

тронной плотности и конформационных смещений окружающей среды. Такие представления особенно важны в применении к мембранам митохондрий и хлоропластов, в которых осуществляется электронный транспорт (см. гл. 6, 7).

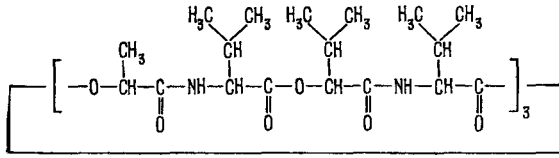
§ 3.9. ИНДУЦИРОВАННЫЙ ИОННЫЙ ТРАНСПОРТ

Очень важную информацию об ионном транспорте и устройстве проницаемых мембран дают исследования явлений, происходящих при перемещении ионов внешними переносчиками. В § 3.3 рассмотрена общая феноменологическая теория облегченного транспорта, о роли переносчиков говорилось не раз.

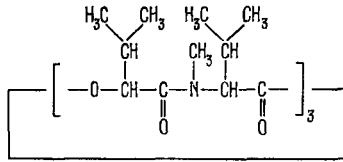
Весьма эффективными переносчиками щелочных катионов служат депсипептиды, изучавшиеся в работах Шемякина, Овчинникова и их сотрудников [154—157], Льва и Бужинского [158], а также Прессмана с сотрудниками [159, 160]. Депсипептиды представляют собой циклические антибиотики, построенные из чередующихся α -аминокислот и α -оксикислот. Сюда относятся валиномицин, энниатины и др. Другая группа переносчиков — монактин, нонактин и т. д. — макротетролиды, циклические соединения, содержащие четыре эфирные и четыре сложноэфирные связи. Строение некоторых циклических переносчиков показано на рис. 3.11. Подробное описание строения и свойств переносчиков и мембранного транспорта ионов, происходящего с их участием, содержится в фундаментальной монографии [157] (см. также обзор [161]). Теория явлений ионного транспорта, индуцированного переносчиками, изложена в монографии [162].

Внутренняя гидрофобная часть мембраны, обладающая малой диэлектрической проницаемостью, представляет существенное препятствие для диффузии ионов K^+ и Na^+ , поступающих из водной среды. Активационный барьер, однако, резко снижается, и проницаемость мембраны для таких ионов возрастает на несколько порядков в присутствии циклических переносчиков (ЦП). Молекулярная природа этих явлений состоит в том, что ЦП образуют специфические клатратные комплексы с щелочными катионами, причем одна сторона ЦП гидрофильна, а другая — гидрофобна. На рис. 3.12 показана структура комплекса валиномицин — K^+ [156].

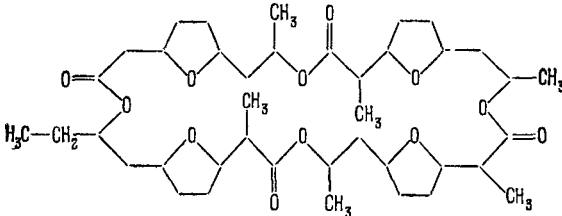
Действие ЦП с успехом изучается на искусственных двуслойных липидных мембранах (см. стр. 140). В растворе KCl электрическое сопротивление такой мембраны равно по порядку величины 10^8 Ом/см². Проводимость мембраны линейно возрастает с концентрацией ЦП в растворе. При малом содержании K^+ в растворе (менее 10^{-1} М) проводимость пропорциональна концентрации K^+ . Эти результаты показывают, что активным является комплекс ЦП с одним ионом K^+ ,



Валиномицин



Анниатин В



Монактин

Рис. 3.11. Химическое строение некоторых циклических переносчиков.

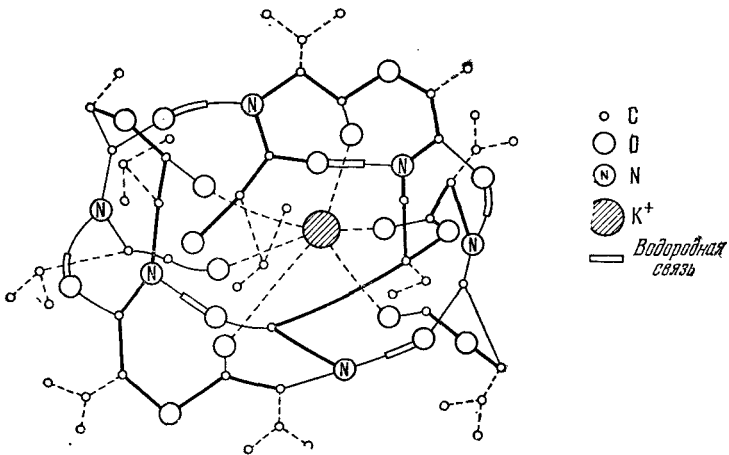


Рис. 3.12. Структура комплекса валиномицина с K^+ .

