

С. Е. БРЕСЛЕР, В. М. БРЕСЛЕР

О ЖИДКО-КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

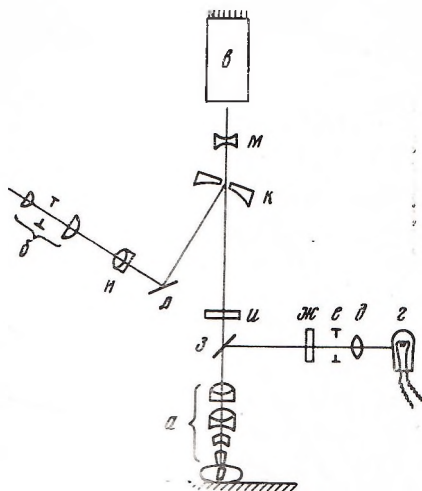
(Представлено академиком Е. М. Крепом 23 X 1973)

Современные воззрения на структуру мембраны как на липидный слой толщиной 50—70 Å, заключенный между двумя белковыми обкладками, подтверждены данными прямого рентгенструктурного анализа ⁽¹⁾. Однако физическое строение липидного слоя, который является разделительным барьером для ионов и водорастворимых метаболитов, неизвестно. Мы полагаем, что липидные пленки в мембранах по своему физическому строению являются жидкими кристаллами, т. е. молекулы в них образуют правильно построенные домены или рои, содержащие до 10^6 — 10^7 молекул. Известно из физических работ, что растворы солей жирных кислот, кетостероидов и вообще липофильных молекул вытянутой или плоской конфигурации образуют типичные жидкие кристаллы ⁽²⁾. К этому классу молекул относятся и макроциклические ионофоры типа валиномицина и грамицидина, которые могут осуществлять перенос ионов через липидные слои ⁽³⁾; они были найдены в природных липидах митохондрий ⁽⁴⁾. Если считать, что молекулы ионофоров образуют каналы, сквозь которые проникают ионы, следует предполагать, что они собираются в правильные рои и при этом образуют с ионами каналные комплексы или клатраты, хорошо известные для многих органических кристаллов ⁽⁵⁾. Идея о том, что отдельные молекулы ионофоров переносят ионы диффузией сквозь мембрану, не выдерживает критики по количественным оценкам и опровергается тем фактом, что некоторые ионофоры продолжают осуществлять проводимость и после замораживания липидной пленки ⁽⁶⁾.

Если представлять себе механизм ионной проводимости посредством доменов, образуемых молекулами ионофоров, то первое существенное предсказание заключается во влиянии электрического и магнитного поля на ориентацию доменов и соответственно на проводимость мембраны. Ориентация отдельных молекул в электрическом и тем более в магнитном поле пренебрежимо мала. Она определяется в первом случае отношением $\epsilon E/kT$, где ϵ — дипольный момент (собственный или индуцированный) молекулы, E — поле, k — константа Больцмана, T — абсолютная температура. Отношение $\epsilon E/kT$ характеризует соотношение между энергией, приобретаемой диполем при ориентации в поле, и тепловыми флуктуациями. Для молекул в поле 10^5 в/см (такое напряжение будет в мембране при скачке потенциала 0,1 в и толщине 100 Å) отношение $\epsilon E/kT=0,01$. Еще слабее действие магнитного поля на диамагнитные органические молекулы. Критерий $\mu H/kT$, где μ — магнитный момент, индуцированный в молекуле, H — поле, имеет порядок 10^{-8} — 10^{-7} . Следовательно, эффект магнитного поля исчезающе мал. Совершенно иная картина будет наблюдаться в жидких кристаллах. В них будут ориентироваться в полях не молекулы, а домены, состоящие из миллионов молекул. Поэтому суммарный магнитный и электрический момент домена будет увеличен в миллионы раз по сравнению с отдельной молекулой. Величины $\epsilon E/kT$ и $\mu H/kT$ в этом случае окажутся больше единицы. Действительно, хорошо известно, что в классических жидких кристаллах происходит полная ориентация вещества в умеренных электрических и

магнитных полях. Явление ориентации доменов в полях позволяет понять молекулярный механизм образования электрического импульса — спайка, распространяющегося вдоль мембраны нейтрона. Действительно, мембрана вследствие селективной проницаемости для анионов, заряжена до потенциала Нернста порядка 0,1 в. Когда, в силу действия капельки медиатора, мембрана в некоторой точке становится проводящей, разность потенциалов в этой точке падает в 3—4 раза, и тогда соседние области мембраны сами становятся электропроводными. В итоге вдоль мембраны распространяется

