

Глава 3

ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ КЛЕТКИ

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

3.1. ПРОНИЦАЕМОСТЬ И ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

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

3.1.1. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ

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

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

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

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

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

Одним из наиболее адекватных способов исследования проницае-

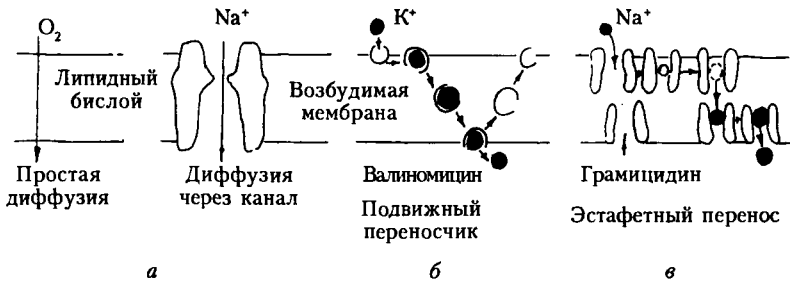
мости клетки является *метод меченых атомов*, который позволяет с помощью радиоактивных и стабильных изотопов исследовать перераспределение и транспорт ионов и различных веществ. Исследуемое вещество «метят», включая в его молекулы радиоактивные атомы. Если данное вещество представлено атомами или ионами,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

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

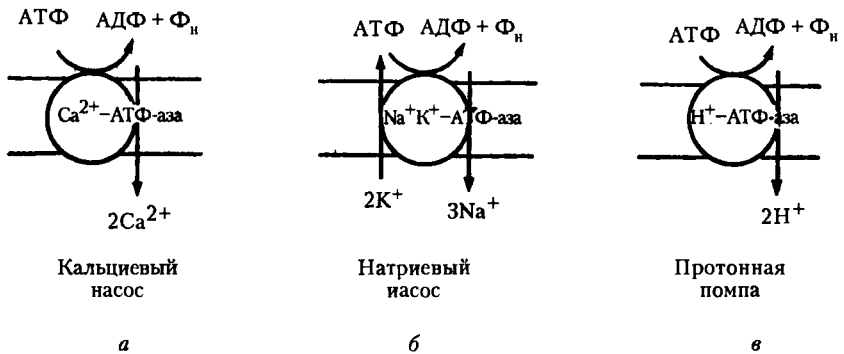
Большая часть имеющихся на сегодня сведений о механизмах движения ионов через биологические мембраны, генерации биоэлектрических потенциалов, распространении возбуждения была получена именно с помощью метода меченых атомов.

3.1.2. ПАССИВНЫЙ И АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

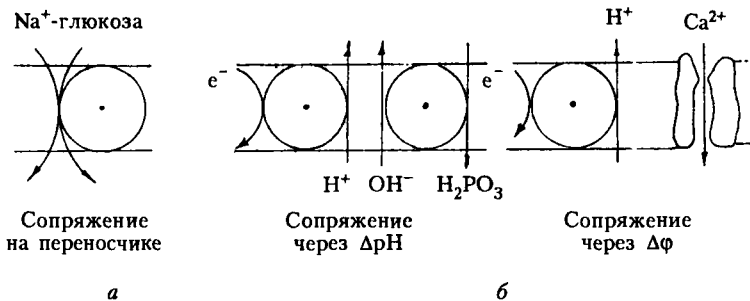
Поступление нейтральных молекул и ионов в клетку осуществляется за счет пассивного и активного транспорта. Пассивный транспорт не связан прямо с затратой химической энергии; он осуществляется в результате диффузии веществ в сторону меньшего электрохимического потенциала. Активный транспорт происходит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



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



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



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

3.1.2.1. Пассивный транспорт

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

Диффузия

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

Различают несколько видов диффузии:

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

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

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

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

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

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

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

Диффузия осуществляется в следующих основных случаях:

— перенос ионов или вещества в перемешиваемых слоях вблизи мембраны;

