аука выигрывает, когда её
ылья раскованы фантазией»

Майкл Фарадей

«Если в голове нет идей,
то не увидишь и фактов»

Иван Петрович Павлов

Посвящаю моей жене Ширли (Shirley)

Gilbert N. Ling

LIFE AT THE CELL AND BELOW-CELL LEVEL

THE HIDDEN HISTORY OF A FUNDAMENTAL REVOLUTION IN BIOLOGY

Pacific Press
New York
2001

Гильберт Линг

ФИЗИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ЖИВОЙ КЛЕТКИ

НЕЗАМЕЧЕННАЯ РЕВОЛЮЦИЯ

Санкт-Петербург
«НАУКА»
2008

УДК 576; 577
ББК 28.05
Л 59

Перевод с английского
А. Б. Иванюка
Под редакцией и с предисловием
кандидата биологических наук **В. В. Матвеева**
Руководитель проекта
кандидат технических наук **А. В. Малыгин**
Рецензенты:
А. А. Булычев, доктор биологических наук, профессор Биологического факультета, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова.
А. Г. Погорелов, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.
Т. А. Яхно, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Отдела радиофизических методов в медицине Института прикладной физики РАН.

Линг Г.
Л59 Физическая теория живой клетки: незамеченная революция. — СПб.: Наука, 2008.— 376 с.

ISBN 978-5-02-026348-2

В книге известного американского ученого представлен новый взгляд на строение живой клетки и законы ее функционирования. Фундаментальной структурой клетки, своего рода физиологическим атомом, согласно автору, является комплекс белка с водой, ионами и АТФ. Критическому анализу подвергаются теория мембранных насосов и общепринятые взгляды на роль самой мембраны в жизни клетки. Излагаются научные взгляды на структуру и функцию внутриклеточной воды. Книга может быть использована как руководство по физиологии клетки и биофизики.

Для специалистов — биофизиков, физиологов, биохимиков, фармакологов, а также для студентов старших курсов биологических факультетов университетов.

© 2001 by Gilbert N. Ling
© Малыгин А. В., право на издание и распространение, 2008
© Иванюк А. Б., перевод на русский язык, 2008

ISBN 978-5-02-026348-2

ПОЧЕМУ МЫ ВЗЯЛИСЬ ЗА ПЕРЕВОД ЭТОЙ КНИГИ?

Самый простой ответ на вопрос в заголовке — потому что ее нельзя было не издать! Впервые ознакомившись с ее кратким содержанием на сайте В. В. Матвеева ***bioparadigma.narod.ru***, я захотел узнать об изложенной в ней теории как можно больше и подробнее. Спектр моих ощущений при знакомстве со взглядами Гильберта Линга постепенно менялся от естественной настороженности до удивления и даже восхищения. Поражают не только цельность самой теории, фундаментальность поднимаемых в ней вопросов, но и упорное нежелание специалистов замечать ее. Невольно меня стал преследовать вопрос: почему нам это не преподают в вузах, не упоминают в учебниках? Я не являюсь специалистом в клеточной физиологии, но совершенно очевидно, что любая наука не может развиваться безальтернативно, а теория Линга — это серьезная альтернатива господствующим взглядам. Поэтому естественно, что, натолкнувшись на призыв автора сайта — «Российские издатели! Неужели ни одной книги Линга так и не будет переведено на русский язык?!», — ответил себе: обязательно переведем.

О самой книге и ее авторе достаточно много и хорошо сказано в предисловиях, количество которых, учитывая новизну авторского подхода, мы решили не ограничивать. Из них следует, что некоторые разделы теории Линга проработаны не столь подробно, о чем автор честно упоминает и сам. Это не удивительно, так как данное направление развивалось энтузиастами и финансировалось в сотни и тысячи раз меньших объемах, чем исследования, следующие официальной доктрине. Потому в нем остается огромное поле для молодых и ищущих ученых, желающих внести свой вклад в биологическую науку. Вы не верите аргументам автора — так давайте проверим их! Но даже если будет установлено, что истина где-то посередине — от этого все мы только выиграем.

С точкой зрения автора можно соглашаться или спорить, ее можно пытаться опровергать, но для всего этого ее нужно как минимум знать — поэтому и издается эта книга.

Настоящий проект не является коммерческим, он скорее образовательный, но как бы ни сложилась судьба этой книги, я безмерно горд знакомством с ее автором, настоящим подвижником науки, а также тем, что ее русский перевод выходит в свет еще при его жизни — ведь в 2009 году Г. Лингу исполнится 90 лет.

В заключение выражаю огромную благодарность научному редактору перевода, давнему другу и стороннику Линга, ставшему и моим другом, — Владимиру Васильевичу Матвееву, а также переводчику Антону Борисовичу Иванюку, которые перелопатили горы литературы и проштудировали мириады интернетовских сайтов, превращая сложнейший текст автора в увлекательный, точный и по-настоящему русский перевод.

Руководитель проекта, кандидат технических наук,
лауреат премии Правительства РФ
в области науки и техники

Александр Малыгин

Институт физиологии
им. И. П. Павлова РАН
С.-Петербург
Электронная почта:
malygin.av@gmail.com

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА К АНГЛИЙСКОМУ ИЗДАНИЮ

Слова «магнитно-резонансная томография» (МРТ) сейчас можно услышать в любой квартире. Эта совсем недавно внедренная технология ежедневно спасает человеческие жизни. В основе МРТ, изобретенной Рэймондом Дамадьяном и усовершенствованной Полом Лотербуром, лежит предложенная мной физико-химическая теория жизни — *теория ассоциации-индукции* [107, p. xxv n1], впервые представленная мной в 1962 году в книге под названием «*Физическая теория жизни: теория ассоциации-индукции*» [98]. Профессор Ральф Джерард из отдела физиологии Чикагского университета написал аннотацию к этой книге, заключив ее словами: «*...Таким образом, должны существовать некие основополагающие и всеобъемлющие законы, предопределяющие и объясняющие любые проявления жизни. Именно такой основной молекулярный закон жизни, не более и не менее, предлагает Линг*» [98, p. ix]. А профессор Янг — некогда мой сосед по комнате в университетском общежитии, как и я, получивший так называемую боксерскую стипендию, предоставлявшую китайским студентам возможность учиться в США, а впоследствии лауреат Нобелевской премии по физике 1957 года, соавтор неабелевой калибровочной теории Янга-Миллса (которая многими сравнивается по значимости с теорией относительности Эйнштейна [551]) — так аннотировал мою книгу: «*Во времена предвкушения учеными всего мира слияния физической и биологической наук эта книга является настоящим событием благодаря, с одной стороны, смелому и новаторскому подходу, с другой — приверженности надежным экспериментальным данным*» [98, суперобложка]. (Тогда никому и в голову не могло придти, что 40 лет спустя медицинская технология, разработанная на основе моей теории, которую так горячо поддержал Янг, — а именно МРТ, — спасет жизнь его жене Чили.)

Однако оставим хвалебные отзывы и попытаемся ответить на главный вопрос: а верной ли оказалась теория ассоциации-индукции? По прошествии полувека со дня, когда в 1952 году увидел свет зародыш этой теории — так называемая теория фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ) — я могу ответить без колебаний: да, по существу она верна. Однако, хотя моя теория заслужила всемирное одобрение, и публикации в ее поддержку появляются то тут, то там, как в Америке, так и за ее пределами на протяжении всей второй половины XX века, широкая научная общественность, как ни трудно в это поверить, до сих пор ничего не подозревает о ее существовании. Главная цель выхода этой книги, в 5-ти из 17 глав которой содержатся самые современные представления о гипотезе ассоциации-индукции и ее основные доказательства, — пробить эту почти несокрушимую стену [247] и открыть, наконец, миру вопиющие факты, которые были скрыты от широкой публики на протяжении многих лет. Упомянутые пять глав позволят взглянуть с высоты птичьего полета на всю историю попыток человечества постичь тайну бесценного дара жизни.

Не только философы, но и ученые далеко не всегда считали, что такое понятие, как жизнь, можно объяснить на основе законов физики и химии. Так, витализм еще в первой половине XIX века сохранял многочисленных сторонников [3, p. 219–287]. Они утверждали, в частности, что можно лишь наблюдать проявления скрытого жизненного начала (causa vitae), но само его существование не может быть объяснено ни физико-химическими, ни какими-либо иными научными представлениями — точно так же, как можно наблюдать признаки существования всемирного тяготения, но объяснить его природу невозможно.

Известнейшими противниками витализма были Герман фон Гельмгольц (1821–1894), Карл Людвиг (1816–1895), Эмиль Дюбуа-Реймон (1818–1896) и Эрнст фон Брюкке (1819–1892). Все четверо, как один, свято верили в то, что живой мир подчиняется тем же законам, что и неживой, и они блестяще отстаивали свои воззрения. Общественное признание их усилий отражает тот факт, что двое из них были возведены в дворянство: Гельмгольц — германским императором Вильгельмом I, Брюкке — австрийским императором Францем-Иосифом. Однако четверка редукционистов так и не смогла перевести феномен жизни на язык физико-химических терминов. Время для этого еще не наступило.

Великие редукционисты, как и большинство их последователей, изучали физиологию различных органов, тогда как ключ к пониманию жизненных процессов следовало искать в клетке и субклеточных структурах. А ведь в те времена исследования клетки и ее органелл едва начинались. К тому же, несмотря на блестящий талант Гельмгольца как физика и физиолога, ни он, ни его коллеги не располагали еще необходимыми физико-химическими познаниями.

Каждое из этих препятствий было устранено к тому времени, когда на сцене появилось мое поколение клеточных физиологов. Прогресс физики и химии сделал возможным создание теории ассоциации-индукции, а успехи экспериментальной биологии позволили получать клеточные культуры и выделять отдельные органеллы для испытания этой теории в действии. Всестороннее подтверждение теории ассоциации-индукции не только засвидетельствовало правоту четверки редукционистов, но и ознаменовало рождение новой эпохи — эпохи объединения физики и химии в единую науку (см. эпилог книги). Однако всё еще остается открытым вопрос: а разве эта единая наука сможет сделать больше, чем каждая из них

в отдельности? Отвечу так: возможно, единая наука сможет достичь большего, чем мы можем себе представить.

Вначале не было ничего плохого в том, что наука делилась на физику, химию, биологию и т. д. Напротив, подобное упрощение способствовало невиданному прогрессу этих наук за последние два века. Однако разделение влечет за собой изоляцию, а длительная отчужденность неизбежно заводит научную мысль в тупик. Так и эти науки рано или поздно, потеряв связь между собой, достигли бы своего предела, и это не просто мои опасения — некоторые признаки кризиса можно заметить уже сейчас.

В 1996 году уважаемое издательство Addison—Wesley выпустило книгу Джона Хоргана «Конец науки» [380] (прим. перев.: в русском переводе опубликована в 2001 г. издательством «Амфора», СПб). Сотрудник журнала *Scientific American,* Хорган взял эксклюзивные интервью более чем у сорока выдающихся ученых, среди которых были физики (Фримен Дайсон, Мюррей Гелл-Манн, Стивен Хоукинг), биологи (Стивен Джей Гулд, Джон Экклз, Стенли Миллер), историки науки (Томас Кун, Карл Поппер, Пауль Фейерабенд) и другие знаменитости. Из слов этих ученых, если Хорган понял их правильно, получается, что все они, как и сам Хорган, разделяют общую точку зрения на перспективы науки, и эта точка зрения выражена подзаголовком книги: «*Взгляд на ограниченность знания на закате Века науки*». Подобная убежденность ученой элиты — флагманов общественного мнения — в неотвратимости гибели науки кажется мне весьма опасным заблуждением. Если подобное течение мысли не изменится, пострадают, уверен, наука, общество, человечество в целом.

Основанием для веры в неминуемую гибель науки служат, если следовать их логике, два исторически сложившихся обстоятельства: раздробленность науки и недоверие к теории ассоциации-индукции, неспособность оценить ее подлинный потенциал в том, что касается биологической науки. Раздробленность знания грозит серьезным кризисом физике и химии. В случае же забвения теории ассоциации-индукции разрушение главенствующей ныне, но устаревшей мембранной теории способно обернуться крахом всей биологии.

На протяжении всей второй половины XX века, тем не менее, теория ассоциации-индукции неуклонно приобретала все больше и больше сторонников. Одно это дает достаточные основания утверждать, что развитие не только биологии, но и науки в целом продолжается, хотя и с гораздо меньшей скоростью, чем могло бы [247]. К сожалению, эта «хорошая новость» известна лишь немногим, в отличие от «плохих новостей» Хоргана, вдвойне плохих из-за их предвзятости.

Ведь если конец фундаментальной науки так близок, то к чему продолжать тратить на нее государственные деньги? Если фундаментальная наука погибает, то какой смысл молодежи выбирать карьеру в этой области? Кроме того, с сокращением финансирования и притока свежих сил даже самая процветающая наука зачахнет, оправдав поневоле пророчество о *Конце науки.*

Потеряв фундаментальную науку, как сможем мы поддерживать благосостояние современного общества? Каким образом мы обеспечим достойную жизнь неуклонно растущему населению земного шара в условиях неуклонно убывающих естественных ресурсов, в особенности нефти и природного газа [552]? И как совладаем мы с тревожными изменениями климата, порожденными в том числе и нередкими масштабными пожарами на нефтяных месторождениях [553]? Конечно, мы располагаем фантастическими технологиями с огромным потенциалом, однако все они — плоды фундаментальной науки прошлого. Для борьбы с новыми угрозами этого уже старого научного капитала может оказаться недостаточно. Нам могут понадобиться по-настоящему революционные технологии и изобретения, разработка которых немыслима без передовой фундаментальной науки.

Предупреждение этого несчастья — легкомысленного уничижения фундаментальной науки — является второй задачей или сверхзадачей этой книги. Правда, у меня были и другие основания написать ее. Ведь, если моя теория верна, то столь длительное сокрытие ее фактических достижений, ее значения для фундаментальной биологии (см. работу [247]) неминуемо должно было нанести ущерб и другим сферам жизни общества, например, образованию.

Так, 28 июля 2000 года в крупнейших газетах США была напечатана статья репортера Associated Press Анжетты Макквин [554] о шокирующих результатах исследования, проведенного Американской ассоциацией развития науки, или AAAS (проект № 2061, руководитель Джордж Нельсон). Вот характерная цитата из нее: «В больших руководствах по биологии нет больших идей» [555], — и такого сурового вердикта не избежал ни один из десятка наиболее популярных, рекомендованных к широкому использованию учебников по биологии.

Впервые термин *биология* употребил в 1802 году Жан Батист Ламарк (1744–1829) [3, p. 144]. Это слово, как тогда, так и ныне, означает лишь одно: *наука о жизни.* И ни один вопрос в биологии не может быть более важным, чем вопрос: *что есть жизнь* в своей основе, которая может и должна быть выражена в терминах и законах науки. Если об этом не забывать, становится понятно: ответственность за то, что учебники по биологии неспособны рассказать о «больших теориях», не может лежать только на авторах этих учебников, или только на их издателях, или только на школьных комитетах, составляющих программу обучения. Ведь, будь в этом виновны лишь отдельные лица, остальным не составило бы труда избежать их ошибок и написать качественные большие учебники с «большими идеями». На деле же не было написано ни единого подобного руководства — следовательно, должны существовать другие, более глубокие причины сложившегося положения.

На мой взгляд, проблема заключается в неполноценности того варианта биологии, который до сих пор преподают чуть ли не повсюду, — а именно в том, что этот вариант всегда игнорировал по-настоящему «большую теорию» жизни, возможно, по той причине, что никогда не подозревал о ее существовании (см. Введение). Между тем, теория ассоциации-индукции, оставаясь совершенно неизвестной общественности, является той теорией, которая внятно объясняет, что есть основа жизни с точки зрения современной физики и химии. Одна из задач этой книги — помочь школьникам и студентам, их преподавателям, а также будущим авторам руководств по биологии и образовательным ведомствам все-таки преодолеть в себе ту ограниченность, о которой я только что говорил. Хочется надеяться, что благодаря общим усилиям новое поколение ученых будет не просто достаточно подготовленным, а более того — блестяще подготовлено к тому, чтобы с уверенностью в своих силах встретить любой вызов, который могут бросить нам грядущие времена.