Рис. 1. Принципиальная схема микрофлуориметра. *а* — контактный объектив; *б* — окуляр; *в* — фотоумножитель; *г* — лампа иодного цикла КИМ-75, питаемая от стабилизированного выпрямителя; *д* — конденсор; *е* — диафрагма; *ж* — светофильтр, выделяющий свет возбуждения; *з* — светоделительная пластинка; *и* — запирающий светофильтр; *к* — сферическое зеркало с зондовым отверстием в центре; *л* — плоское зеркало; *м* — рассеивающая линза; *н* — объектив системы наблюдения; *о* — объект исследования



без затухания импульс тока — спайк. Теория Ходжкин — Хэксли (⁷) описывает это явление феноменологически, но не объясняет его механизма. С точки зрения жидкокристаллической структуры липидной пленки ситуация ясна. Структура ионофоров, проводящих калий, такова, что их домены ориентированы по внешнему полю, поэтому пленка проводит ионы калия. Ионофоры для натрия имеют такое строение (электрическую анизотропию), что их домены ориентированы нормально к полю. Поэтому пленка первоначально не проводит натрий. Когда капля медиатора осуществила пробой липидной пленки и поле в этой точке становится близко к нулю, то вектор электрического поля в пленке поворачивается на 90° и соответственно поворачиваются домены для калия и для натрия — пленка утрачивает проводимость для калия и начинает проводить ионы натрия, которые и создают ток деполяризации. Одновременно наблюдается и волна возмущений оптических свойств, что вполне естественно (⁸). С этой точки зрения, образование спайка возможно в любой мембране, а не обязательно в нейроне. Отсюда становится понятно наблюдение спайков у растений.

Для доказательства жидко-кристаллической природы мембран следует прямым опытом показать влияние внешнего поля на активный транспорт. В особенности характерно магнитное поле, воздействие которого на отдельные молекулы и ионы совершенно ничтожно, а на жидко-кристаллические домены достаточно велико. В качестве первого объекта мы избрали переживающую почку лягушки. Через мембрану проксимальных почечных канальцев происходит активный транспорт ионов натрия во внешнюю среду, а в обратном направлении происходит активный транспорт (антипорт) органических кислот (⁹, ¹⁰). Его удалось визуализировать, используя в качестве красителя флуоресцеин, накопление которого внутри просвета почечного канальца нетрудно измерить по нарастанию флуоресценции (¹⁰). Опыты проводились на целых почках самцов лягушки *Rana temporaria*. Ранее было показано, что проксимальные канальцы переживающей почки в растворе Рингера активно переносят флуоресцеин из среды в просвет канальцев,

причем этот процесс оказывается чувствительным к действию диуретиков, других органических кислот и ингибиторов (¹⁰). Одна почка лягушки переносилась в бюкс с флуоресцеином, другая в бюкс с раствором Рингера и служила контролем. Инкубация производилась при 18° в 10 мл среды, рН 7,4. Почка располагалась в бюксе вверх дорсальной поверхностью, содержащей проксимальные канальцы. После определенного времени инкубации (до 20 мин.) опытная и контрольная почки ополаскивались раствором Рингера и укреплялись в плоской кювете, заполненной раствором Рингера. Микрофлуориметрия проксимальных канальцев проводилась на специально сконструированном микрофлуориметре (рис. 1), осна-

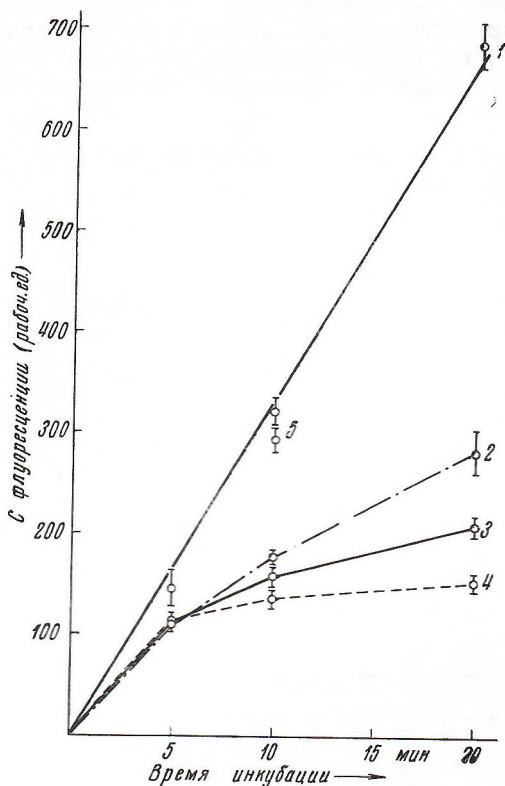


Рис. 2. Кинетика транспорта флуоресцеина в проксимальных канальцах изолированной почки лягушки в магнитных полях и вне поля. Каждая точка — среднее значение измерений 120—200 канальцев от 3—5 лягушек. Доверительный интервал при 95-процентном уровне значимости. 1 — инкубация вне поля (контроль), 2 — в поле 10 000 э, 3 — в поле 20 000 э, 4 — в поле 28 000 э, 5 — 10 мин. в поле 28 000 э, а затем вне поля 10 мин.