Способность образовывать такого рода комплексы зависит от конформационных свойств молекул ЦП. В цитированных выше работах были детально изучены различные аналоги ЦП, обладающие разной способностью к комплексообразованию. Сама эта способность есть необходимое, но недостаточное условие для увеличения проницаемости мембраны. Существенно конкретное строение циклического соединения.

Кинетическая теория транспорта ионов, облегченного переносчиками, развивалась в двух группах работ — Лейгера и сотрудников [161, 163, 164] и Маркина, Либермана и др. [162, 165—170, 184]. Обе теории приводят к сходным результатам. Рассмотрим сначала результаты, полученные в работах второй группы.

В растворе имеются ионы А (щелочные металлы) и жирорастворимые переносчики С, дающие комплекс АС(≡Х). Вблизи билипидной мембраны находятся неперемешиваемые слои толщиной h , в пределах которых ионы диффундируют с коэффициентами D_C и D_X . Частицы С и Х могут переходить через границу мембраны, на которой возможно и образование Х. Общая схема модели представлена на рис. 3.13. Предполагается, что ионы в мембране располагаются в двух потенциальных ямах ширины λ вблизи поверхностей мембраны, между которыми они совершают переходы с константами скоростей k_C и k_X . Проводимость мембраны вычисляется на основе рассмотрения кинетики перемещения ионов. Если на мембрану наложен внешний потенциал ψ , то он делится между емкостями, указанными на рис. 3.13, на доли

$$\psi_1 = \frac{q_1}{C_1}, \quad \psi_2 = \frac{q + q_1}{C_2}, \quad \psi_3 = \frac{q + q_1 + q_2}{C_1}, \quad (3.127)$$

где q_1, q_2 — изменения зарядов у потенциальных ям в мембране, q — заряд раствора электролита у левой границы мембраны. Заряды q_1, q_2 связаны со сдвигом концентраций С и Х от равновесных значений. Вычисляются потоки ионов и переносчика. Наложение потенциала ψ_i меняет константы скорости в $\exp(\pm 1/2 z \psi_i / k_B T)$ раз, где z — заряд иона. Определяются потоки через границы мембраны и внутри нее, используются уравнения диффузии для веществ С и Х и условия непрерывности на

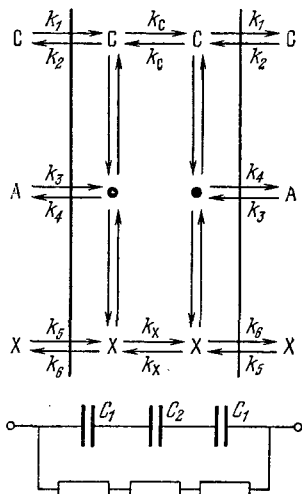


Рис. 3.13. Схема модели переносчиков. Внизу эквивалентная схема мембраны.

границах мембраны. Проводимость g , т. е. отношение ионного тока к ψ в предельном случае малых токов, выражается весьма сложной функцией A , C , X . Это выражение упрощается в некоторых предельных случаях. Если A и X очень малы, то

$$g_0 = \frac{z_C^2 k_B T \mathcal{F} C}{2h/D + 2/k_1 + k_2/k_1 k_C}, \quad (3.128)$$

где C — концентрация переносчика, D — его коэффициент диффузии, k_i — константы скорости. Вольт-амперная характеристика процесса зависит от лимитирующей стадии. Если эта стадия — диффузия в примембранных слоях, то сила тока равна

$$I = \frac{z \mathcal{F} DC}{h} \operatorname{th} \frac{z \psi}{2k_B T}. \quad (3.129)$$

Рассмотрим противоположный случай. Пусть q_1 , $q_2 < q$, так что распределение ионов в мембране не сказывается на распределении потенциала. Тогда

$$I = \frac{2z \mathcal{F} C k_1 k_C \operatorname{sh} (1/2 z \psi)}{k_2 + 2k_C \operatorname{ch} [1/2 z \psi (C_1 + C_2)/(C_1 + 2C_2)]}, \quad (3.130)$$

где C_1 , C_2 — емкости.