Теперь несколько слов о самой теории ассоциации-индукции (АИ). В 1962 году по следам упомянутого выше ее прототипа — теории фиксированных зарядов [94, 96] — была впервые опубликована теория ассоциации-индукции [98]. Однако законченный вид она приобрела лишь в 1965 году, когда была дополнена теорией, объясняющей природу внутриклеточной воды. Именно это событие ознаменовало рождение *первой* в истории единой физико-химической теории жизни на клеточном и субклеточном уровне.

Слово *ассоциация* в названии теории указывает на тесное взаимодействие и взаимосвязанность трех основных составляющих живой клетки — белков, воды и ионов калия. Этот комплекс составляет общую физическую основу организации клетки, и ни один из его компонентов не свободен от остальных. Это — *революционная* идея, идущая вразрез с общепринятым представлением о свободном состоянии воды и ионов внутри клетки. Второе слово, *индукция*, отражает идею, что живая клетка и ее компоненты вплоть до белковых молекул являются по существу *электронными* машинами, благодаря которым трансклеточная передача информации и энергии, необходимая для функционирования, реализуется через повторяющиеся во времени регуляторные изменения степени электрической поляризации отдельных функциональных групп и распространение этих изменений в субмолекулярном, молекулярном и надмолекулярном масштабе. Данное положение теории ассоциации-индукции находится в соответствии с известными физическими и химическими закономерностями, и ничего революционного в собственно «индуктивном» компоненте нет, однако роль этого компонента в клеточной организации и регуляции — это та область, к которой наука только приблизилась.

Узнать подробности дальнейшего развития теории, а также результаты экспериментов, проводившихся во всех странах мира с целью проверки следствий теории ассоциации-индукции, можно из моей второй книги «В поисках физической основы жизни» (In Search of the Physical Basis of Life, Plenum Publ. Co., New York) [15]. Спустя еще восемь лет вышла моя третья книга, название которой ознаменовало окончательный приговор: «Революция в физиологии клетки» [107] (Krieger Publ. Co., Malabar, Florida).

У каждой их этих трех книг была своя задача. Книга, выпущенная в 1962 году (и ныне в продаже отсутствующая, если не считать нескольких экземпляров, сохранившихся в интернет-магазине Barnes and Noble), впервые представила теорию ассоциации-индукции широкой публике. Книга объемом в 791 страницу, увидевшая свет в 1984 году, обозначила истинные масштабы теории и возможные сферы ее применения. Наконец, книга, датируемая 1992 годом и насчитывающая 378 страниц, подводит скрупулезный итог наступившей революции в науке о клетке. Каждая из трех книг содержала важные сведения о теории АИ, которые порой отсутствовали в предыдущих изданиях. И постепенно назрела необходимость четвертой книги, которая обобщила бы опыт и достижения предыдущих изданий, охватив тем самым наиболее широкий круг вопросов теории. Именно эту книгу вы сейчас держите в руках.

Книга, нацеленная на решение поставленных перед ней задач, должна быть доступна читателям с различной профессиональной подготовкой медико-биологического профиля. Для кого же именно она предназначена? Прежде всего — для преподавателей биологии в школах и институтах, а также для представителей образовательных учреждений всех уровней. Именно эти люди создают будущее науки. Каждому из них, в том или ином смысле, доверено обучить молодежь основам фундаментальной биологии, а также вдохнуть в них чувство изумления и благоговения перед возможностью преодолеть *последний* великий рубеж на пути к познанию истины. От выполнения этой задачи зависит, сумеют ли сегодняшние ученики и завтрашние исследователи создать лекарства для лечения рака, СПИДа, коровьего бешенства, лихорадки Эбола и так далее и тому подобное с такой же легкостью, с какой инженер устраняет неисправность в радиоприемнике.

Однако, помимо преподавателей, эта книга предназначена для исследователей, как начинающих, так и опытных, которые удручены постоянным наблюдением явлений, не укладывающихся в заученные каноны, и испытывают гнетущее разочарование в научной работе. Кроме того, книга призвана помочь врачам, которые при всем старании не могут понять законы, которым подчиняется то или иное заболевание. Их может приводить в замешательство успех альтернативной медицины там, где общепринятые методы терпят неудачу. Нельзя забывать и о любознательных студентах, желающих получить высшее биологическое или медицинское образование; о выпускниках, о проходящих последипломное образование; в конце концов, просто о здравомыслящих людях, желающих больше узнать

о законах, управляющих работой их мозга, мышц или почек. Всем этим людям в той или иной степени будет полезно узнать представленную в данной книге новую парадигму, способную соединить все нити биологических наук в единое целое.

Эта книга, как уже сказано выше, призвана пролить свет на историю науки, начиная с того момента, когда человечество, создав микроскоп, начало осторожно присматриваться к миру клеток и микробов, и заканчивая кульминацией — рождением теории ассоциации-индукции, путь к которой пролегал от одной исторической вехи до другой, через роковые ошибки, гениальные озарения, частью оставшиеся по разным причинам неизвестными.

Я приложил максимум усилий, чтобы моя книга не оставила чувства недопонимания ни у одного читателя, независимо от его специализации и уровня подготовки.

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

В феврале 2006 года я получил от Александра Вячеславовича Малыгина (Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук), лауреата премии правительства России, предложение о переводе на русский язык моей книги "A Revolution in the Physiology of the Living Cell", вышедшей в 1992 году. Меня, как автора, не могло не порадовать такое предложение, но необходимых прав на это издание у меня нет, и я предложил перевести другую мою книгу "Life at the Cell and Below-Cell Level", изданную в 2001 году. Теперь она у вас в руках.

Физическая теория живой клетки, с которой читателю предстоит познакомиться, опирается на три науки: физику, химию и биологию, и открывает перед читателем столь неожиданную, надеюсь, перспективу, которую я вправе назвать научной революцией. Для корректной работы над переводом столь амбициозной и многоплановой книги необходимо, конечно, знать ее предысторию, представленную в многочисленных публикациях — не только моих, но и таких выдающихся русских физиологов, как Д. Н. Насонов и А. С. Трошин. Необходимо было связать, как принято говорить, Запад с Востоком. Невероятно, но ученый, готовый проделать такую работу, нашелся. Им оказался Владимир Васильевич Матвеев (Институт цитологии Российской академии наук, основанный в 1957 году Д. Н. Насоновым, и долгое время возглавлявшийся его выдающимся учеником А. С. Трошиным).

То обстоятельство, что и В. В. Матвеев, и А. В. Малыгин оказались жителями Санкт-Петербурга, не кажется мне таким уж случайным. Я бы назвал этот город физиологической столицей России, памятуя о выдающихся физиологических школах, зародившихся здесь. Столь удачное соседство позволило команде, организованной А. В. Малыгиным, сделать русский перевод книги еще лучше и точнее, чем даже исходный труд на английском. Я хотел бы выразить глубокую благодарность за проделанную работу и В. В. Матвееву, и А. В. Малыгину. Именно эта сердечная признательность — главный мотив этого предисловия.

Я хотел бы также воспользоваться этим предисловием для того, чтобы привести список публикаций моей лаборатории, появившихся уже после выхода книги "Life at the Cell and Below-Cell Level", а также дать ссылки на электронные версии нескольких статей, уже вошедших в книгу.

Ling, G. N. (1981) Oxidative phosphorylation and mitochondrial physiology: a critical review of the chemi-osmotic theory, and reinterpretation by the association-induction hypothesis. Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 13:29. (Код: PCP13-29_ling).

Ling, G. N. (1993) A quantitative theory of solute distribution in cell water according to molecular size. Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 25:145. (Код: PCP25-145_ling).

Ling, G. N. (1993) Predictions of polarized multilayer theory of solute distribution confirmed from a study of the equilibrium distribution in frog muscle of twenty-one non-electrolytes including five cryoprotectants. Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 25:177. (Код: PCP25-177_ling_niu_ochsenfeld).

Ling, G. N. (1997) Debunking the alleged resurrection of the sodium pump hypothesis. Physiol. Chem. Phys & Med. NMR 29:123. (Код: PCP29-2_ling).

Ling, G. N. (1998) Science Cannot Conquer Cancer and AID Without Your Help, (http://www.gilbertling.org).

Ling, G. N. (2003) A new theoretical foundation for the polarized-oriented multilayer theory of cell water and for inanimate systems demonstrating long-range dynamic structuring of water molecules. Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 35:91. (Код: PCP35-91_ling).

Ling, G. N. (2004) What determines the normal water content of a living cell? Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 36:1. (Код: PCP36-1_ling).

Ling, G. N. (2005) An updated and further developed theory and evidence for the close-contact one-on-one association of nearly all cell K^+ with β-, and γ-carboxyl groups of intracellular proteins. Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 37:1. (Код: PCP37-1_ling).

Ling, G. N. (2005) What befalls the proteins and water in a living cell when the cell dies? Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 37:141. (Код: PCP37-141_ling_fu).

Ling, G. N. (2006) A convergence of experimental and theoretical breakthroughs affirms the PM theory of dynamically structured cell water at the theory's 40th birthday. In: Water and the Cell (Pollack, G. H., Cameron, I. L. and Wheatley, D. N., eds.). Springer Verlag, Berlin, New York. (Пройдя по ссылке: www.springerlink.com/content/lv39112683045804/fulltext.pdf, кликнуть по названию книги).

Ling, G. N. (2006) In response to an open invitation for comments on AAAS Project 2061's Benchmark Books on Science. Part 1. Documentation of serious errors in cell biology. Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 38:55. (Код: PCP38-55_ling).

Ling, G. N. (2006) An ultra simple model of protoplasm to test the theory of its long-range coherence and control so far tested (and affirmed) mostly on intact cell(s). Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 38:105. (Код: PCP38-2_ling).

Ling, G. N. (2007) History of the membrane (pump) theory for the living cell from its beginning in mid-19th century to its disproof 45 years ago — though still taught worldwide today as established truth. Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 39:1. (Код: PCP39-1_ling).

Ling, G. N. (2007) Nano-protoplasm; the ultimate unit of life. Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 39:111. (Код: PCP39-111_ling).

Чтобы скачать работы из этого списка, необходимо воспользоваться адресом вида www.physiologicalchemistryandphysics.com/pdf/***.pdf, вписав вместо звездочек указанный код. Другие статьи заинтересованный читатель найдет на сайтах www.gilbertling.org и www.physiologicalchemistryandphysics.com.

Третья и последняя цель этого предисловия — обратить внимание читателей, что основные положения книги, высказанные тогда, в 2001 году, сохраняют свое значение и сейчас. Более того, они находят все новые подтверждения и даже доказательства в свою пользу. Рассчитываю на искренний интерес российского читателя к этой книге.

31 июля 2008 г.
Мелвилл, штат Нью-Йорк.
Гильберт Линг

ПРЕДИСЛОВИЕ ДЖЕРАЛЬДА ПОЛЛАКА

Для тех, кто сведущ в современной биологии клетки, но незнаком с работами Гильберта Линга, эта книга станет сюрпризом. Взгляды Линга на биологию клетки как будто пришли с другой планеты, они полностью отличаются от того, что написано в учебниках. Однако мы теперь знаем, что взгляд из другого пространства может обнаружить такие вещи, которые непросто разглядеть тем, кто находится на одной с ними планете. Именно в этом огромная заслуга Гильберта Линга: необыкновенные и уникальные идеи.

Я впервые встретил автора этой книги на небольшой конференции в Венгрии в середине 1980-х, хотя уже давно был наслышан о его необычных воззрениях. Эта встреча перевернула мою жизнь. Сила его доказательств, логика его аргументов и ощущение полного личного резонанса с его парадигмой подсказывали мне, что он обнаружил новый подход фундаментальной важности. Мои чувства, как мне показалось, разделяли и другие участники той конференции.

Новичок в этой области, я не только начал жадно читать его книги и статьи, но и раздал их моим лучшим студентам и сотрудникам, буквально пожиравшим их. Теория Линга, по их общему мнению, как минимум очень близка к истине, что подтверждало мое собственное ощущение. Линг явно приоткрыл завесу над самыми глубинными свойствами клетки, и наша лаборатория начала все увереннее направлять свой взор на эту новую область исследований. Хотя моя собственная книга «*Cells, Gels and the Engines of Life*» (Ebner and Sons, 2001) движется в несколько другом направлении, она выстроена на центральных идеях Гильберта Линга.

Эта книга — попытка автора донести свои взгляды до непрофессионалов. Но не ждите легкого чтения. Отправной точкой развиваемых в книге взглядов является физика и физическая химия, и нетвердые знания этих дисциплин грозят поверхностным восприятием идей автора. А книга эта отнюдь не поверхностна. Так что бывшим троечникам придется подтянуться, попотеть над многими неожиданными поворотами мысли автора, но вознаграждение будет царским, ведь Линг дарит нам новый взгляд на тайну жизни — живую клетку.

Я бы выделил два поразительных отличия теории Линга от общепринятых представлений, ставших, к сожалению, догмами. Первое — тайну фундаментальных физиологических явлений следует искать в цитоплазме, а не только в клеточной мембране. Линг оспаривает, например, существование мембранных насосов, хотя биологи не устают «открывать» все новые и новые их разновидности. Надо серьезно отнестись к его доводам, так как лежащие в их основе доказательства пока не подверглись серьезной критике. Тем временем, сама идея настолько захватывает, что немалое количество студентов, которым я излагал его аргументы, меняло направление своих исследований — настолько они убедительны.

Второе отличие — внутриклеточная вода упорядочена. Линг оспаривает общепринятое убеждение, что большая часть воды клетки представляет собой обычную жидкую воду. Но если свойства клеточной воды иные, то среда внутри клетки качественно отличается от устоявшихся представлений о ней. Так, например, в глазах большинства свободная диффузия веществ в клетке является само собой разумеющейся. Однако если вода в клетке упорядоченная, она будет вытеснять вещества из клетки, как лед вытесняет растворенные вещества, концентрируя их в еще не замерзшей части раствора. Я рад заявить, что наши собственные опыты подтвердили теорию Линга, возможно, даже в большей степени, чем он мог ожидать: у гидрофильных поверхностей толщина упорядоченного слоя воды при некоторых условиях может достигать миллионов молекул. Этот факт подтверждает истинность точки зрения Линга и полностью соответствует его теории, тогда как современной биологии клетки трудно объяснить это свойство воды. Способность воды упорядочиваться у гидрофильных поверхностей свидетельствует о том, что взгляды на клеточную воду, десятилетиями гуляющие по учебникам, в корне ошибочны.

Так что прочтите эту книгу, не упустите возможность узнать о клетке то, чего вы не узнаете нигде больше. Она откроет вам новые перспективы там, где вы ожидали этого меньше всего.

Я не могу не сказать напоследок о ситуации, сложившейся в науке на сегодняшний день. В современной науке Гильберт Линг — отклонение, аномалия. Исследования в ней раздроблены на небольшие этапы, в соответствии с небольшими дозами финансовых вливаний, которыми они поддерживаются. Лингу больше подходит старая система научной работы, в которой почета удостаиваются ученые, пытающиеся решить крупные вопросы, требующие постоянных усилий на протяжении целой жизни. Проблемы, над которыми работает Линг, и в самом деле большие. Если он прав, то клетка работает совсем не так, как это преподносят в школе и в университетских аудиториях. Многим такой переворот во взглядах покажется немыслимым, ведь весь, или почти весь научный мир пришел к единой точке зрения и смотрит почти с негодованием на тех, кто достаточно дерзок, чтобы идти наперекор подавляющему большинству. Сегодня, как, впрочем, и во все времена, ставить под сомнение «прописные истины» означает рисковать карьерой.

В этом смысле Гильберт Линг — герой науки. Ему удается противостоять официальной науке уже больше полувека, и год за годом продолжать твердо отстаивать свои позиции и даже укреплять их.