последовательно измеряли флуоресценцию 40 проксимальных канальцев, перемещая ее относительно фронтальной линзы объектива (а). Для каждого значения времени измерение проводилось на 3—5 почках (т. е. 120—200 канальцев) и на таком же количестве контрольных объектов, не содержащих флуоресцеина. Все данные подвергались статистической обработке: вычислялись средние значения разностей опыт — контроль, средние квадратичные отклонения, границы доверительного интервала при 95-процентном уровне значимости. Для изучения действия магнитных полей почка помещалась в $1 \cdot 10^{-4}$ М раствор флуоресцеина на солевом растворе Рингера для хладнокровных и бюкс немедленно (не более чем через 30 сек.) устанавливался между полюсами электромагнита с включенным полем. По окончании инкубации бюкс извлекали из поля, почку ополаскивали раствором Рингера и микрофлуориметрировали. На рис. 2 представлены результаты измерений прохождения флуоресцеина в проксимальные канальцы без поля и в магнитных полях. В отсутствие поля кинетика транспорта

проводилась на специально сконструированном микрофлуориметре (рис. 1), оснащенном контактными объективом (а), позволявшим сфокусировать оптику на просвет канальца без какого-либо нарушения целостности органа. Можно было одновременно вести визуальное наблюдение через окуляр (б) и измерять люминесценцию с помощью фотоумножителя (в). Освещение производилось синевioletовым светом через объектив (а) от иодной лампы КИМ-75 (г) со стабилизированным питанием. Диаметр светового зонда в плоскости изображения объекта составлял 60 мк, в такой зонд помещался весь поперечник проксимального канальца. Для выделения возбуждающего синевioletового света служил светофильтр ФС-1-4 (ж), а для выделения видимого света флуоресценции — стеклянный запыряющий светофильтр и ЖС18+ЖС19. В каждой почке

линейна; в магнитных полях в первые минуты скорость потока через мембрану лишь слегка уменьшена, а затем она быстро затухает и при максимальном поле (28 000 э) к 20 мин. практически близка нулю. При помещении почки на 10 мин. в поле 28 000 э и последующей инкубации вне поля 10 мин. проникновение флуоресценна незначительно ниже, чем за этот срок в контроле (точка 5 на рис. 2). Кинетика транспорта в полях и некоторое замедление восстановления транспорта после снятия поля объясняются, видимо, немгновенностью переориентации доменов в мембране при введении в поле и при его выключении. Для жидких кристаллов хорошо известно, что установление ориентации доменов в поле требует заметного времени. Существенная роль в тормозящем эффекте принадлежит, очевидно, ориентации мембран относительно поля, поскольку в части канальцев транспорт флуоресценна сохраняется и в магнитных полях, что, естественно, несколько завышает регистрируемые микрофлуориметрически средние значения эффекта подавления транспорта, но не препятствует обнаружению и изучению этого эффекта.

Таким образом, магнитные поля напряженностью в 10 000 — 28 000 э вызывают обратимое изменение структуры мембран, препятствующее активному транспорту флуоресценна в проксимальных канальцах почки лягушки.

Авторы приносят благодарность проф. С. С. Шалыту за предоставление электромагнита.

Ленинградский институт ядерной физики
им. Б. П. Константинова
Академии наук СССР

Поступило
9 X 1973

Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР
Ленинград

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. Caspar, D. Kirschner, *Nature New Biol.*, 231, 46 (1971). ² G. Brown, J. Doane, V. Neff, *A Review of the Structure and Physical Properties of Liquid Crystals*, Butterworth, London, 1971. ³ P. Mueller, D. Rudin, *Nature*, 217, 713 (1968). ⁴ G. Blondin, A. De Castro, A. Senior, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 28 (1971). ⁵ Ф. Крамер, Соединения включения, М., 1958. ⁶ S. Krasne, G. Eisenman, G. Szabo, *Science*, 174, 412 (1971). ⁷ A. Hodgkin, A. Huxley, *J. Physiol.*, 219, 50 (1952). ⁸ Y. Kobatake, T. Tasaki, A. Watanabe, *Adv. Biophysics*, Tokyo, 2, 1 (1971). ⁹ S. Chung, Y. Park, S. Hong, *J. Physiol.*, 219, 30 (1971). ¹⁰ В. М. Бреслер, Ю. В. Наточин, *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, 75, 67 (1973).