержанию воды в мышечных волокнах лягушки (4,0 грамма на грамм клеточного белка) (рис. 30).

Подтвердив экспериментально предположение, что желатин и другие экстравертные модели способны оказывать существенное влияние на активность воды, приближая ее к активности воды, связанной постулируемыми полноразвернутыми экстравертными белками клеток, я хотел бы ответить на другой вопрос: можно ли на диализных мешках с растворами экстравертных моделей продемонстрировать *in vitro* набухание или сжатие, поместив их в раствор веществ, для которых их мембрана *проницаема*. Успех подобной демонстрации объяснил бы сразу два явления, которые оказались не способна объяснить теория мембранного насоса: как клетки могут оставаться набухшими или сжавшимися в растворах ионов или иных веществ, для которых их мембрана полностью проницаема (раздел 4.1, п. 3, рис. 2), и почему вырезанные из мышцы сегменты набухают в гипотонических растворах также, как и неповрежденные клетки, хотя поверхности срезов лишены мембран [98, р. 246; 296].

7.2. *Обратимое осмотическое сжатие содержимого диализных мешков с растворами экстравертных моделей, погруженных в концентрированные растворы веществ, для которых их мембрана полностью проницаема*

Один из основных принципов мембранной теории гласит: лишь вещества, не проникающие через мембрану, способны вызвать стойкое сжатие клетки. Насонов, Айзенберг и Камнев это опровергли. Еще раньше Мартин Фишер продемонстрировал набухание и сжатие кусочков желатина и фибрина, не обладающих мембраной [78; 546].

Теория МОПВ пошла еще дальше: она не только предложила физическое объяснение, почему желатин ведет себя подобно клетке (раздел 11.2, п. 2), но и дала количественную молекулярную теорию

равновесного объема как желатина, так и клетки (уравнение A12 в приложении).

Согласно теории МОПВ, стойкое сжатие клетки под действием концентрированного раствора вещества, проникающего в нее, является результатом сочетанного действия трех противоборствующих факторов:

1) перманентная способность клеточных белков адсорбировать новые и новые слои воды, вызывая набухание;

2) образование в клеточных белках внутри- и межмолекулярных солевых связей, сдерживающих набухание;

3) низкая растворяющая способность внутриклеточной воды, благодаря которой в ней меньше осмотически активных веществ (Na^+ и Cl^- и других свободных компонентов), чем в среде. За счет этого фактора активность клеточной воды оказывается выше, чем снаружи (в гипертоническом растворе), и в результате она начинает оттекать во внешнюю среду — клетка начинает сжиматься. Согласно «правилу размера», можно предположить, что чем крупнее молекула основного осмолита (осмотически активного вещества), тем сильнее должна сжиматься клетка.

На рис. 22 показано, что растворимость сульфата или цитрата натрия в воде диализного мешка с ПВМЭ снижена. Как показали другие опыты, полиэтиленоксид (ПЭО) ведет себя точно так же. Если же переместить диализный мешок с ПЭО из раствора цитрата натрия одной концентрации (после установления диффузионного равновесия) в раствор более низкой или более высокой концентрации, содержимое мешка соответственно увеличится в объеме или уменьшится, и будет оставаться в таком состоянии, несмотря на то, что его мембрана полностью проницаема для цитрата натрия (рис. 31). Следовательно, ссылка на непроницаемость мембраны для цитрата натрия не может служить объяснением *стойкого* сжатия содержимого мешка, которое вызывает более концентрированный омывающий раствор этой соли. Это противоречит мембранной теории, настаивающей в таких случаях на непроницаемости мембраны, зато полностью соответствует поздним наблюдениям Хёффлера [31], а также Насонова, Айзенберга и Камнева [33, 34] (раздел 4.1, п. 2 и 3).

Все, что делает мембрана диализного мешка — препятствует выходу ПЭО в окружающую среду. Способностью обратимо набухать и сжиматься обладали все исследованные экстравертные модели, в частности, желатин, а также денатурированный мочевиной и NaOH бычий сывороточный альбумин [161]. В других экспериментах показано, что незаряженные вещества — D-глюкоза и D-сорбит — способны влиять на объем растворов экстравертных моделей так же, как и цитрат натрия [161]. Теперь, когда мы предоставили обширные (хотя и косвенные) свидетельства тому, что некоторые или все белки мышц лягушки, эритроцитов и, судя по всему, остальных клеток находятся в полноразвернутой конформации (раздел 11.3, п. 4),

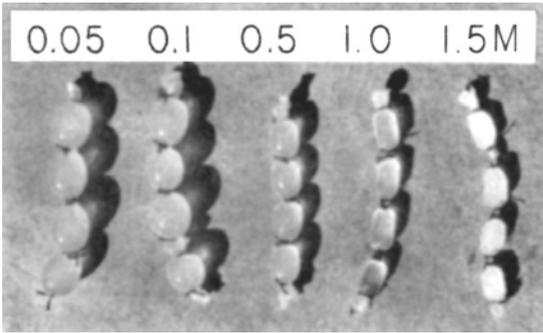


Рис. 31. Стойкое обратимое набухание и сжатие содержимого диализных мешков, заполненных раствором полиэтиленоксида (ПЭО) с начальной концентрацией 30%, после инкубации в растворах цитрата натрия (концентрации указаны на рис.). ПЭО — это нейтральный полимер и его набухание и сжатие нельзя объяснить электростатическими взаимодействиями, например, эффектом Доннана. (По Лингу [15]).