Одно время ему приходилось унижаться, чтобы добиться поддержки своей лаборатории в условиях яростного сопротивления со стороны капитанов науки, особенно тех, от кого зависело финансирование научной деятельности. Теперь Линг отлучен от полноценной жизни в науке, тирания власти сломила все-таки его сопротивление, но его идеи и сейчас не менее значимы, чем четверть века назад. Более того, доказательная база его теории ширится.

Итак, я советую читателю погрузиться в книгу, попытавшись отвлечься от заученных истин. Кому-то эта книга может показаться написанной ученым с другой планеты, но, в конце концов, можно ли быть уверенным, что жизнь на других планетах продвинулась в понимании жизни меньше, чем на Земле?

Gerald H. Pollack
Department of Bioengineering
University of Washington
Seattle WA 98195 USA

Джеральд Поллак, профессор
Отдела биотехнологии,
Университет штата Вашингтон,
Сиэтл, США.

Электронная почта:
ghp@u.washington.edu

ПРЕДИСЛОВИЕ НАУЧНОГО РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

После стольких предисловий мне осталось сказать немногое. Книга, которую вы держите в руках, — попытка создать физическую теорию живой клетки так, как это свойственно физике — от небольшого числа утверждений к стройной развернутой системе взглядов. Как и полагается хорошей теории, особенно физической, она создает порядок из хаоса.

Вопреки сложившейся традиции, мне не придется жаловаться на автора за то, что он не знает или не учел работ отечественных ученых. Напротив, они являются неотъемлемой составной частью его взглядов. Работы Дмитрия Николаевича Насонова (1895–1957) и Афанасия Семеновича Трошина (1912–1985) не забыты и предстают перед нами, благодаря этой книге, в новом свете. Обретают новый смысл и другие работы научной школы Дмитрия Николаевича и есть надежда, что благодаря этой книге золотая жила достижений Школы, погребенная под осадочными породами модных течений, будет открыта вновь и станет всеобщим достоянием. Так случилось, что отечественная литература оказалась самым полным собранием исследований по проблемам, непосредственно касающихся этой книги. Иначе говоря, теория Линга возникла «там», а ее корневая система находится здесь, в России, точнее — в Санкт-Петербурге (Д. Н. Насонов и А. С. Трошин) и в Казани (В. В. Лепешкин).

Как и всякая теория, теория Линга дает возможность по-новому оценивать факты. Данные, которые раньше не вписывались ни в какие представления, могут получить новое звучание. Фильтрование экспериментального материала на пути из лаборатории на страницы журналов наносит науке вред, масштабы которого невозможно оценить. В такой ситуации альтернатива общепринятым взглядам полезна.

Я отказался и от другой редакторской традиции — разукрашивать текст оригинала своими примечаниями. Думаю, в век электронных коммуникаций никому не составит труда уточнить то или иное понятие или замечание автора. Это преимущество нашего времени позволяет внести в предисловие и нечто новое — адрес форума, где заинтересованные читатели смогут обсудить эту книгу: http://www.gilbertling.spb.ru.

Приношу свою искреннюю признательность рецензентам за труд по прочтению рукописи и за ценные замечания.

В. В. Матвеев
Электронная почта:
vladimir.matveev@gmail.com

Институт цитологии
Санкт-Петербург
24 июня 2008 г.

ВВЕДЕНИЕ

Каждый из нас был когда-то одной-единственной клеткой, и с этой малости нам пришлось начинать. Это была крошечная оплодотворенная яйцеклетка, размером меньше росинки. Затем она поделилась пополам. Получилось две клетки, каждая из которых начала расти, и вскоре тоже поделилась надвое. И так повторялось снова и снова. В какой-то момент вновь образованные клетки оказались непохожими друг на друга — началась дифференцировка. Спустя девять месяцев деления, роста и дифференцировки из одной оплодотворенной яйцеклетки образовались триллионы клеток всевозможных форм и функций. Все вместе они составили младенца, которым когда-то являлись вы, я и каждый из живущих ныне или живших прежде людей, и так будет всегда.

По улыбке, смеху и некоторым другим признакам мы можем определить, как младенец чувствует себя, или говоря неуклюже, как чувствуют себя триллионы клеток, принявшие в своей совокупности форму младенца. Иногда ребенок болеет — это также дает повод сказать, что часть клеток младенца, или все они, больны. Стараясь вылечить ребенка (как и взрослого, впрочем), мы надеемся, что наше лекарство сделает больные клетки снова здоровыми. К сожалению, мы не всегда уверены в успехе.

Почему? Давайте для примера разберем такое заболевание, как рак [247].

Риск женщины в США заболеть на протяжении своей жизни раком составляет 1 шанс из 3; мужчины — 1 шанс из 2 [358, Table 5]. Только в Соединенных Штатах, несмотря на лучшую систему здравоохранения в мире, от рака *ежедневно* умирает полторы тысячи взрослых и детей. Двадцатипятилетняя кампания «борьбы с раком», развернувшаяся в 1970-е годы, не принесла победы. Напротив, онкологическая смертность возросла со 158 на 10 000 населения в 1970 году до 210 на 10 000 населения в 1997 [553]. Конечно, в какой-то мере это объясняется тем, что население в целом постарело, а чем старше человек, тем выше риск заболеть раком. Однако это не объясняет, почему нация, так далеко продвинувшаяся в других, не менее сложных областях науки, — будь то высадка человека на Луну, создание компьютера или расшифровка генома человека, — проигрывает в борьбе с болезнями, от обычной простуды до рака. В интересах науки мы должны знать «виновника» столь масштабных провалов. Кто он или какие обстоятельства привели нас к столь горьким последствиям?

Одна из кандидатур предложена профессором Альфредом Бюргером, который написал в своем фундаментальном труде «Химия

лекарств»: *«Нам покорились бы почти все проблемы химии лекарств, имей мы хотя бы отдаленное представление о взаимодействии препаратов с химическими компонентами организма»* [345, p. 19].

Под *химическими компонентами организма* профессор Бюргер подразумевал, прежде всего, химические компоненты клеток. Неспособность получить хотя бы *отдаленное* представление о механизмах действия *любых* лекарств обусловлена одним, мало кому известным обстоятельством: иллюзорностью знаний о том, как функционирует живая клетка в принципе и как она реагирует на лекарства, в частности. Более того, эту иллюзию знания, под вывеской *«Клеточная физиология»* или любой другой вывеской, внедряют в сознание людей на всех этапах образования.

В результате, магическая формула современной науки, создавшая сверкающий всеми красками мир знаний, похоже, бессильна найти научную истину в вопросе о природе живой клетки. Эта магическая формула родилась в своей первозданной чистоте в Европе в XVII веке и известна под названием *научного метода*.

Научный метод подразумевает четыре этапа: 1) фиксация и описание явления; 2) объяснение природы этого явления — иными словами, создание гипотезы или теории, следствия которой можно проверить; 3) экспериментальная проверка следствий теории; 4) вывод на основе результатов эксперимента — истинна теория или ложна.

Но есть и пятый этап, на который обычно прямо не указывают, но без которого четыре предыдущих повисают в воздухе: *теория, опровергнутая многочисленными экспериментами, должна быть заменена на другую, более правдоподобную. Еще лучше — на теорию, получившую неопровержимые экспериментальные подтверждения.* На мой взгляд, нынешнее вопиющее незнание подлинной физиологии клетки напрямую вытекает из отказа от последовательного выполнения этого пятого этапа, несмотря на очевидные предпосылки к этому.

Наука о том, как функционирует клетка, — клеточная физиология, — ныне изучаемая более или менее подробно на самых разных этапах образования, основана на устаревшей теории, которой давно перевалило за сотню лет, и которая известна под названием *мембранной теории*. Позднее, после доработки, она превратилась в *теорию мембранных насосов*. Еще полвека назад я опубликовал серьезные сомнения в том, что клетка действительно способна обеспечить энергией работу насосов, на чем, собственно, энергетика теории мембранных насосов и зиждется [96]. Первое и единственное возражение [382], тут же парированное мною [550], сменилось гробовым молчанием оппонентов. Проходили годы, опровержения теории мембранного насоса становились все многочисленнее и убедительнее (см. главу 12). Тем не менее, ничего не подозревающие преподаватели школ и вузов во всем мире продолжают подавать теорию мембранных насосов как единственно правильную. И до сих пор эта теория служит доверчивым, в силу узкой специализации, ученым сомнительным фундаментом для исследований рака, СПИДа и других смертельных заболеваний.

Подавляющее большинство преподавателей, студентов и ученых вместе с тем не догадываются о существовании неоднократно проверенной и подтвержденной альтернативной теории, которая существует и постоянно совершенствуется вот уже около 40 лет. Ее название — теория ассоциации-индукции. В отличие от теории мембранных насосов, этот подход, основанный на последних достижениях физики и химии, предлагает четкое объяснение фундаментальных принципов взаимодействия клетки с различными веществами, в том числе с лекарственными (раздел 14.3, п. 3).

Теперь никто не возьмет на себя смелость оценить, насколько мы были бы сейчас ближе к победе над раком, СПИДом и другими смертельно опасными болезнями, если бы на поддержку проектов, опирающихся на теорию ассоциации-индукции, была потрачена хотя бы половина денег, усилий и таланта, бесследно поглощенных многочисленными исследованиями, в основу которых была положена теория мембранных насосов. Однако время показало, что прогресс фундаментальной науки, как правило, находит отклик в новых ценных изобретениях. Через 50 лет после того, как Майкл Фарадей открыл электромагнитную индукцию (1831), появились первые электростанции (1880) [54, p. 196]. Спустя тридцать лет после того, как Максвелл выдвинул единую теорию электромагнитных волн (1867—1873), Маркони запатентовал в Великобритании свое право на производство радиооборудования (1900 г.) [254]. Всего через пятнадцать лет (в 1977 г.) после опубликования теории ассоциации-индукции (1962 г.) Рэймонд Дамадиан совершил прорыв в медицине, создав технологию, ныне известную как магнитно-резонансная томография, или МРТ [15, p. VII; 98, p. XXV]; см. раздел 11.3, п. 1. Насколько мне известно, ни классическая мембранная теория, ни ее модификация в виде мембранных насосов, несмотря на свою гораздо более длительную историю, так и не сумели дать человечеству что-либо полезное с точки зрения понимания фундаментальных основ жизни.

При разумной и постоянной поддержке фундаментальная наука не перестанет обеспечивать человечество новыми открытиями, способными в свою очередь поддержать и защитить не только нас самих, но и всех наших «братев меньших», которым довелось жить вместе с нами на такой красивой, но такой хрупкой планете. Но нам нельзя забывать, что достижение этих целей требует не только вложений материальных, — хотя и они необходимы, — но и самоотверженного служения самого человека. Но самым необходимым всегда был и будет непрерывный приток молодых талантливых ученых, жаждущих принять участие в этом величайшем и самом захватывающем из приключений — в поиске научной истины во имя служения человечеству.

В этой книге я постарался описать взлет и крушение мембранной теории, рождение и развитие теории ассоциации-индукции, а также важные, хотя и полузабытые, альтернативные теории и эксперименты в их поддержку. Она создавалась с расчетом, чтобы читатель познакомился с моим взглядом на историю *физиологии клетки и субклеточных структур* от самого ее рождения до настоящего времени.

ГЛАВА 1.

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 p. 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, p. 393], Грю [3, p. 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, p. 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.

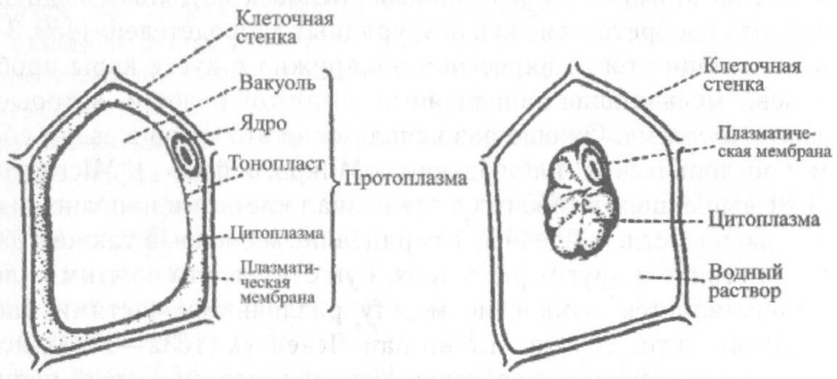


Рис. 1. Плазмолиз зрелой растительной клетки. **А** — нормальная клетка с центральной вакуолью. **Б** — протопласт, твердая клеточная оболочка, содержащая сжавшуюся в гипертоническом растворе цитоплазму с ядром и другими органеллами, заключенную в плазматическую мембрану. (По Гласстону [13])

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, p. 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, p. 4].

ГЛАВА 2.

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 немыслимо 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 мочевой пузырь свиньи, 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 мочевой 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, p. 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, p. 184—188] и Вильгельм Пфеффер (1845—1920) [15, p. 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, p. 188—189].

Движение, согласно взглядам Дютроше, было жизнью, а его прекращение — смертью. Изучая движение воды **внутрь** 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.

ГЛАВА 3.

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 Пфеффер. 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, Пфеффер 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.

Пфеффер 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 (C) или абсолютной температуре (T) соответственно [18].

Голландский ботаник Хуго де Врис (1848—1935), основоположник одной из важнейших теорий генетики — *теории мутаций* [363, p. 34], привлек к необычайным открытиям Пфеффера 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 Пфеффером 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

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

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 кал $\cdot$ град$^{-1}$ $\cdot$ 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, p. 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, p. 879], или *плазматическая мембрана*, является не только поверхностью клетки, но и покрывает любую каплю протоплазмы, пришедшую в соприкосновение с *«другим* водным раствором» [18, p. 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, p. 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, p. 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.

ГЛАВА 4.

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 клеток и проницаемости мембран

4.2. Мембранная электрических по лов Бернштейна

4.3. Теория распре ионов и мембран тенциала Доннана

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 съежившимся 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*.

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 С 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 непроникающих 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 эффектный плазмолиз, не способно преодолевать 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. Овертон, 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 набухала 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 сахароза, 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.

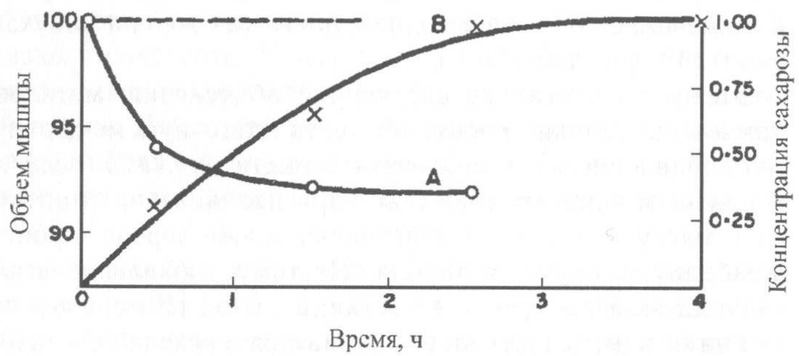


Рис. 2. Уменьшение относительного объема мышцы лягушки (в процентах от исходного, левая ось ординат) в растворе Рингера с добавлением сахарозы (4%) с течением времени инкубации (А). Поступление сахарозы в мышцу лягушки из окружающего раствора (В); внутриклеточная концентрация дана в весовых процентах 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 сахарозы и NaCl: сразу после рассечения мышечных клеток лягушки скорость проникновения в них сахарозы через рану удваивается [23]. Однако они показывают и другое — меченые молекулы сахарозы способны проникать и в *неповрежденные* мышечные клетки. В ряде других экспериментов было недвусмысленно показано, что и другие вещества, подобные сахарозе [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 ± ,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), содержавший 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 Пфеффером в его «Осмотических исследованиях» в поддержку своей теории, что *клеточные мембраны способны мгновенно образовываться при кон-*

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

Однако Пфеффер 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

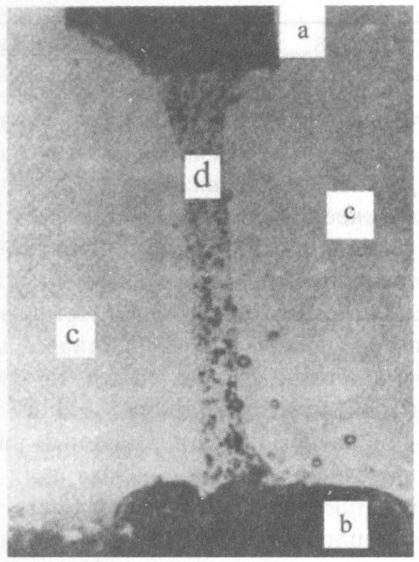


Рис. 3. Поток протоплазмы (эндоплазмы) (d) из разрезанной клетки Nitella (a) в экспериментальную среду (c). Видно, как протоплазма оседает на дно кюветы в виде сплющенной капли (b). Фотография сделана через 5 минут после повреждения клетки. Такие капли эндоплазмы могут сохраняться в течение 10—50 часов в среде, содержащей 80 мМ KNO_3, 50 мМ NaCl и 4 мМ $Ca(NO_3)_2$. (По Куроде [63]).