— транспорт неэлектролитов (газов) через мембрану.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$J = J_{\max} S_{\text{нар}} / K_m + S_0,$$

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

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

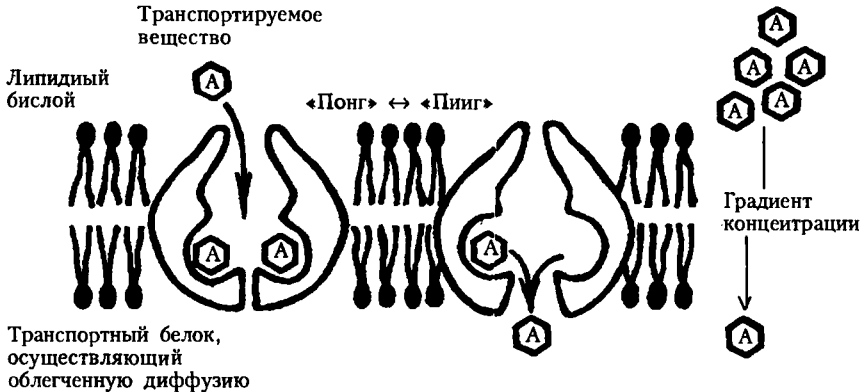
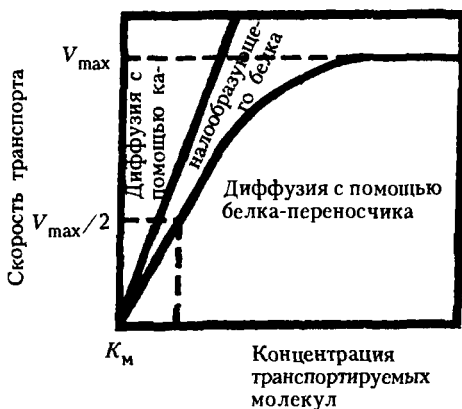


Рис. 3.4. Схема одного из вариантов облегченной диффузии. Белок может существовать в двух различных конформационных состояниях: «понг» — когда участки для связывания переносимого вещества А открыты с наружной стороны бислоя; «пинг» — когда те же участки открыты с другой стороны. Этот процесс полностью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

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



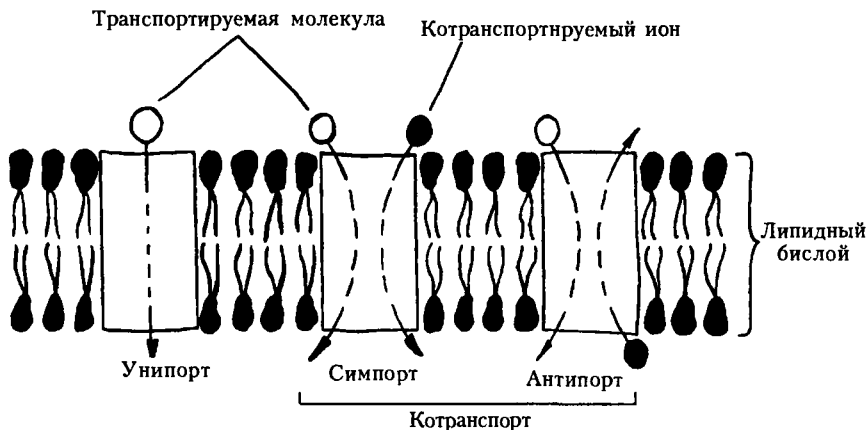
В настоящее время природа молекул-переносчиков, облегчающих диффузию, неясна, хотя ряд авторов предполагают, что это комплексы, растворимые в липидах клеточной мембраны. Особенности кинетики проникновения веществ с помощью переносчиков указывают на ее сходство с каталитическим процессом, аналогичным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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

Особенности транспорта лактозы с участием лактопермеазы достаточно хорошо изучены.