Напротив, если заряды q_1 и q_2 дают заметный вклад в распределение потенциала, возможны различные случаи. Если $k_C C_1 \gg k_2 C_2$, то благодаря высокой подвижности ионов поле внутри мембраны может экранироваться. Это произойдет, если $C_1 \ll z^2 k_B T \mathcal{F} \lambda \frac{k_1}{k_2} C$. Тогда все напряжение падает на границах мембраны и делится между ними поровну. Получаем

$$I = 2z \mathcal{F} k_1 C \operatorname{sh} (1/4 z \psi). \quad (3.131)$$

Если же $k_2 C_2 \gg k_C C_1$, то напряжение сосредоточено в мембране и

$$I = \frac{2z \mathcal{F} k_1 k_C \operatorname{sh} (1/2 z \psi) C}{k_2 + 2k_C \operatorname{ch} (1/2 z \psi)}. \quad (3.132)$$

Вообще говоря, вольт-амперная характеристика может зависеть от самых разных факторов — от неоднородности мембраны, от типа движения ионов (эстафетного или диффузионного) и т. д. Установление механизма транспорта по вольт-амперной характеристике пока невозможно.

На тех же основаниях удается рассмотреть переходный ток при фиксации напряжения на мембране [171], прохождение через мембрану переменного тока [172] и т. д.

Рассмотрим теперь зависимость проводимости от концентраций A и C [165]. Допустим, что на границе мембраны обмен

ионами С и Х идет медленнее, чем другие стадии. Проводимость принимает вид

$$g_0 = \frac{z_A^2 k_B T \mathcal{F} k_C k_X (k_5/k_6) k_4 X}{k_3 A k_X + k_4 k_C + 2k_C k_X}. \quad (3.133)$$

Ионы С и Х сквозь мембрану практически не проходят. Переносчик захватывает А на одной стороне мембраны и освобождает его на другой стороне. Маркин говорит о «малой карусели», заключенной внутри мембраны. «Большая карусель» возникает, если поверхностные ограничения реализуются не только на границах мембраны, но и в прилегающих слоях раствора. Если коэффициенты диффузии малы и обмен ионами А на границе мембран идет медленно, т. е. малы k_3 и k_4 , то

$$g_0 = \frac{z_A^2 k_B T \mathcal{F} k_1 k_5 k_C k_X K X}{k_1 k_C (k_6 + 2k_X) K + k_5 k_X (k_2 + 2k_C) A}, \quad (3.134)$$

где K — константа ассоциации ионов А и С в комплекс Х. «Большая карусель» захватывает и неподвижные слои раствора.

Зависимость g_0 от концентрации А имеет в обеих «каруселях» сходный характер. Так как $X = BA/(A + K)$, где $B = C + X$ есть суммарная концентрация переносчика, то

$$g_0 = \frac{\alpha}{\beta A^2 + \gamma A + \delta}$$

(α , β , γ , δ — константы), т. е. зависимость $g_0(A)$ является колоколообразной. Максимум для «малой карусели» отвечает

$$A_{\max} = \left[\frac{K k_C}{k_3} \left(\frac{k_4}{k_X} + 2 \right) \right]^{1/2}. \quad (3.135)$$

Для «большой карусели»

$$A_{\max} = K \left(\frac{k_1 k_C}{k_2 + 2k_C} \frac{k_6 + 2k_X}{k_5 k_X} \right)^{1/2}. \quad (3.136)$$

Действительно, для многих разобщителей окислительного фосфорилирования, играющих роль переносчиков (см. гл. 6), наблюдается колоколообразная зависимость $g_0(A)$ в хорошем согласии с теорией [173, 174].

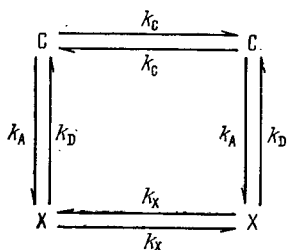
Теория объясняет наблюдаемую линейную зависимость проводимости от концентрации переносчика.

Дальнейшие подробности, относящиеся к вольт-амперным характеристикам системы и т. д., можно найти в цитированных выше работах.

Изложенная теория дает выражения для проводимости и вольт-амперные характеристики, существенным образом

зависящие от конкретных модельных предположений и содержащие большое число параметров. Общие закономерности воспроизводятся теорией правильно и получают, тем самым, надлежащее объяснение. Однако, в силу сказанного, теория не позволяет установить конкретные механизмы облегченного транспорта [161, 163, 164].