с водой, подобно маслу. Пфеффер 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, p. 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, опровергнут. 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, p. 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, p. 542]. В этой теории постоянную трансмембранную разность электрических потенциалов нервной или мышечной клетки в состоянии покоя, ранее известную как *потенциал покоя или повреждения* [15, p. 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 Пфеффера [3]. Это умолчание — начало фрагментации физиологических наук (см. эпилог) и последующего разделения физиологии на физиологию растений, представленную работами Пфеффера со зрелыми растительными клетками, и физиологию животных, представленную 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

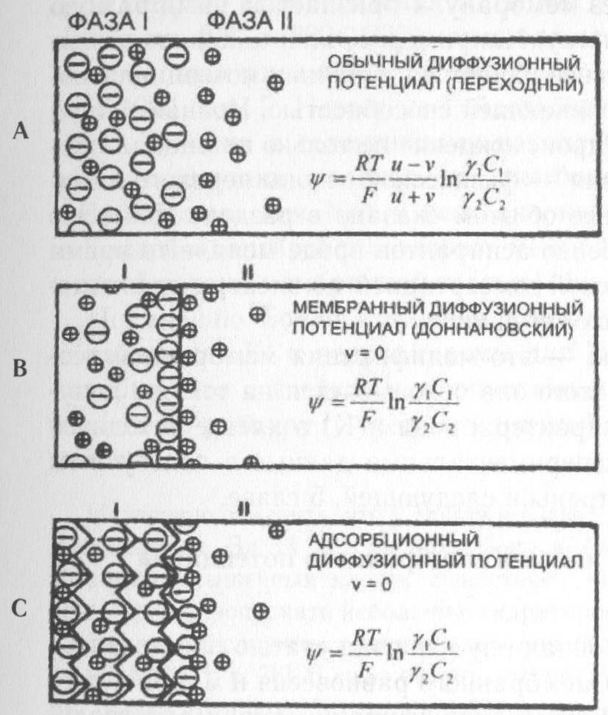


Рис. 4. Иллюстрация трех типов электрических потенциалов (ψ): А — обычный диффузионный потенциал; В — постоянный мембранный потенциал по Доннану; С — постоянный адсорбционный потенциал. ⊕ — свободный одновалентный катион; ⊖ — свободный одновалентный анион (на панелях А и В) и фиксированный одновалентный 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, p. 68—73; 107, p. 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 величины 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, p. 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, p. 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, p. 78]. В свою очередь, теория Монда и Амсона была развитием теории Леонора Михаэлиса, объяснявшей избирательность коллодиевой 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, p. 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, p. 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 способом, 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.

ГЛАВА 5.

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

5.1. Первые свиде
ства свободного со
ния воды в клетке
5.2. Первые свиде
ства свободного со
ния клеточного K^+

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, p. 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

В 1930 году лауреат Нобелевской премии Арчибальд Хилл (1886—1977) обнаружил, что мочевина 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, p. 526]. О важности этой работы говорит замечание другого Нобелевского лауреата, Бернарда Катца, которое мы находим в его работе “Nerve, Muscle and Synapse” [237, p. 42—44]:

«...Эрнст, Трошин и Линг утверждают, что большая часть внутренних отрицательных зарядов принадлежит протеинатам 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 протеинатами. (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 малоправдоподобной 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 двухкратное уменьшение коэффициентов их диффузии обусловлено наличием механических преград внутри мышечной клетки. Казалось 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 $0{,}9\times10^7$ 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*.

ГЛАВА 6.

КОЛЛОИД — БЕСЦЕННЫЙ ДАР ХИМИКОВ

**ллоидная систе-
к убедительная
протоплазмы**

ацерваты

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 p. 183] — тот самый пост, который некогда занимал сам Исаак Ньютон (до конца XVII века) [464, p. 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, p. 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 котрого становятся заметными взвешенные частицы» [54, p. 472]. Это явление, известное как эффект Тиндаля, легло в основу устройства оптического прибора — *ультрамикроскопа* [64, p. 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, p. 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, p. 5]. В свою очередь, Вольфганг Оствальд (1883—1943) установил следующий диапазон размеров коллоидных частиц: от 10 до 10 000 Å [65, p. 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, p. 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 *со* — 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, p. 185, p. 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, p. 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, p. 249] — то есть «не связанной макромолекулами» [61, p. 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

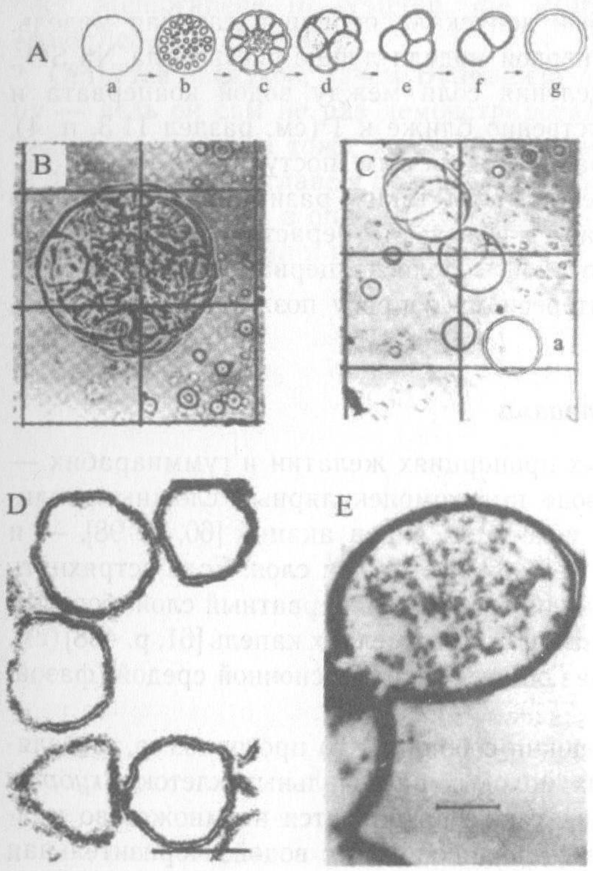


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая поэтапное возникновение *in vitro* пузырьков с бислойной мембраной, и несколько интересных микрофотографий. A. Схематическое изображение этапов образования полой сферы с бислойной мембраной (g) из отрицательно заряженной (по отношению к среде) капли комплексного коацервата желатин-гуммиарабик (a); b — первичная вакуолизация; c и d — пенистые тела — промежуточные этапы возникновения полой сферы (g). B. Микрофотография коацерватной капли на стадии пенистого тела, соответствующей стадии *c* на панели A (увеличение в 203 раза). C. Микрофотография пенистых тел в стадии *f*. Обратите внимание на двухслойную стенку полого пузырька, обозначенного буквой *a* (соответствует стадии *g* на панели A) (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 pH. Длина масштабной метки — 1 мкм, или 1000 Å. Обратите внимание, что бислойная мембрана может образовываться в смеси желатин + гуммиарабик (A, B, C); Na, K-АТФаза + холат (D); а также в протеиноидах, полученных нагреванием смесей чистых аминокислот (E). Единственное, что связывает эти три препарата, — наличие в их составе белков. (A, B и C — из данных Бунгенберг-де-Йонга [61, p. 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 $0{,}728 \times 0{,}38 = 0{,}277$) 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, p. 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, p. 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, p. 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 grundätzlich 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.

ГЛАВА 7.

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 сродством, 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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 Пфеффер и сам разделял подобную точку зрения [18, p. 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, p. 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, охарактеризованы еще недостаточно полно, чтобы можно было с уверенностью сказать, та ли это вода, которую биолог мог бы назвать связанной» [80, p. 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 Арчибальд 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 растворим 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 отреклись 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, p. 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 *Zeitschrifts für Kolloid Chemie*, *Kolloid Beihefts* и даже *Protoplasma*. Однако едва окрепшему коллоидно-протоплазматическому направлению в физиологии клетки был нанесен незаслуженный и тяжелый удар.

ГЛАВА 8.

ИТОГИ РАЗГРОМА

рская группа под
твом Енё Эрнста
нградская школа
—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 «ассимилированную 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.

ГЛАВА 9.

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 предствление 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, адсобироваться клеточными коллоидами или химически связываться с ними» [92, p. 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, p. 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 ^{86}Br — 8,2%; метод центрифугирования — 9,4% [49, p. 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, Опариным и остальными [324; 92, p. 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 мочевина 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, p. 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, p. 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, p. 20; 174, p. 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].

акже: Mat-
rotoreaction
lasm. Cell.
2005, 51(8):
Прим. ред.

ГЛАВА 10.

ТЕОРИЯ ФИКСИРОВАННЫХ ЗАРЯДОВ ЛИНГА

10.1. Теория и
тельного накопле
в присутствии Na
10.2. Эксперимент
подтверждение
(и некоторых п
ний теории АИ)

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, p. 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 °C) 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

не попытался объяснить, как белкам, — наиболее вероятным кандидатам на роль субстрата, избирательно связывающего K^+ в присутствии Na^+, — удается 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 противоионам, 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 диффузным 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, p. 769] было перекрытие электрических полей соседних фиксированных зарядов противоположных знаков. Это перекрытие — не что иное, как микроскопическая реализация так называемого *закона макроскопической нейтральности* [97, p. 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, p. 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, p. 17—28; 106, p. 152—155; 107, p. 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, p. 17—22; 107, p.40] и воды [470] в модельных системах. Вот один из них.

Керн продемонстрировал, что коэффициент активности Na^+ в растворах натриевой соли изомасляной кислоты ($CH_3CHCOOHCH_3$) 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 $(CH_2CHCOOHCH_2)_n$, — 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 β- или γ-карбоксильной группы остатков соответствующих аминокислот (кривая 2 на рис. 6). Резкое снижение относительной диэлектрической проницаемости среды при

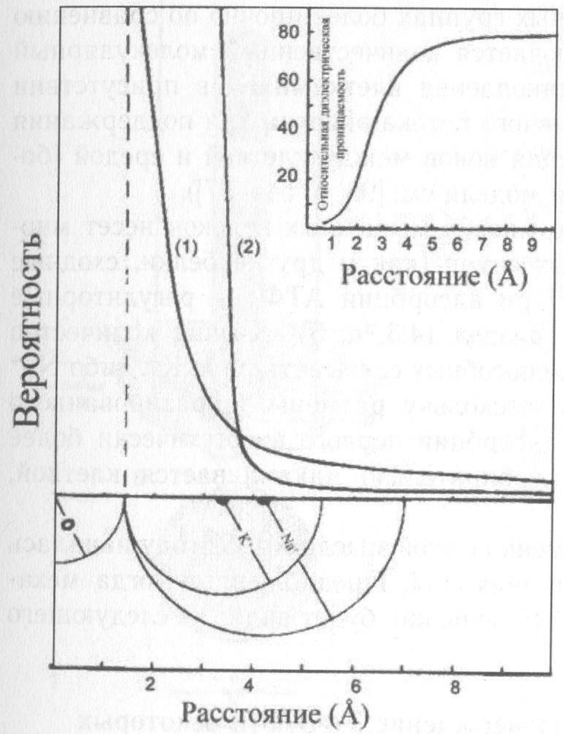


Рис. 6. Схема, объясняющая природу избирательной адсорбции K^+ в присутствии Na^+ фиксированным анионом. Эта модель впервые представлена в 1952 году как составная часть теории фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ). При расчетах учтено не только расстояние между зарядами, но и снижение относительной диэлектрической 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 (О, в левом нижнем углу графика) в зависимости от расстояния между их центрами (в Å, ось абсцисс). О — кислород карбоксильной группы остатка бикарбоновой 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, напомню, 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, p. 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, p. 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 цитоплазма 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

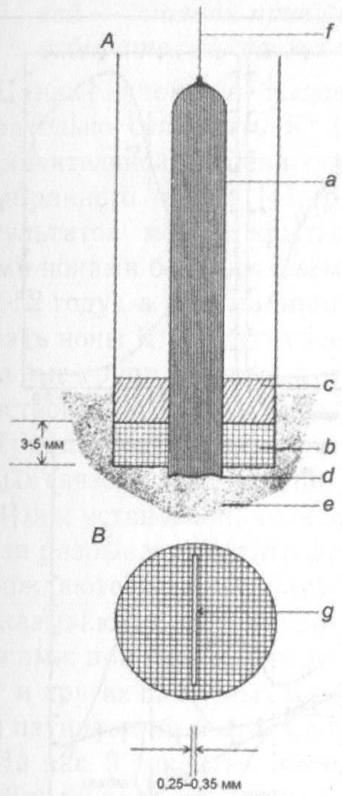


Рис. 7. Препарат безнасосной незамкнутой клетки (БНК), приготовленный из портняжной мышцы лягушки (дистальный конец внизу). A — вид сбоку; B — вид снизу. Лишь рассеченный конец (d) портняжной мышцы (a) находится в контакте с радиоактивно меченым раствором Рингера (e). Рассеченная мышца одним концом плотно 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

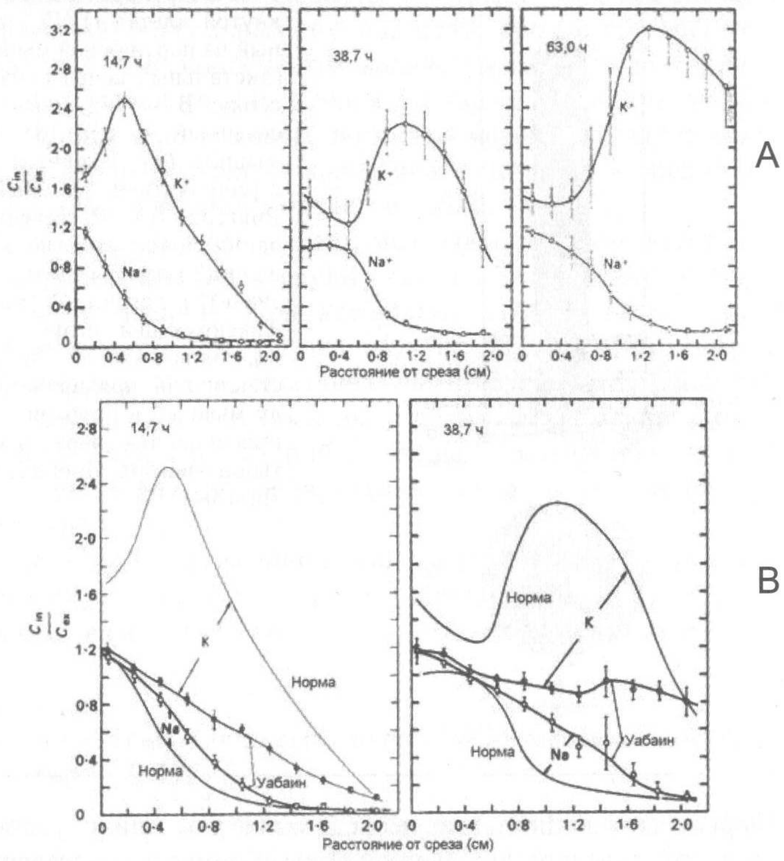


Рис. 8. Изменение внутриклеточного содержания меченых ионов K^+ и Na^+ в зависимости от расстояния от места среза (ось абсцисс) в препаратах «безнасосных незамкнутых клеток» (БНК, рис. 7) портняжных мышц лягушки. Измерения проводили по окончании инкубационного периода, продолжительность которого при температуре 25 °С 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} М). На оси ординат отложено отношение концентрации меченого K^+ или Na^+ внутри клетки (C_{in}) 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, p. 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, p. 774—781; 107, p. 37, n4].