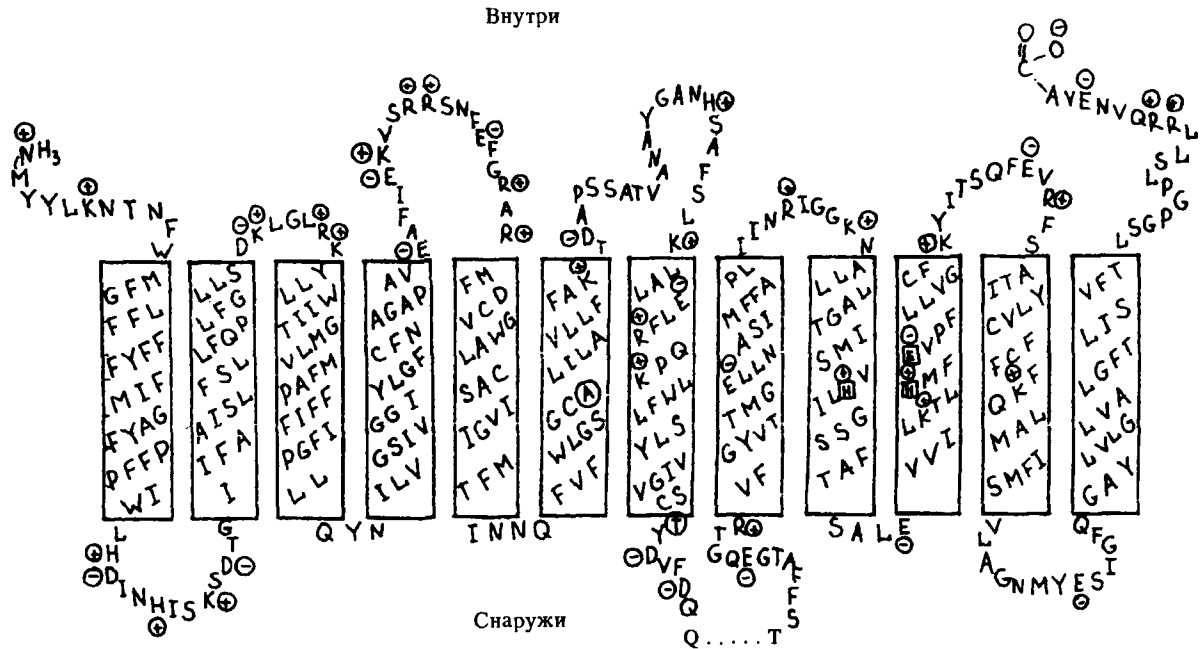


Рис. 3.7. Аминокислотная последовательность Р⁺-лактопермеазы из *E. Coli*. Аминокислотные остатки, заключенные в круги, определяют субстратную специфичность (специфичность связывания сахара), а остатки, заключенные в квадратики, участвуют в сопряжении протонирования и транспорта лактозы

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

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

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

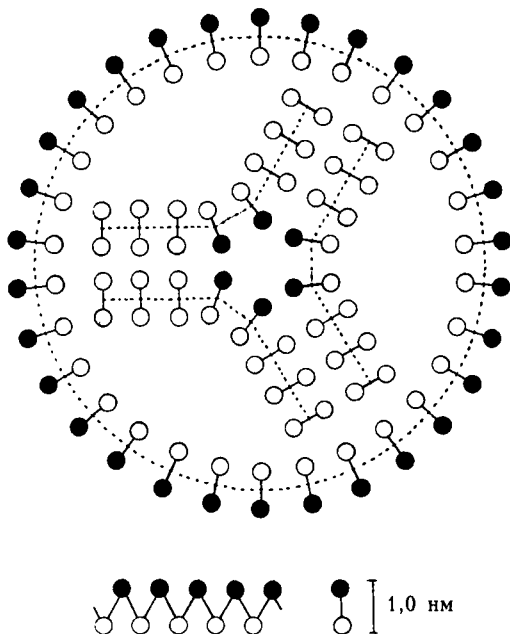


Рис. 3.8. Модель поринового тримера (вид сверху); каждая субъединица содержит пору, внутренняя поверхность которой образована остатками гидрофильных аминокислот. Каждая «гантелька» — это β -цепь из чередующихся гидрофильных (светлые кружки) и гидрофобных (темные кружки) остатков. Сплошные линии — границы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