Модель Лейгера более проста, но имеет преимущества, так как содержит меньше параметров и свободна от предположения о равновесном образовании комплекса в растворе. Модель представлена на рис. 3.14. k_A — константа скорости образования комплекса $A \cdot C$, k_D — константа скорости его распада. В более простой теории удастся получить выражение для проводимости и без ограничения слабыми полями. Это выражение имеет вид



$$g = g_0 \frac{2}{u} (1 + b) \frac{\text{sh}(u/2)}{1 + b \text{ch}(u/2)}, \quad (3.137)$$

где g_0 — проводимость при малом напряжении, $u = \mathcal{F}V/RT$ (катионы одновалентны) и

Рис. 3.14. Упрощенная модель процессов облегченного транспорта.

$$b = \frac{2k_X}{k_D} + A \frac{k_A k_X}{k_D k_C}. \quad (3.138)$$

Параметр b находится из экспериментальных значений g/g_0 ; если g/g_0 измеряется как функция концентрации ионов A , два члена в b определяются независимо. Значение g_0 равно

$$g_0 = \frac{\mathcal{F}^2}{RT} N_C k_X \frac{A k_A / k_D}{1 + b}, \quad (3.139)$$

где N_C — поверхностная концентрация молекул переносчика в равновесии. Таким образом, измерения проводимости дают три независимых комбинации пяти неизвестных параметров k_A , k_D , k_X , k_C и N_C .

Определение отдельных кинетических констант может быть осуществлено релаксационными методами ([131], гл. 7). Применение релаксационных методов не ограничено гомогенными химическими системами, но они могут использоваться и для кинетического анализа мембранного транспорта [161, 164, 165]. Электрический релаксационный метод состоит в следующем: ячейка с двуслойной липидной мембраной соединена с источником напряжения и электронным выключателем, позволяющим повысить силу тока менее чем за 1 мс. Ток сквозь мембрану измеряется на осциллографе как падение напряжения на внешнем сопротивлении R_e . Немедленно после скачка напряжения наблю-

дается спайк тока, определяемый мембранной емкостью. Затем ток релаксирует к стационарному значению I_{∞} , которому отвечает неравенство X на двух сторонах мембраны (рис. 3.15 [161]).

Теория показывает, что ход $I(t)$ определяется двумя временами релаксации τ_1 и τ_2 :

$$I(t) = I_{\infty} (1 + \alpha_1 \exp(-t/\tau_1) + \alpha_2 \exp(-t/\tau_2)),$$

причем α_1 , α_2 , τ_1 , τ_2 зависят от кинетических констант [161, 164]. В сочетании со стационарными параметрами проводимости эти величины позволяют определить необходимые константы. Такие определения были проведены для системы валиномицин— K^+ и мембраны, полученной из фосфатидилинозитола [162].

Установлено, что транслокация свободного ЦП и комплекса через мембрану и диссипация комплекса на границе характеризуются константами скорости

$$k_A \approx 5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1},$$

$$k_C \approx 2 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1},$$

$$k_D \approx 5 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1},$$

$$k_X \approx 2 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1},$$

а концентрация N_C составляет $1,2 \cdot 10^{12}$ молекул валиномицина на 1 см^2 , т. е. среднее расстояние между молекулами ЦП около 100 \AA . Транспорт происходит не путем обычной диффузии, так как заряженный комплекс должен преодолеть высокий электростатический барьер внутри мембраны. Поэтому близость кинетических констант для свободного переносчика и заряженного комплекса требует специального объяснения.

Константа скорости комплексообразования $K^+ + \text{ЦП} \rightarrow X$ на поверхности мембраны оценивается по порядку величины в $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. Это на четыре порядка меньше, чем та же константа в метанольном растворе, что свидетельствует о существенно иных условиях на поверхности раздела мембраны и

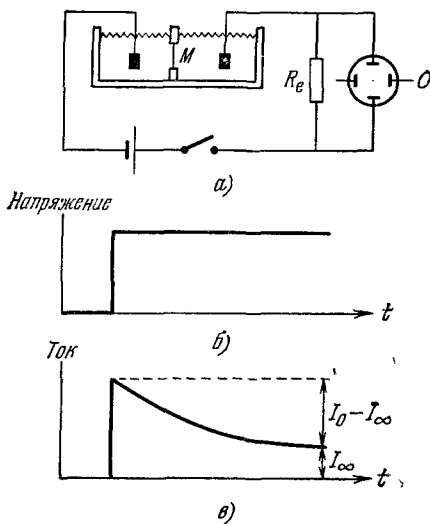


Рис. 3.15. Схема установки для электрического релаксационного метода (а), зависимость напряжения (б) и тока (в) от времени.