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].

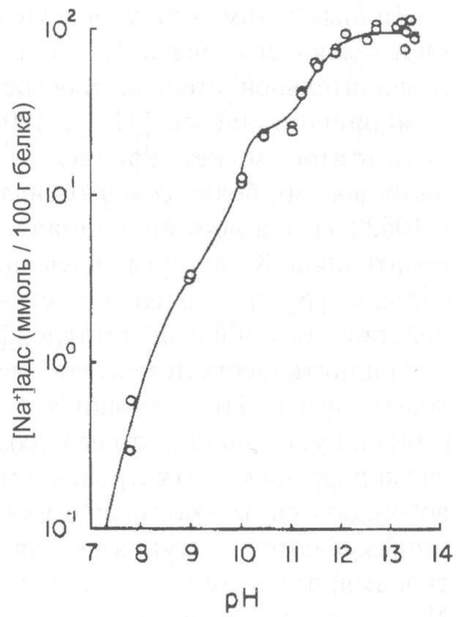


Рис. 9. Количественная связь между числом фиксированных катионов гемоглобина, нейтрализованных анионами OH^-, и количеством адсорбированного Na^+. При увеличении pH (раствор гемоглобина титровали раствором NaOH) увеличивается количество разорванных солевых связей между фиксированными противоионами (фиксированные 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, p. 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 освобождать 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, p. 244]. Возникает законный вопрос: не было ли методических различий между экспериментами Хёбера (и его сторонников) и опытами Ходжкина—Кейнеса—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, p. 523].

На рис. 8А можно легко выделить область повреждения вблизи среза и заметить, как она расширяется со временем (см. также [86, p. 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 М. В мышцах же, отравленных метаболическим ядом иодацетатом натрия, D_K ненамного 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

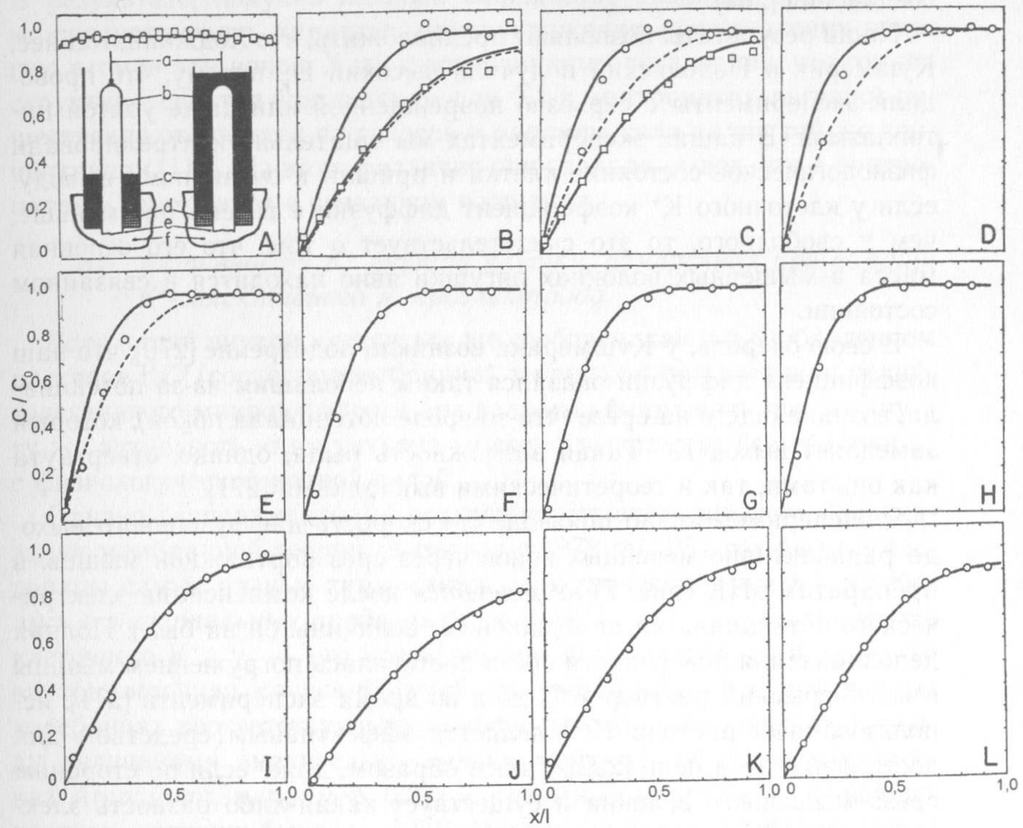


Рис. 10. Диффузионный выход меченого K^+ из мышечных волокон живых (B—H) и убитых метаболическим ядом (I—L) портняжных мышц лягушки в физиологический раствор без метки (выход осуществлялся только через поверхность поперечного среза препарата БНК). На оси ординат — отношение остаточной концентраций (C) меченого K^+ (панели A—L) или тритиевой воды (панели A—C) 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 A 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 A, 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 B—E 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 метаболическим ядом иодуксусной кислотой, 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, p. 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 *Amphiuma*, 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, p. 1220—1222], а это означает, что десорбция K^+ может быть незначительной, значительной или не происходить вовсе; масштабы разрушения структурированной воды при повреждении

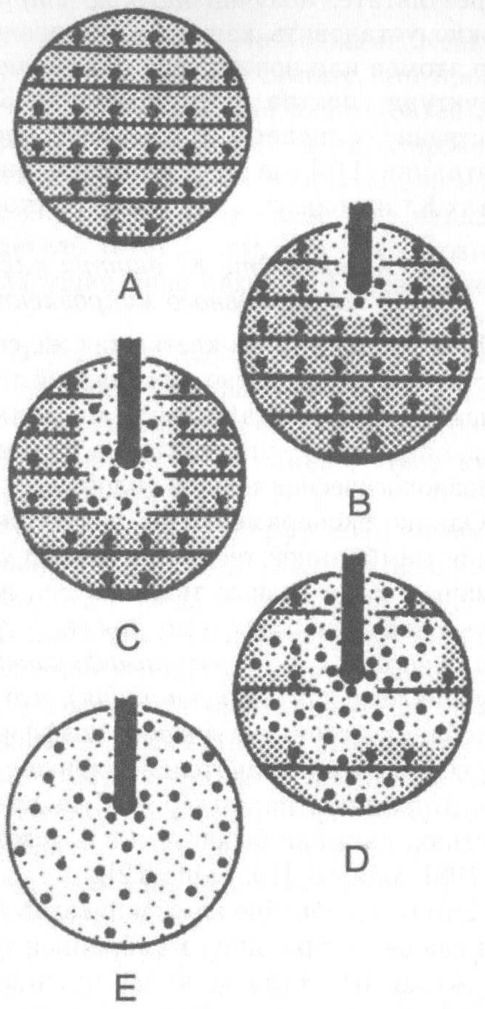


Рис. 11. Схема, поясняющая разнобой в результатах измерения *активности* K^+ (a_K) во внутриклеточной среде с помощью K^+-селективных микроэлектродов, показанных черными вертикальными полосками с закругленным нижним концом. В результате применения этого инвазивного метода может иметь место локальное 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, освободившиеся от связи с белками в результате повреждения. A. Цитоплазма в состоянии покоя со связанной водой и адсорбированным K^+. Активность K^+ низкая. B. 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 $a_K \approx C_K$. C. 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 $a_K \approx C_K$. 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 C, 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 $a_K \approx C_K$. (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

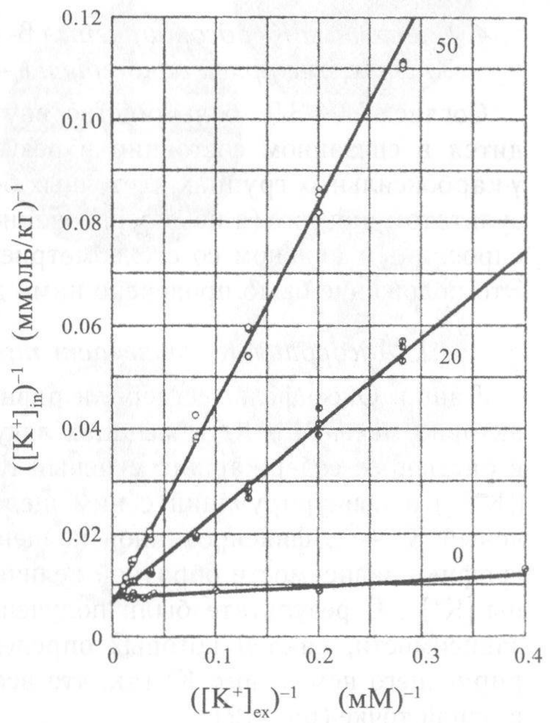
Линг и Оксенфельд измерили равновесные концентрации радиоактивно меченного K^+ в мышцах лягушки ($[K^+]_{in}$), инкубированных в растворах, содержавших меченый K^+ в различных концентрациях ($[K^+]_{ex}$) и конкурирующий с ним щелочной ион — допустим, немеченый K^+ — в фиксированной концентрации. Затем 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, p. 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 A11 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, p. 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^+).

Зависимость содержания меченого K^+ ($[K^+]_{in}$) е от концентрации метки в среде ($[K^+]_{ex}$) новесных условиях (показаны обратные ы этих параметров) в присутствии 0, 20 и немеченого K^+ (и меченый, и немеченый K^+ овали в форме ацетата) при 24 °С. Мышцы али меткой в течение 26 часов. Величина, я равновесной внутриклеточной концен- меченого K^+, обозначена $([K^+]_{in})^{-1}$ и исчис- в обратных единицах миллимоль иона на рого веса мышц: (ммоль/кг)$^{-1}$. Величина, я концентрации меченого K^+ в среде, обо- $([K^+]_{ex})^{-1}$ и исчисляется в обратных едини- ллимоль/л: мМ$^{-1}$. Каждая точка соответ- данным исследования одной портняжной лягушки. Экспериментальные данные ап- ированы линейными функциями, рассчи- и методом наименьших квадратов. Общее ание K^+-адсорбирующих центров в мышце, анное по экспериментальным данным, ва- от 137 до 154 ммоль/кг сырого веса мышц. енная таким образом средняя константа ции K^+ равна 665 (моль/л)$^{-1}$. Подробности . (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 *«один-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-

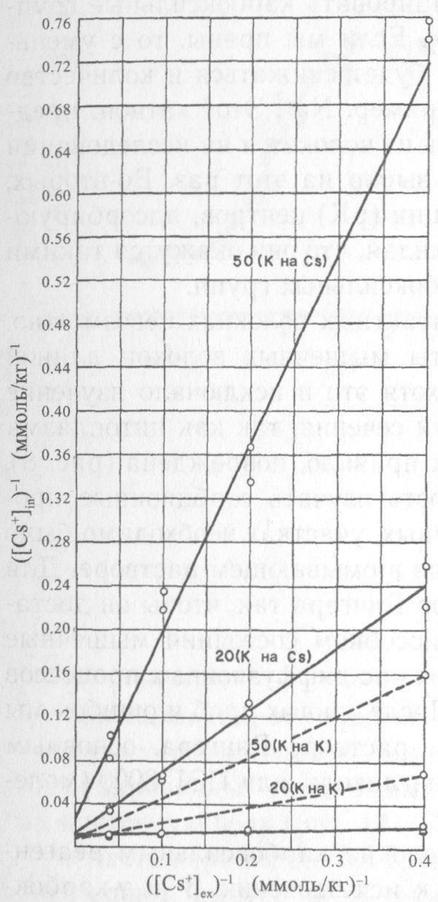


Рис. 13. Зависимость содержания меченого Cs^+ в клетке ($[Cs^+]_{in}$ в ммолях/кг сырого веса мышц) от концентрации меченого Cs^+ в среде ($[Cs^+]_{ex}$) в присутствии 0 (самая нижняя прямая), 20 и 50 мМ (сплошные линии) немеченого K^+ (использовали ацетаты) при 24 °С (на осях указаны обратные величины концентраций). Мышцы нагружали меткой в течение 45 часов. Каждая точка соответствует данным исследования одной портняжной 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(K 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,

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, p. 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^+).

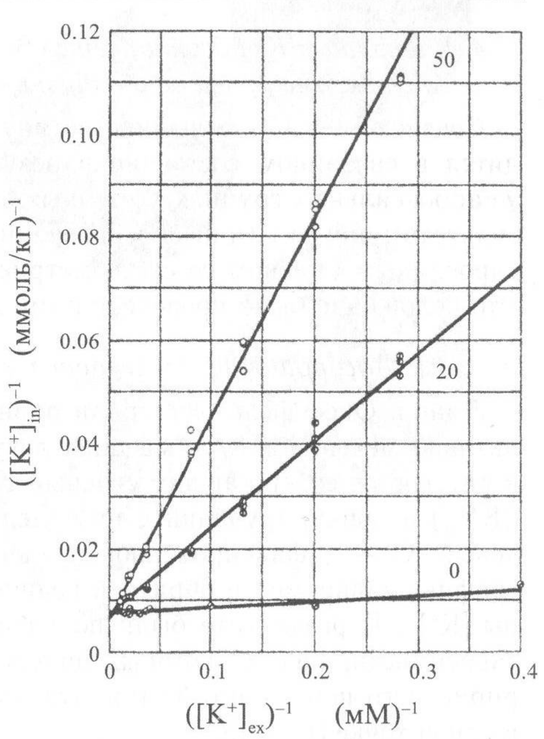


Рис. 12. Зависимость содержания меченого K^+ ($[K^+]_{in}$) в клетке от концентрации метки в среде ($[K^+]_{ex}$) в равновесных условиях (показаны обратные величины этих параметров) в присутствии 0, 20 и 50 мМ немеченого K^+ (и меченый, и немеченый K^+ использовали в форме ацетата) при 24 °С. Мышцы нагружали меткой в течение 26 часов. Величина, обратная равновесной внутриклеточной концентрации меченого K^+, обозначена $([K^+]_{in})^{-1}$ и исчисляется в обратных единицах миллимоль иона на 1 кг сырого веса мышц: (ммоль/кг)$^{-1}$. Величина, обратная концентрации меченого K^+ в среде, обозначена $([K^+]_{ex})^{-1}$ и исчисляется в обратных единицах миллимоль/л: мМ$^{-1}$. Каждая точка соответствует данным исследования одной портняжной 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 (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 *«один-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-

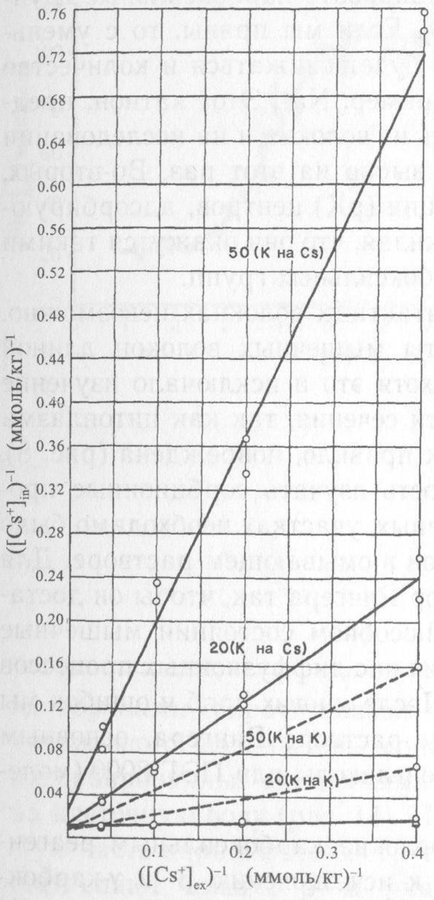


Рис. 13. Зависимость содержания меченого Cs^+ в кл
($[Cs^+]_{in}$ в ммолях/кг сырого веса мышц) от концентраци
ченого Cs^+ в среде ($[Cs^+]_{ex}$) в присутствии 0 (самая ни
прямая), 20 и 50 мМ (сплошные линии) немеченого K^+
пользовали ацетаты) при 24 °С (на осях указаны обратны
личины концентраций). Мышцы нагружали меткой в теч
45 часов. Каждая точка соответствует данным исследов
одной портняжной мышцы лягушки. Эксперимента
данные аппроксимированы линейными функциями, п
метры которых получены методом наименьших квадр
Данные, показанные пунктирными линиями, взяты из ри
для сравнения; обозначение «50(K на Cs)» следует чи
распределение меченого Cs^+ в присутствии 50 мМ нем
ного K^+ в среде. Сравнение данных показывает, что в
ние одной и той же концентрации немеченого K^+ (напри
50 мМ) на адсорбцию меченого K^+ и меченого Cs^+ р
отличается. Вычисленная по данным одной из серий
тов (кажущаяся) константа адсорбции Cs^+ соста
488 (моль/л)$^{-1}$. Для сравнения см. подпись к рис. 12.
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 карбодиимид, 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 карбодиимида). 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 — карбодиимидом — приведет к исчезновению β- и γ-карбоксильных групп, вместе с которыми исчезнут центры связывания K^+ и Na^+. На деле же карбодиимид оказался столь токсичным для мышечных волокон, что пришлось ограничиться временем экспозиции, достаточным для выхода только половины адсорбированного Na^+ [107, p. 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 Tl^+, 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 карбодиимида. В самом деле, ведь карбодиимид 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 группами* сократительных белков [116, p. 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 карбодиимидом, составляют именно β- и γ-карбоксильные группы, участвующие, по нашему представлению, в сорбционных процессах.