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

В 1960-х гг. были обнаружены *ионофоры* — небольшие гидрофобные молекулы, способные растворяться в липидных бислоях и повышать их проницаемость для ионов. Многие ионофоры синтезируются микроорганизмами и обладают свойствами антибиотиков (транспортные антибиотики). Различают два класса ионофоров — подвижные переносчики ионов и каналообразующие ионофоры.

Ионофоры первого класса переносят ионы через углеводородную область мембраны, и их активность связана с собственной диффузией через мембрану. К этой группе принадлежат валиномицин, нигерицин, нонактин, кальциевые ионофоры — A_{23187} и иономицин (рис. 3.9). Ко второй группе транспортных антибиотиков относятся каналообразователи, формирующие канал, который пронизывает мембрану. В начале транспорта ион входит в него на одной стороне мембраны, диффундирует по нему и выходит на другой. Стимуляция транспорта ионов по этому механизму не связана с движением (латеральная диффузия) самого антибиотика-каналообразователя в мембране. К этой

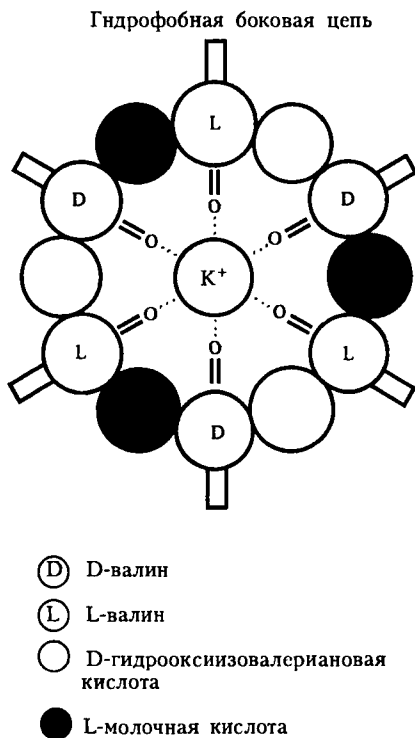


Рис. 3.9. Молекула валиномицина, связанная с расположенным в центре кольцевой структуры ионофора ионом К с помощью атомов кислорода

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

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

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

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

Осмоз и фильтрация

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

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

$$\pi = iRTC,$$

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

Гидравлическая проводимость мембраны в данном случае определяется из соотношения

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

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

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

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

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

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

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

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

Поступление воды в клетку связано с набуханием последней и

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

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

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

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

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

Механизмы транспорта ионов и веществ в клетку

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

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

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

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

- проницаемость клеточных мембран для органических молекул уменьшается по мере повышения в последних количества функциональных групп (гидроксильных, карбоксильных и аминных);

- проницаемость клеток для органических молекул возрастает по мере роста в последних числа метиловых, этиловых и фенильных групп.

Существуют, однако, вещества, поведение которых не подчиняется

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

— гидрофильный, когда молекула воды проходит сквозь поры, сформированные интегральными белками мембраны;

— связанный с возникновением кинков — лабильных структур в углеводородной области мембраны.

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

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

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

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

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

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

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

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

Согласно электростатической теории энергия переноса иона определяется по формуле

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

где P — коэффициент проницаемости.