M — мембрана, R_e — внешнее сопротивление, O — осциллограф.

водной фазы. Причины такого различия пока не ясны, возможно, что валиномицин приобретает измененную конформацию на мембране.

Можно сравнить действие молекулы переносчика с функцией фермента [164]. Фермент снижает активационный барьер реакции. Переносчик снижает барьер для переноса щелочного иона внутри липидной мембраны. Активность фермента характеризуется концентрацией полунасыщения и числом оборотов. Для переносчиков концентрация полунасыщения отвечает концентрации ионов в водной фазе, при которой половина молекул переносчика, связанных в мембране, образовала комплексы. В случае валиномицин — K^+ эта концентрация 20 М (в метаноле 25 мМ). Таким образом, в условиях опыта концентрация связанного мембраной валиномицина еще далека от насыщения. Число оборотов есть максимальное число ионов K^+ , переносимых в 1 с одной молекулой валиномицина. Это число оказалось равным 10^4 с⁻¹, что много больше, чем для большинства ферментов. Валиномицин, обладающий на поверхности мембраны малым сродством к K^+ , является эффективным переносчиком именно вследствие большого числа оборотов.

Изложенная теория не обязательно означает, что переносчики являются таковыми в истинном смысле слова. Как указывает Маркин [170], здесь имеются две другие возможности. Во-первых, оказываясь в среде с малой диэлектрической проницаемостью, жирорастворимые переносчики (ионофоры) образуют агрегаты [176, 177]. В этом случае возможно более сложное комплексообразование и возрастание проницаемости мембран. Реализуется коллективный транспорт [162, 170].

Вторая возможность — изменение конформационной структуры мембраны ионофорами и возникновение эстафетного механизма передачи иона от одного ионофора к другому. Цепочка ионофоров может возникать и распадаться, но эстафетный механизм, конечно, отличается от прямого переноса ионов от одной границы мембраны к другой.

Если нет прямого переноса, то изложенная теория является эффективной, а кинетические константы, найденные из опыта, — эффективными константами.

Теория коллективного транспорта ионов димерными ионофорами была развита Маркиным [162, 170, 178]. Есть основания считать, что по этому механизму работают многие разобщители окислительного фосфорилирования (см. гл. 6).

Эстафетный механизм исследован в теоретических работах [179—181] (см. также [162, 170]). Он, очевидно, родственен механизму пассивного транспорта, рассмотренному в § 3.6. Сходна и теория. Как мы видели, есть основания считать, что ионный транспорт без участия переносчиков действительно происходит

по эстафетному механизму. Справедливо ли это для облегченного транспорта — пока не ясно.

При коллективном и эстафетном механизмах зависимость проводимости от концентрации ионофоров не линейна (кривая $g(B)$ выгнута), зависимость $g_0(A)$ колоколообразна, как и для «каруселей». Существенные различия для разных механизмов должны проявляться в зависимости мембранного потенциала $\psi(A)$, а также в зависимости высокочастотной проводимости $g_\infty(A)$. До сих пор, однако, соответствующие экспериментальные исследования не проведены и механизмы ионного транспорта, облегченного переносчиками, не установлены.

Прежде чем перейти к рассмотрению генерации и распространения нервного импульса, подведем некоторые итоги.

Структуре и функциям мембран посвящена колоссальная литература. Многое можно считать уже установленным и объясненным, но сложность строения и поведения мембран столь велика, что трудно ожидать скорого решения всех относящихся сюда проблем. Мы располагаем феноменологической термодинамикой мембранных процессов, рядом разумных кинетических моделей пассивного, активного и облегченного переносчиками транспорта. Развита содержательная теоретическая представления о кооперативных конформационных свойствах мембран. Накоплена очень богатая и разнообразная экспериментальная информация. Тем не менее физика мембранного транспорта находится на ранней стадии своего развития. Модельная теория имеет пока фрагментарный характер, не установлены внутренние связи между рядом направлений исследования. Физика мембран — чрезвычайно быстро развивающаяся и весьма актуальная область науки. Дальнейшее ее изложение приведено в последующих главах.