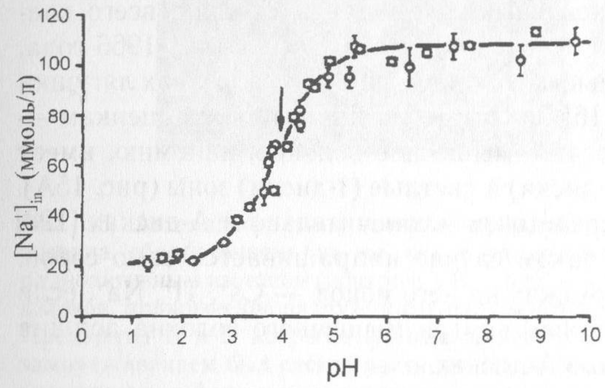


Рис. 14. Поглощение меченого Na^+ двухмиллиметровыми сегментами мышечных волокон (с открытыми, без мембран, концами) при различных pH (0 °C). Концентрация ПЭГ-8000 в инкубационной среде — 16,7%. Каждая точка соответствует среднему значению по данным исследования 4 образцов ± стандартная ошибка. При pH 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]).

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, p. 112].

Итак, и pK карбоксильных групп, и данные экспериментов по их модификации карбодиимидом 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, p. 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 (A-диски) и светлые (I-диски) зоны (рис. 15A). Известно, что миозин сосредоточен исключительно в A-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 A-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 A-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 авторадиограммы, но и контрастные электронно-микроскопические снимки (клеточные структуры, содержащие эти сравнительно тяжелые элементы лучше рассеивают электронный луч микроскопа).

На рис. 15, на панелях B, C и D воспроизведены авторадиограммы 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 A-дисками. Это особенно хорошо видно на снимках B и C, где только *часть* мышечного волокна была покрыта фотоэмульсией [124].

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

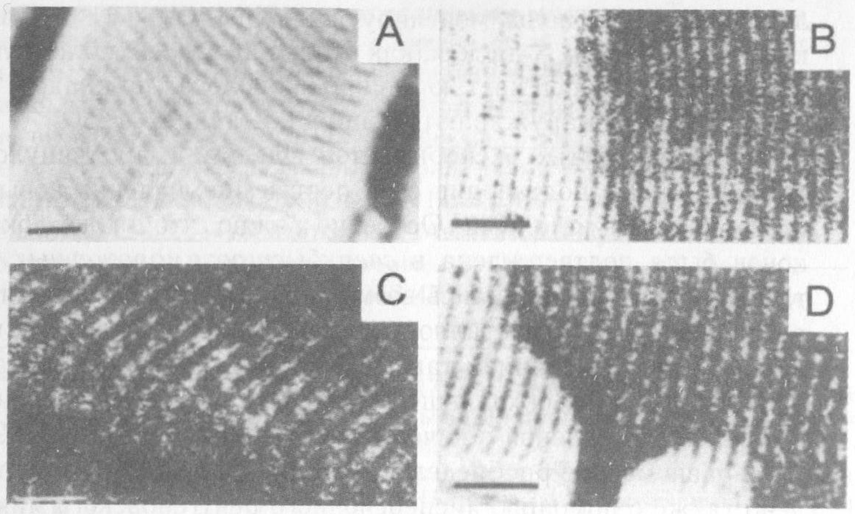


Рис. 15. Авторадиограммы лиофилизированных мышечных волокон. A. Фрагмент мышечного волокна, обработанного так же, как и остальные показанные здесь волокна, но не нагруженного радиоактивным изотопом (контроль). B, C и D — авторадиограммы лиофилизированных мышечных волокон, прижизненно нагруженных радиоизотопом ^{134}Cs непосредственно перед замораживанием. Препараты B и D покрыты фотоэмульсией (темные области) не полностью. Препарат B перед замораживанием был слегка растянут. На снимках B и D можно заметить, что зерна серебра, образующиеся в фотоэмульсионном слое над структурами, содержащими радиоактивные элементы, формируются именно над A-дисками. Если присмотреться, можно обнаружить, что зерна серебра в некоторых проекциях A-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]).

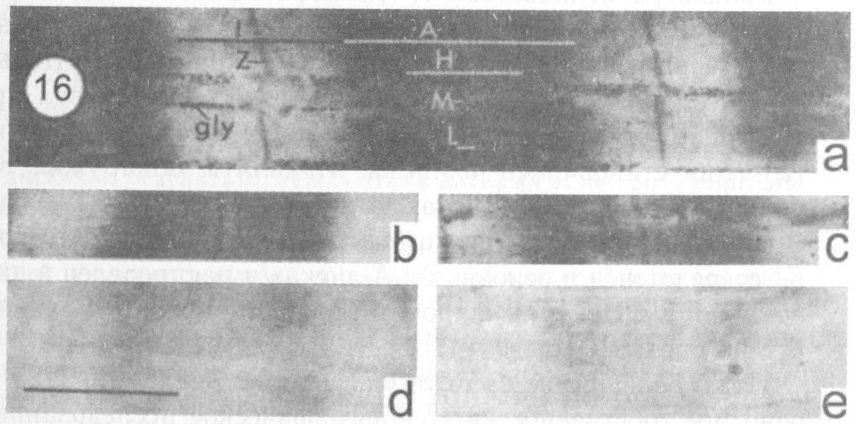


Рис. 16. Электронные микрофотографии тонких срезов лиофилизированных препаратов волокон портняжной мышцы лягушки, не подвергавшихся обычной фиксации солями тяжелых металлов. Перед замораживанием (с последующей лиофилизацией и заливкой) волокна были нагружены Cs^+ (a) и Tl^+ (b, c) в физиологических условиях. Препарат «c» был получен после часовой экспозиции среза волокна в физиологический раствор с ионами Tl^+ при комнатной температуре. (d) — центральная часть препарата (a) после вымачивания в дистиллированной воде в течение 2 дней; (e) — снимок среза, приготовленного из интактного мышечного волокна. A — A-диск; H — H-зона; M — M-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 микрокристаллов 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 Зглиницки [433] (о несостоятельности критики этих работ со стороны группы Сомлио [434] см. [432] и [107, p. 48]). На основе экспериментальных данных фон Зглиницки, исследовавшего тонкие срезы сердечной мышцы, Линг и Оксенфельд пришли к выводу, что от 67 до 80% β- и γ-карбоксильных 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 микрокристаллы 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 авторадиографическое исследование, дисперсионный рентгеновский микроанализ Тромбиташа и Тидьи-Шебеша, фон Зглиницки 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, p. 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, p. 437—454; 15, Ch. 16; 122]. В этой модели 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.

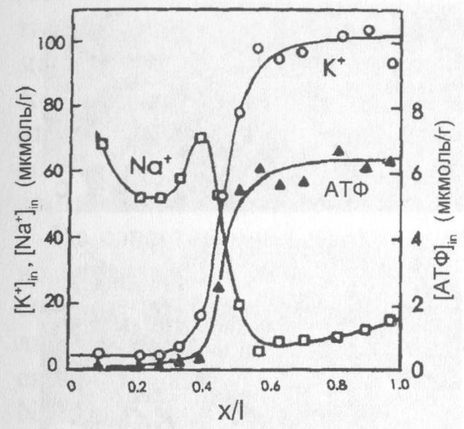


Рис. 17. Распределение K^+, Na^+ и АТФ вдоль портняжной мышцы лягушки на разном удалении «x» от разреза (в долях от 1, за которую принята длина «l» усеченной мышцы). Данные получены при исследовании препарата БНК (рис. 7) по истечении 50 часов стерильной инкубации при 25 °С. Раствор Рингера, омывающий усеченный конец мышцы, исходно содержал 100 мМ Na^+, 2,5 мМ K^+ и 1 мМ 2,4-динитрофенола. Содержание K^+ и Na^+ (в мкмолях на грамм сырого веса) определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии, уровень АТФ (в мкмолях 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]).

Идея Ментен получила экспериментальное подтверждение. Во-первых, демонстрацией обратимого высвобождения K^+ при каждом цикле сокращения сердечной мышцы черепахи (Уайльд и О'Брайен [390; 142, p. 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, p. 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 (c) и (d) обозначены электронно-микроскопические снимки срезов, которые по удаленности от усеченного конца и сроку экспо-

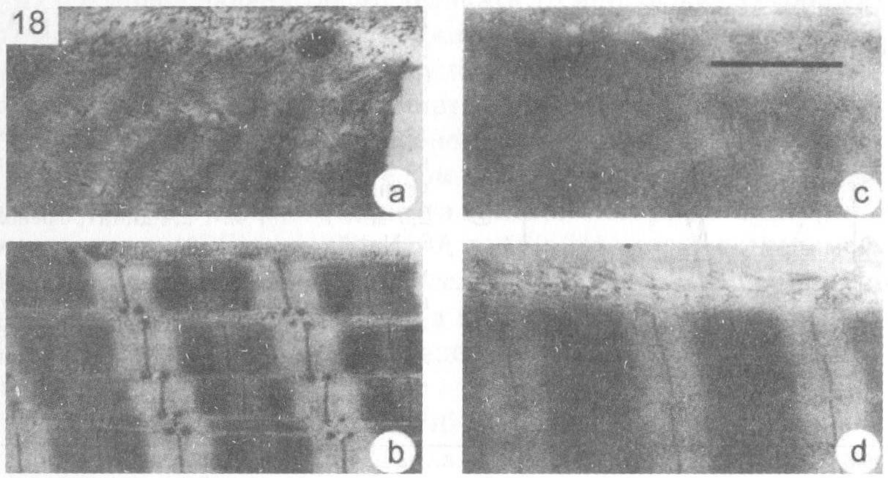


Рис. 18. Электронные микрофотографии срезов (0,2 мкм) мышечного волокна лягушки, располагавшихся вблизи (a, c) и на некотором удалении (b, d) от места усечения мышцы (препарат БНК); a — препарат, «окрашенный» солями урана и свинца по обычной методике (раневая поверхность видна у верхнего края фотографии); b — участок, удаленный от разреза на 0,4 мм и приготовленный так же, как и препарат a; c и d — препараты, приготовленные методом «адсорбционного окрашивания» Эдельмана из тех же участков волокна, что и препараты a 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 a) вплоть до полного отсутствия связывания, что видно в верхней части этого препарата. Столь же диффузно связывается с клеточными структурами и Cs^+ (препарат c). 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 A-дисках (препараты b и d). (По Эдельману [129]).

зиции усеченной мышцы в соответствующем растворе аналогичны соответственно препаратам (a) и (b). Однако препараты (c) и (d), в отличие от (a) 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 A-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 A-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-карбоксильных 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 десятью 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 удается 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;

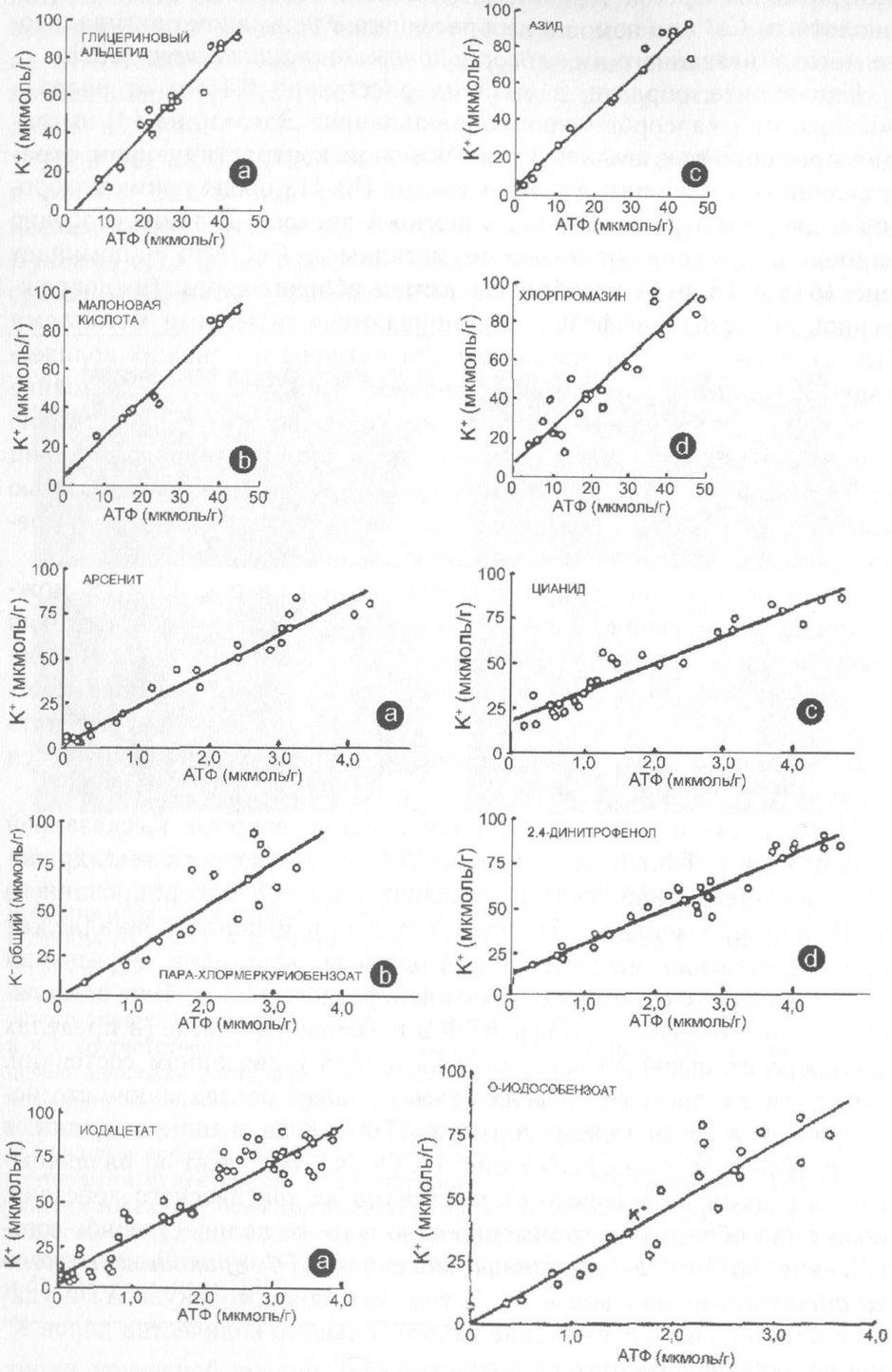


Рис. 19. Корреляционная связь между равновесными концентрациями K^+ и АТФ в мышцах лягушки, подвергнутых действию разных токсинов (инкубация при 25 °С). Инкубационный раствор с мышцами, помещенный в колбу Эрленмейера, постоянно перемешивали с помощью шейкера с частотой 150 колебаний в мин. Продолжительность 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 H-зоной и краем A-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.