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

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

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

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

3.1.2.2. Активный транспорт

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Na, K-АТФ-аза

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

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

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

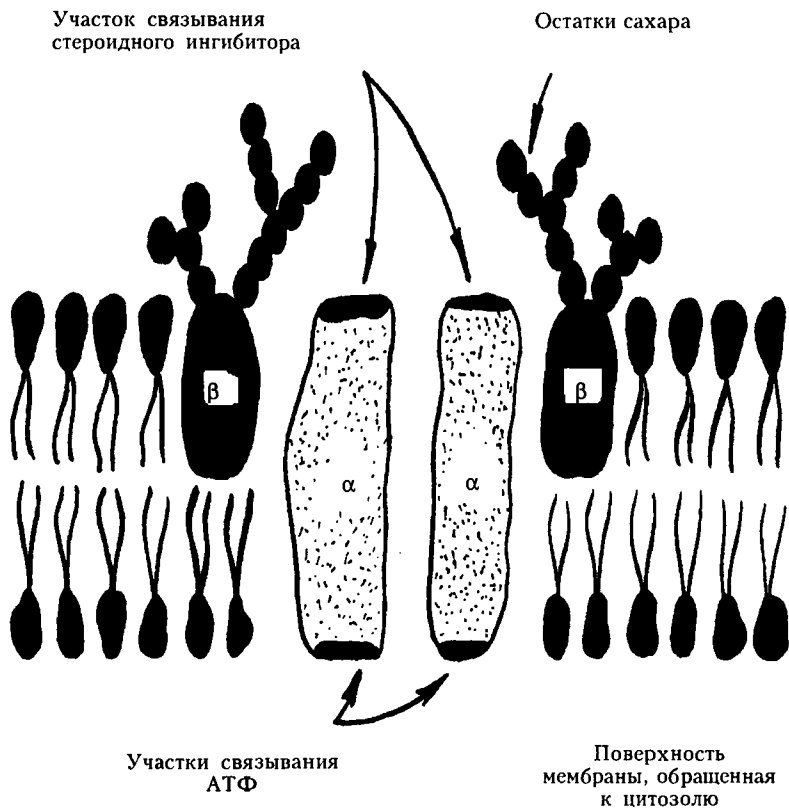


Рис. 3.10. Схематическое изображение субъединичной структуры Na, K -насоса (α - и β -субъединицы)

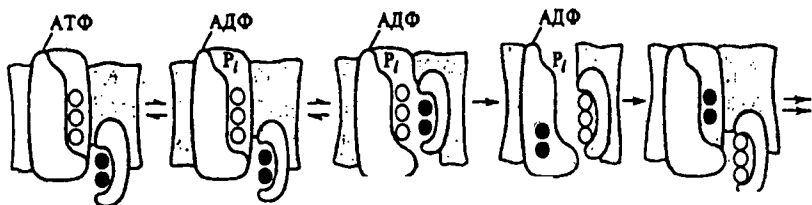
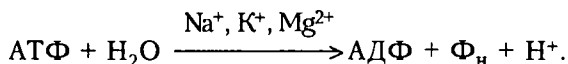


Рис. 3.11. Схема работы Na, K -АТФ-азы

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



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

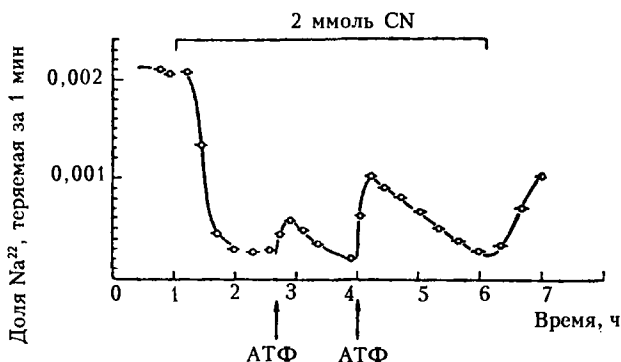


Рис. 3.12. Влияние введения АТФ на выход натрия из аксона, отравленного цианидом. После первого введения концентрация АТФ в аксоне повысилась до 1,2 ммоль, а после второго — до 6,2 ммоль