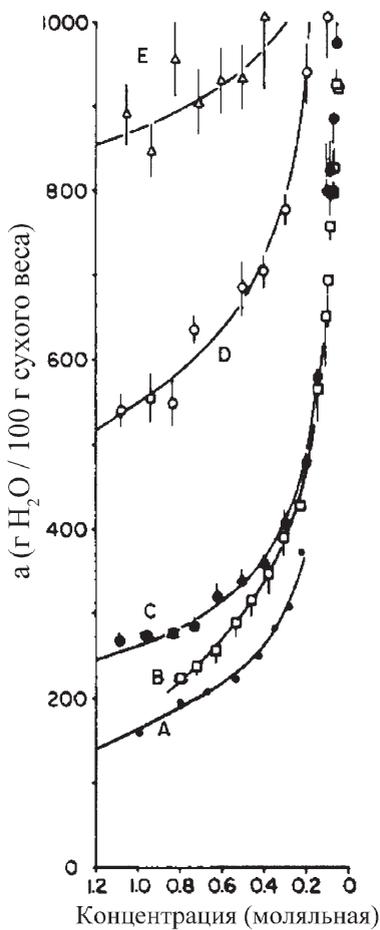


Рис. 32. Содержание воды в мышцах лягушки (а), находящейся в равновесии с растворами различных сахаров и спиртов (25°C) в концентрациях (в молях на кг растворителя), указанных на оси абсцисс (за исключением кривой А). А — равновесное содержание воды в мышце, подвешенной во влажном воздухе, в зависимости от парциального давления водяного пара, регулировавшегося растворами NaCl или серной кислоты различной концентрации [159]; точки этой кривой стоят над теми концентрациями сахаров, которые дают те же значения давления водяного пара, что и давление водяного пара во влажном воздухе [159] (в случае кривой А ее точки привязаны к соответствующим концентрациям сахарозы). В — D-маннит, С — эритрит, D — глицерин, Е — этиленгликоль. (По Лингу [195]).

мы можем объяснить осмотическое сжатие мышц лягушки в концентрированных растворах сахарозы и галактозы, наблюдавшееся Насоновым, Айзенбергом и Камневым.

В отличие от мышц и экстравертных моделей, диализные мешки с раствором *нативного* бычьего сывороточного альбумина — *интровертной* модели — в концентрированных и разбавленных растворах цитрата натрия своего объема не меняют [161], что также полностью согласуется с теорией МОПВ.

До сих пор мы рассматривали то, что традиционно называется осмотическим набуханием и сжатием, и как при этом взаимодействуют два из трех вышеупомянутых факторов — первый и третий. В разделе 15.3 я расскажу, как можно влиять на объем клетки воздействием на фактор номер два — сдерживающую силу солевых связей.

Я уже говорил, как теория МОПВ позволила мне вывести уравнение равновесного связывания воды клеткой, позволяющее рассчитывать содержание воды в ней (параметр «а») в граммах на 100 грамм сухого белка (уравнение А17 в приложении). Это уравнение не только объяснило наблюдения Насонова, Айзенберга и Камнева [33, 34], согласно которым вещества, проникающие через мембрану способны, тем не менее, вызывать сжатие клеток и удерживать их в этом состоянии [195], но и явилось хорошим аналитическим выражением эмпирических зависимостей, описывающим равновесное содержание воды в клетках (все тот же параметр «а»), погруженных в растворы проникающих через мембрану веществ с различными значениями коэффициента распределения q (рис. 32). В высоких концентрациях вещества с низким значением коэффициента q , такие как сахароза и NaCl, вызывают сжатие клетки, заставляя воду выходить из нее. Вещества же, подобные этиленгликолю, для которых характерны коэффициенты q , близкие к 1, напротив, заставляют клетку поглощать воду, в результате чего ее вес становится больше, чем исходный в растворе Рингера или тканевой жидкости. Обратите внимание, что зная значение параметра «а» (уравнение А17) и остальных параметров, полученных с помощью уравнения А13 (приложение) можно легко вычислить *общий объем* не только клеточной воды, но и самой клетки.

Оценив принципиальные положения имеющихся альтернатив мембранной теории, — от теории Бенджамина Мура до ТФЗЛ и теории МОПВ, — продолжим наш разговор о теории натриевого насоса и о мембранных насосах вообще, прерванный в разделе 4.3.