ГЛАВА 11.

ТЕОРИЯ МНОГОСЛОЙНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОЛЯРИЗОВАННОЙ ВОДЫ В КЛЕТКЕ

ия вопроса
я многослойной
ии поляризован-
клетке и ее ми-
нание
йствия теории
теории и прак-
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, p. 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, p. 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, p. 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, p. 271—310; 107, p. 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 динамичного характера, возникающую главным образом благодаря взаимодействию воды с сетью «полноразвернутых» белковых цепей, присущей 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, p. 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 *динамичной 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 лишний 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 системах, 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 поляризация), несколько превышающим дипольный момент молекул объемной воды.

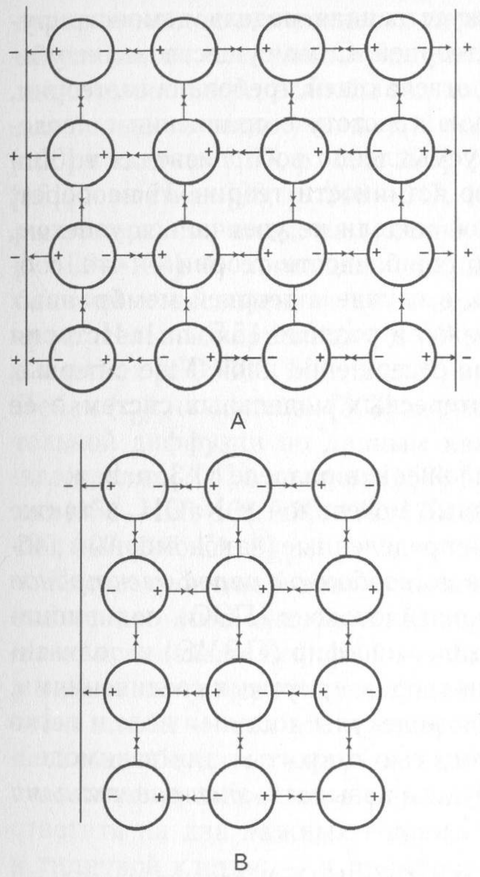


Рис. 20. Возникновение многослойной структуры поляризованной воды (кружки) под влиянием линейного матрикса из цепей полимера с чередующимися положительно и отрицательно заряженными фиксированными центрами (NP-система). Водные структуры, образовавшиеся на параллельно расположенных поверхностях (NP–NP-поверхность, не показана; ее плоскость перпендикулярна плоскости страницы) с чередующимися в шахматном порядке положительно и отрицательно заряженными фиксированными центрами (панель A) могут объединяться с образованием более толстых слоев поляризованной воды. На панели B 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]).

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, p. 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, p. 131—133] — такие, как полиэтиленоксид (ПЭО), поливинилпирролидон (ПВП), поливинилметиловый 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, p. 132; 481, p. 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 n-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, p. 101; 296]; 2) набухание и сжатие: на моделях [161] и клетках [98, p. 246—247; 159; 199]; 3) понижение температуры замерзания воды: на моделях [162; 389] и клетках [297; 298; 107, p. 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, p. 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 портняжной 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-образною кривую. Вначале она идет круто вверх, затем следует плато, переходящее во второй крутой подъем [532, p. 364—369]. Прежде этот второй подъем поглощения в области предельных значений парциального давления объясняли *капиллярной конденсацией* [532, p. 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, p. 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 °C равновесную сорбцию воды тонкими пучками мышечных волокон, выделенных из изолированных портняжных 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, p. 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.

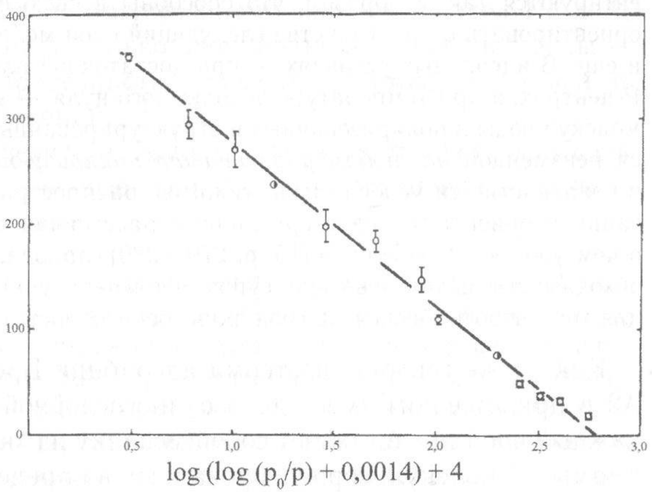


Рис. 21. Сорбция воды пучками изолированных мышечных волокон лягушки при различном относительном давлении пара (p/p_0), где p — парциальное давление пара, а p_0 — давление насыщенного пара в этих же условиях (25 °C). Приведенные данные — обобщенное представление свойств 95% всей воды мышечных волокон, 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, образующие многослойную динамичную 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 — CO 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 входящих 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, p. 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, p. 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 Fonar, 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 Fonar 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 Fonar 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 Fonar.

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, p. 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 себой 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 CO 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 двухмерную 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» Пфеффера [18]. Он искренне верил, что протоплазма обладает способностью мгновенно образовывать новую мембрану, как только приходит в соприкосновение с «другим водным раствором» [18, p. 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 °C), как и в растворе желатина, возникают коацерваты [15, p. 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, p. 8; 425; 156, p. 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, p. 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, p. 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, p. 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 обратится 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

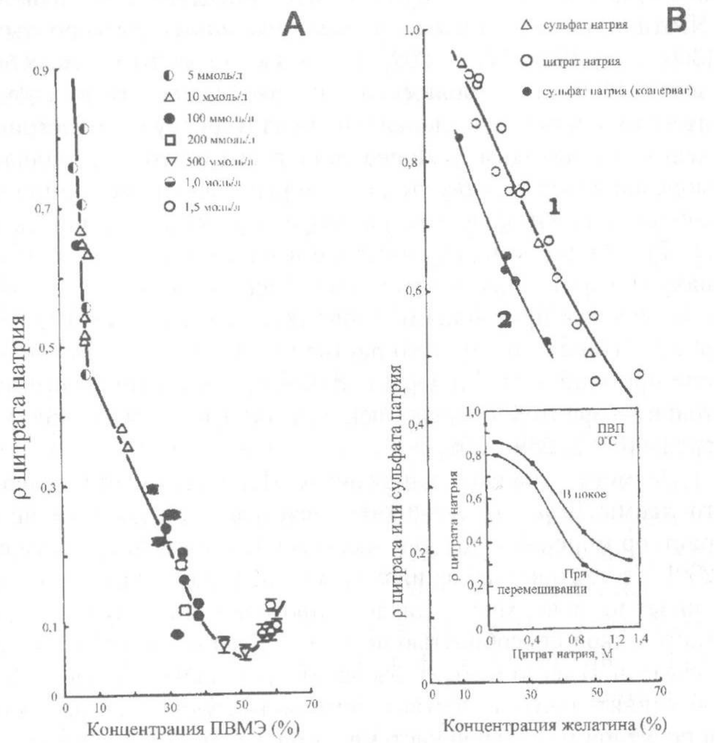


Рис. 22. Кажущийся коэффициент равновесного распределения (ρ) цитрата или сульфата натрия между содержимым диализного мешка и средой. Содержимое диализных мешков представляло собой растворы поливинилметилового эфира (ПВМЭ) (А) или желатина (В) в различных концентрациях. На панели А разными значками обозначена 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 от концентрации желатина 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 перекатываниями 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 закрепляли 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 Моддерманом [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 полноразвернутые 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, p. 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, p. 8; 425; 156, p. 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, p. 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 сродством 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, p. 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 неудовольствия химией. Теория о существовании многослойной структуры

связанной воды с усиленной поляризацией ее молекул (см. раздел 11.2) предложила разумный физико-химический механизм *сродства* 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

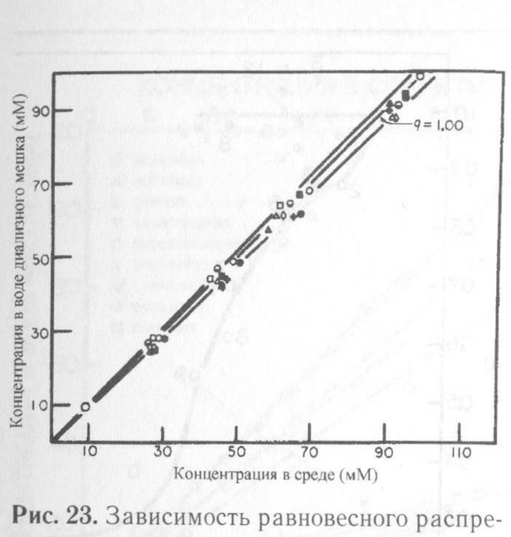


Рис. 23. Зависимость равновесного распределения веществ между диализным мешком (с раствором нативного бычьего гемоглобина, 39 ± 1%) и омывающим раствором от их концентрации в среде. Диализ проводили в течение 5 дней при температуре 25 °С. Внешний раствор на основе 0,4 М NaCl содержал: этиленгликоль ●, глицерин Δ, эритрит □, D-ксилозу +, сорбит ▲, маннит ◇, трегалозу ■, раффинозу ○. (По Лингу и Ху [170]).

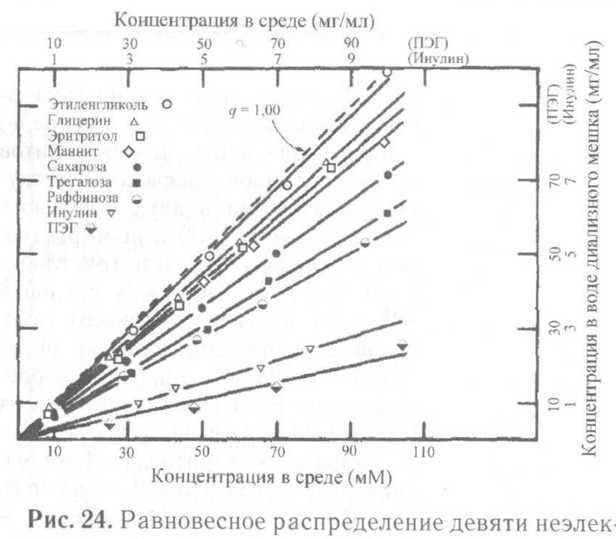


Рис. 24. Равновесное распределение девяти неэлектролитов между диализным мешком, содержащим 18%-ный раствор бычьего гемоглобина, денатурированного обработкой раствором 0,4 М NaOH. Диализ проводили в течение 5 дней при температуре 25 °С. (По Лингу и Ху [170]).

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 М 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 внутрибелковых солевых связей все β- и γ-карбоксильные 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-

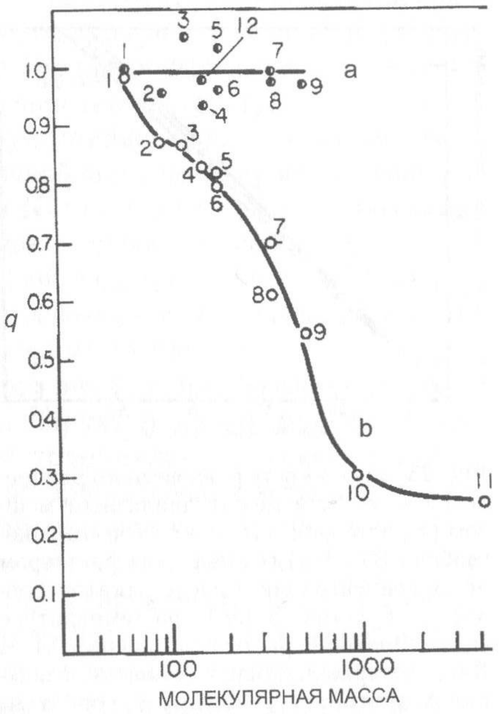


Рис. 25. Зависимость истинных коэффициентов равновесного распределения (q) различных неэлектролитов от молекулярной массы соответствующего вещества в двух модельных системах: между 39%-ным раствором нативного бычьего гемоглобина и средой (a), и между средой и 18%-ным раствором бычьего гемоглобина, денатурированного 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 a) 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, Ню и Оксенфельд исследовали равновесное распределение 21 неэлектролита между *изолированными мышцами лягушки* и средой при 0 °C [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.

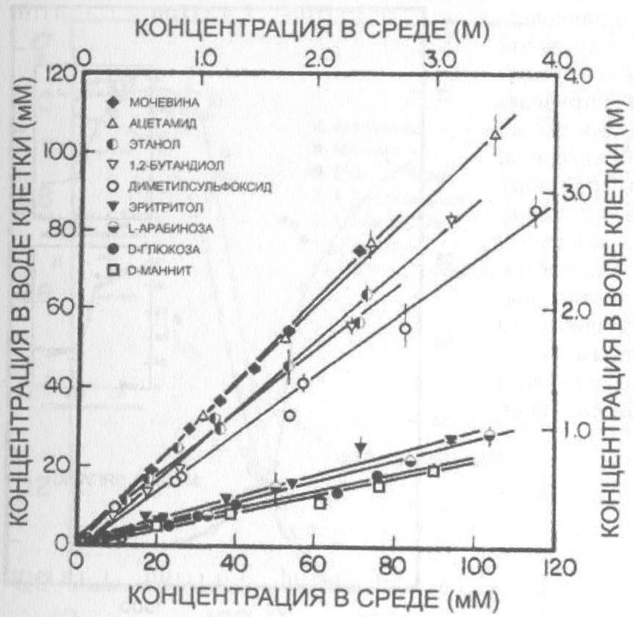


Рис. 26. Равновесное распределение 9 неэлектролитов между мышечными волокнами лягушки *Rana pipiens pipiens* и средой при 0 °C. Каждая точка соответствует среднему значению, полученному, по меньшей мере, из четырех образцов (показана стандартная ошибка измерения). Инкубационный период, необходимый для 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]).

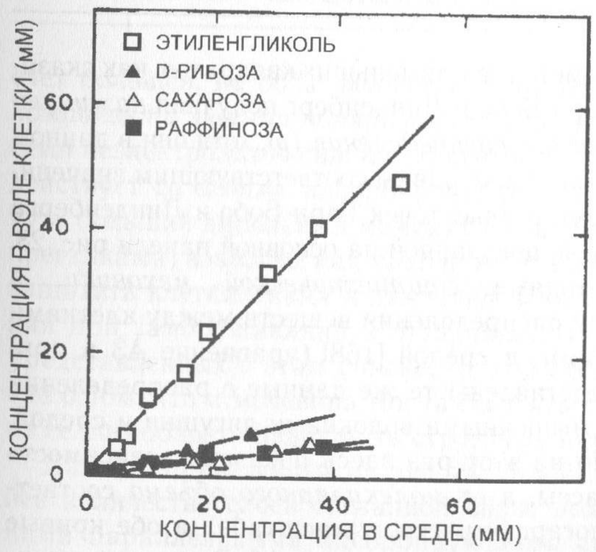
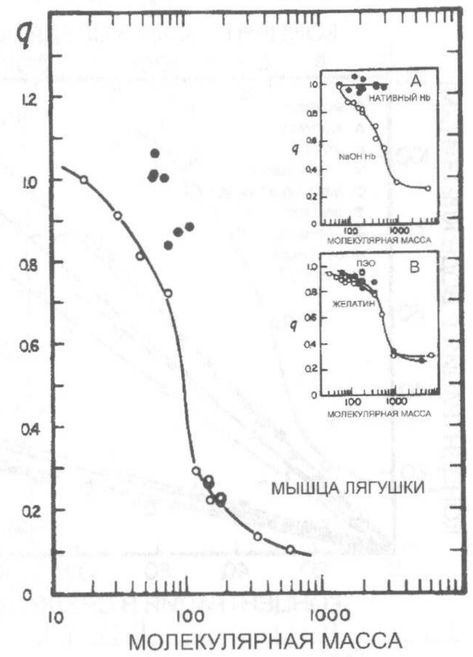


Рис. 27. Равновесное распределение 4 неэлектролитов между водой мышечных волокон лягушки *Rana pipiens pipiens* и средой при 0 °C. 24-х часов инкубации оказалось достаточным для достижения диффузионного равновесия. Подробности см. в подписи к рис. 26. (По Лингу и др. [156]).