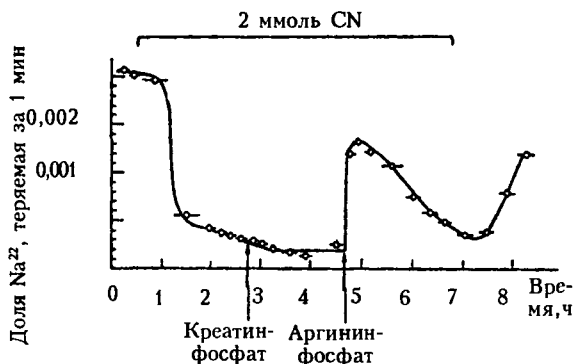
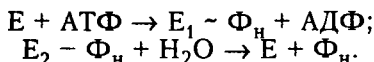


Рис. 3.13. Влияние последовательного введения креатинфосфата и аргининфосфата на выход натрия из аксона, отравленного цианидом. Средняя концентрация креатинфосфата сразу же после введения была равна 15,3 ммоль, а средняя концентрация аргининфосфата — 15,8 ммоль

ходит гидролиз фосфорилированного промежуточного продукта $E - \Phi_n$. Для процесса дефосфорилирования не требуется ни ион Na , ни ион Mg :



В процессе функционирования насос принимает по крайней мере две разные конформации — E_1 и E_2 . Всего же в транспорте ионов Na , K и сопряженном с ним гидролизе ATP участвуют не менее четырех

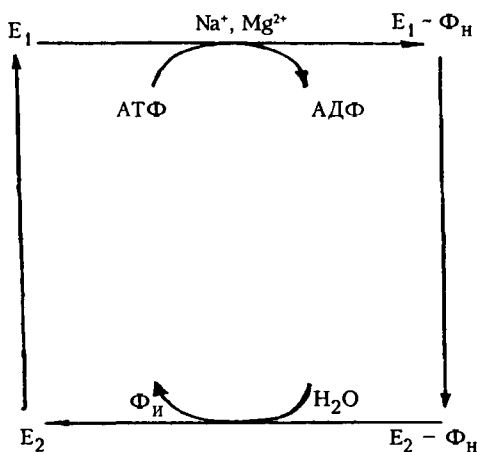


Рис. 3.14. Схема работы Na , K -АТФ-азы во время активного транспорта

конформационных форм фермента: E_1 ; $E_1 \sim \Phi_n$; $E_2 \sim \Phi_n$; E_2 (рис. 3.14). Несмотря на большое количество данных о структуре Na , K -насоса, механизм его действия изучен недостаточно. Особый интерес вызывает модель, в соответствии с которой к структуре белка предъявляются следующие требования:

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

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

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

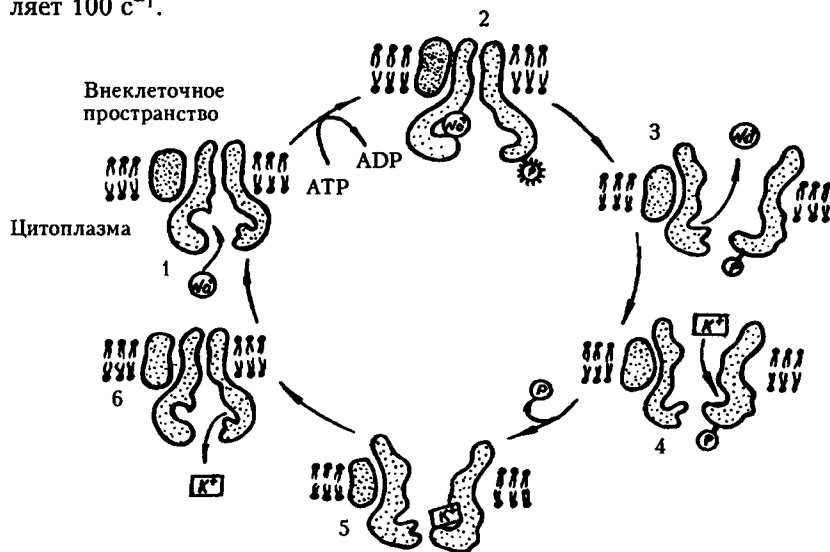


Рис. 3.15. Модель функционирования Na, K-АТФ-азы.

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

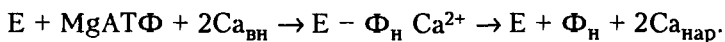
Особенно важно то, что действие Na, K-АТФ-азы обратимо, и в модельной системе фермент может синтезировать АТФ из АДФ и P_n .

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

Ca-АТФ-аза

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

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



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

K, H-АТФ-аза

K, H-АТФ-аза слизистой оболочки желудка и кишечника нечувствительна к оуабаину, ионам Na и бикарбонату, но ингибируется фто-

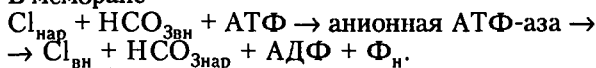
ридом, дициклогексилкарбодиамидом, N-этилмалеимидом, Zn^{2+} и Ba^{2+} , а оптимальный pH равен 7,5. В процессе гидролитического цикла фермент образует фосфорилированный интермедиат, который быстро распадается под влиянием иона K и более стабилен при его отсутствии. В замкнутых мембранных препаратах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

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

В цитоплазме



В мембране



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

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

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

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

Таблица 3.1

Транспортные АТФ-азы

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

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

Хемиосмотическая теория Митчелла

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

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

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

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

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

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

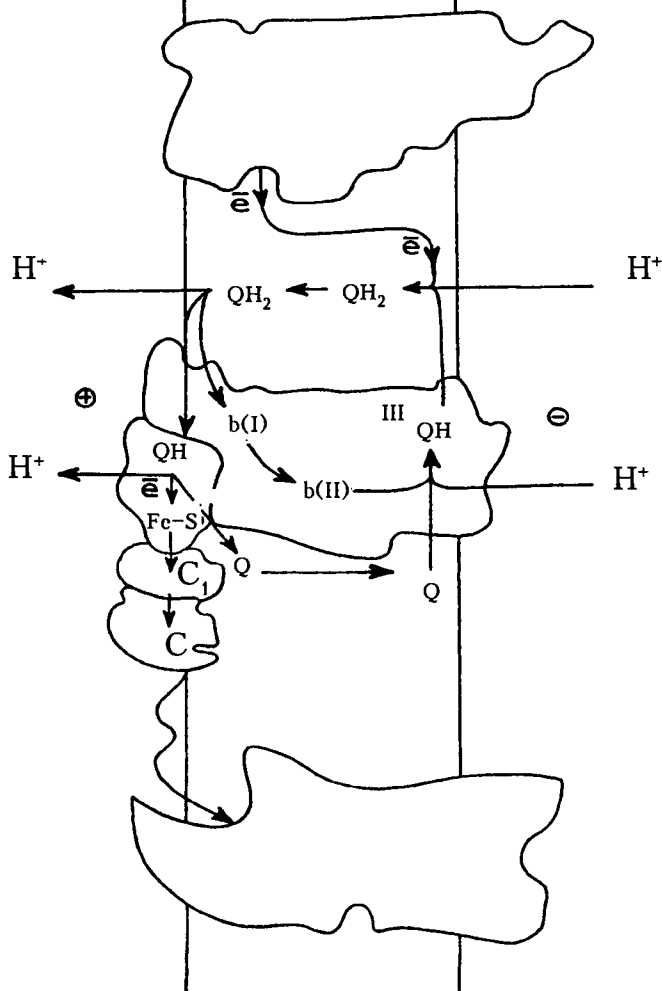
Суммарный результат процесса контролируемого окисления водорода кислородом заключается в том, что перегородка окажется заряженной и возникнет градиент концентрации протона. Именно за счет тока протонов работает молекулярный механизм, синтезирующий АТФ.

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

Межмембранное пространство

Внутренняя мембрана

Матрикс



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