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-



. 28. Зависимость истинных коэффициентов равновес-
распределения (q) 21 неэлектролита между водой
шечных волокон лягушки *Rana pipiens pipiens* и средой
0 °C от их молекулярной массы. На врезке А приведе-
для сравнения зависимости q, полученные для тех же
тектролитов в системах раствор гемоглобина/среда:
мая — для нативного гемоглобина (39%-ный раствор),
бразная кривая — для гемоглобина, денатурирован-
NaOH. На врезке В представлены те же зависимо-
(q от молекулярной массы), полученные для систем
-ный желатин/среда [351] и 15%-ный полиэтиленок-
/среда. Данные, полученные для желатина (показаны
ными кружками на основной панели и светлыми — на
зке В) являются скорее кажущимся коэффициентом
пределения (ρ), а не истинным (q); об этом см. текст.
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

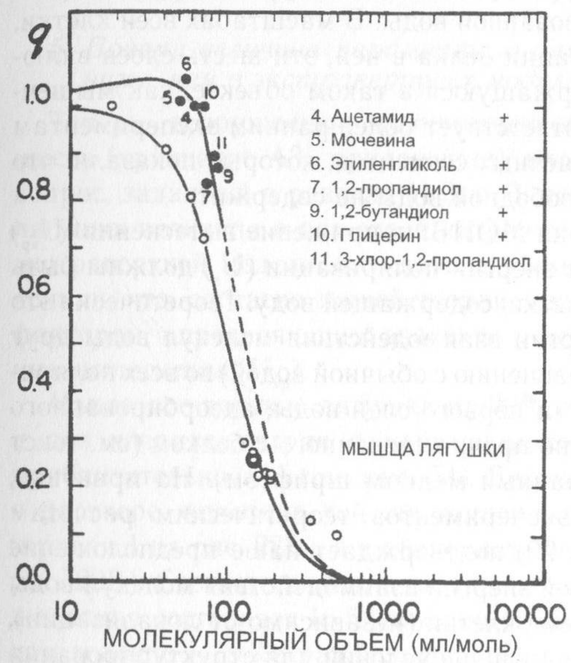


Рис. 29. Зависимость коэффициентов равновесного распределения (q) 21 неэлектролита между водой мышечных волокон и средой от их молекулярного объема. Представлены те же экспериментальные данные, что и на рис. 28 (верхняя кривая построена по данным работы [351], см. рис. 28). Аналитическим выражением для 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, p. 201], см. также рис. 20А. В целом, полученные результаты *подтверждают*

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-

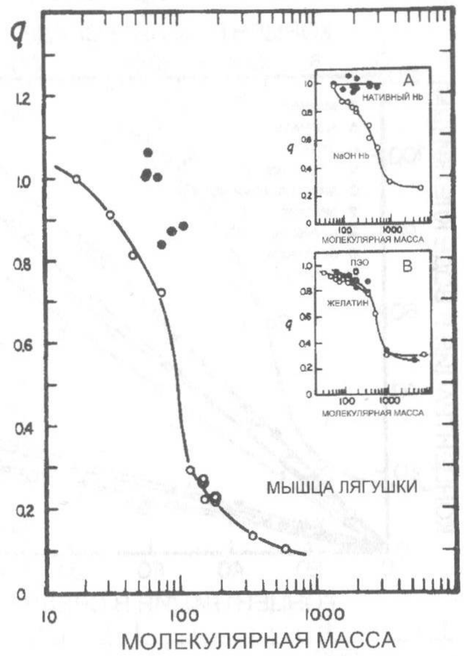


Рис. 28. Зависимость истинных коэффициентов равновесного распределения (q) 21 неэлектролита между водой мышечных волокон лягушки *Rana pipiens pipiens* и средой при 0 °C от их молекулярной массы. На врезке А приведены для сравнения зависимости q, полученные для тех же неэлектролитов в системах раствор 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

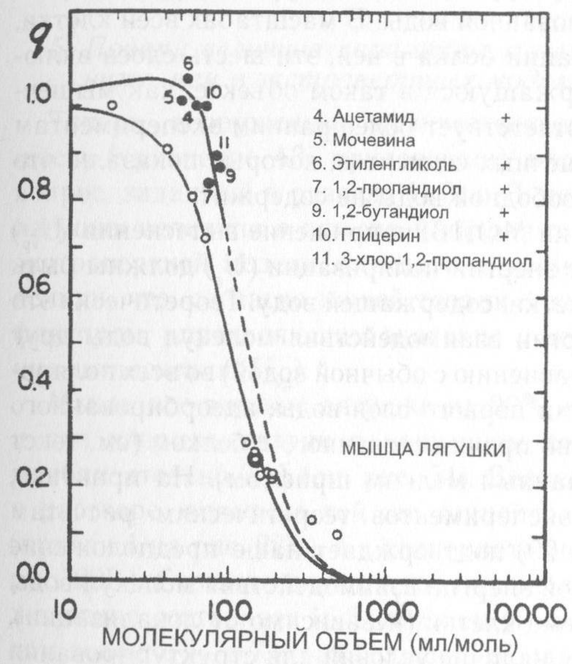


Рис. 29. Зависимость коэффициентов р
ного распределения (q) 21 неэлектролит
водой мышечных волокон и средой от
кулярного объема. Представлены те ж
риментальные данные, что и на рис. 28 (
кривая построена по данным работы [
рис. 28). Аналитическим выражением д
эмпирических зависимостей является ур
А3 (приложение). Согласно расчетным
напряжение вытеснения (U_{vp}) поляриз
воды одинаково в обоих случаях и сос
126 кал/моль. При этом поверхностная
поляризации (U_s) у них отличается и
ляет для нижней кривой 119, а для вер
156 кал/моль воды (+30%). Вещества, п
ные крестиком, являются криопротек
(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, p. 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_{vp}) и поверхностный компонент энергии поляризации (U_s) 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 гидратированный 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 А3 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_{vp}).

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 ρ 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_{vp}) в растворе желатина составляет 16,5 кал/моль [168, p. 166], тогда как в мышечном волокне — в 7,6 раз больше, 126 кал/моль [156, p. 196].

Значение U_{vp} 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* приблизительная, 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 мочевина (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, меченной тритием, и сахарозы, меченной 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, p. 28]; оба эти коэффициента определяли с использованием одного и того же диализного мешка с тем или иным денатурированным белком. Результат, полученный для меченного 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 признавать 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 Пфеффером, 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, p. 664—670). Как известно, осмотическое

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

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

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, находящихся 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 давлении 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, опуб-

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

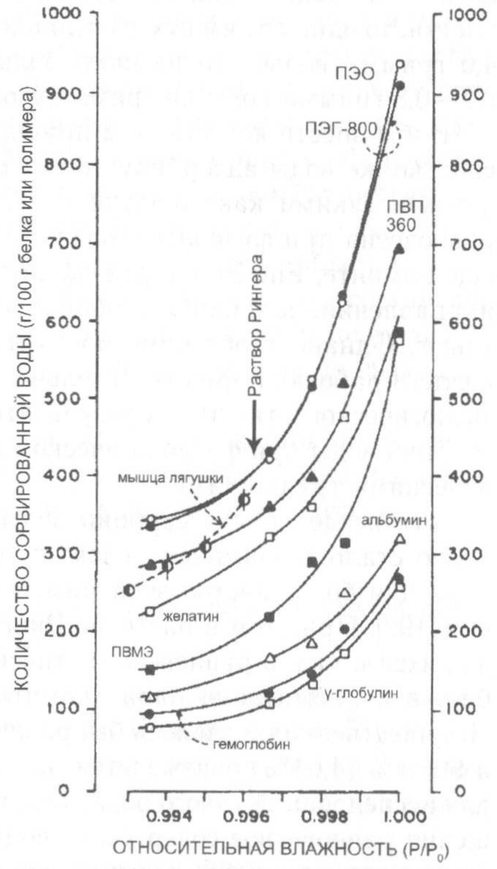


Рис. 30. Равновесная сорбция воды пятью экстравертными (желатин, ПЭО — полиэтиленоксид, ПВП-360 — поливинилпирролидон, ПВМЭ — поливинилметиловый эфир, ПЭГ-800 — полиэтиленгликоль) и тремя интровертными моделями (нативный бычий сывороточный альбумин, нативный бычий гемоглобин и нативный бычий γ-глобулин) 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, p. 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 оказалась 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, p. 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 А12 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 Хёфлера [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),

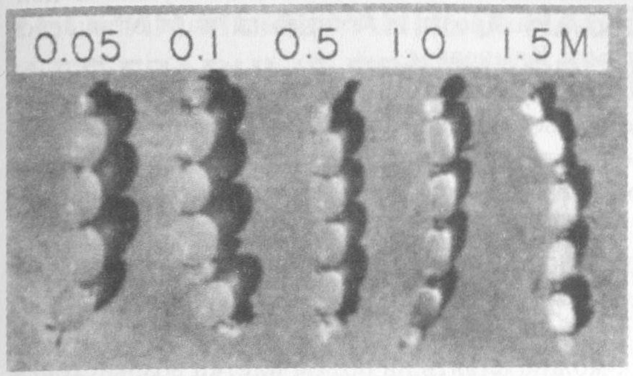


Рис. 31. Стойкое обратимое набухание и сжатие содержимого диализных мешков, заполненных раствором полиэтиленоксида (ПЭО) с начальной концентрацией 30%, после инкубации в растворах цитрата натрия (концентрации указаны на рис.). ПЭО — это нейтральный полимер и его набухание и сжатие нельзя объяснить электростатическими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

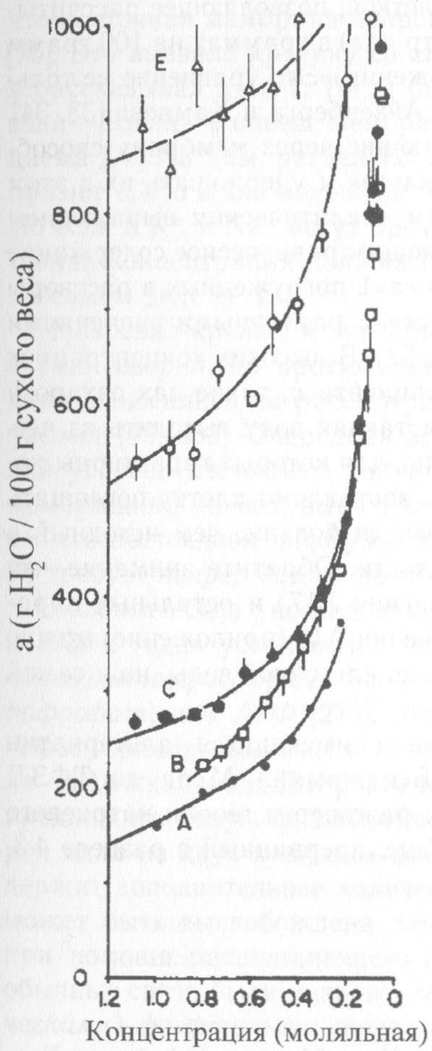


Рис. 32. Содержание воды в мышцах лягушки (а), находящихся в равновесии с растворами различных сахаров и спиртов (25 °С) в концентрациях (в молях на кг растворителя), указанных на оси абсцисс (за исключением кривой А). А — равновесное содержание воды в мышце, подвешенной во влажном воздухе, в зависимости 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.

ГЛАВА 12.

ТЕОРИЯ МЕМБРАННЫХ НАСОСОВ И ЕЕ ГЛАВНЫЕ ПРОТИВОРЕЧИЯ

Читатель, дойдя до этой страницы, уже успел основательно ознакомиться с вопросами избирательного накопления клетками ионов K^+ в присутствии Na^+, большей частью в контексте гипотез Мура и Роуфа, Фишера, ТФЗЛ и теории МОПВ.

Трактовка мембранной теорией этого важнейшего физиологического явления претерпела ряд метаморфоз. Сначала было решено, что клеточная мембрана непроницаема как для ионов K^+, так и Na^+ [76]. Это вызвало критику со стороны Мура и Роуфа [77], о которой я рассказывал в гл. 7. Тогда была предложена версия Монда—Амсона—Бойля—Конвея: мембрана проницаема для K^+, но непроницаема для Na^+ (см. раздел 4.3 4-й главы). В конце концов, пришлось признать, что и для ионов Na^+ клеточная мембрана проницаема [36]. Но если и K^+, и Na^+ могут проходить через мембрану, их внутриклеточная концентрация должна быть такой же, как и вне клетки, что на самом деле не так.

Назревал кризис, и тут возникла теория натриевого насоса. Как я уже говорил, на протяжении всей истории науки время от времени выносились на рассмотрение идеи различных метаболических насосов [49; 333]. Очередная версия теории насосов объясняла низкий уровень клеточного Na^+ непрерывной работой постулируемого мембранного насоса, выкачивающего ионы Na^+ наружу, в противовес его постоянной диффузии внутрь клетки. Но *непрерывная* работа требует *непрерывного* притока энергии.

Биохимические исследования энергетического обмена клеток в 1930-х годах установили, что его конечным продуктом является *аденозинтрифосфорная кислота* (также известная как *аденилпирофосфат*) или *АТФ* [273]. Мегоф и Ломанн вычислили *теплоту дефосфорилирования АТФ* (с образованием АДФ), которая составила −12,0 ккал/моль [318]. Эти и другие данные позволили Липману предложить новую физиологическую доктрину [132], согласно которой одна из двух конечных фосфатных связей в молекуле АТФ содержит дополнительное количество свободной энергии. Эта энергия может быть высвобождена для выполнения биологической работы при помощи расщепляющего АТФ фермента — АТФазы. Эти необычные связи были названы *«высокоэнергетическими (макроэргическими) фосфатными связями»* и стали обозначаться ~P.

Датский биохимик Йенс Кристиан Скоу обнаружил в «мембранной фракции» гомогената нервов краба особый вид АТФазы, для наибольшей активности которой требуется присутствие как K^+, так

и Na^+, — отсюда произошло ее название: *Na,K-активируемая АТФаза*. Скоу предположил, что этот и аналогичные ферменты, находящиеся в мембранах, способны высвобождать и использовать «энергию» высокоэнергетических фосфатных связей АТФ для переноса ионов Na^+ из клетки наружу, а K^+ — внутрь против своих градиентов концентрации. Иными словами, идея состояла в том, что *эта мембранная Na,K-зависимая АТФаза и есть тот самый гипотетический натриевый насос* [52].

На развитие этой теории была затрачена огромная масса времени, талантов и ресурсов, а кульминацией явилось присуждение профессору Скоу в 1997 году Нобелевской премии по химии именно за его работу, связанную с натриевым насосом. И мне кажется, что ответственное за принятие этого решения большинство Нобелевского комитета оказалось в неловком положении, о котором, впрочем, оно не подозревает [247].

Нетрудно понять, почему я это говорю. Любого факта, лежащего в основании ТФЗЛ (раздел 10.2) и теории МОПВ (гл. 11), достаточно, чтобы опрокинуть доводы, приводимые в поддержку теории натриевого насоса, или поставить под серьезное сомнение саму достоверность этой теории. Однако я попытаюсь конкретизировать это заявление, приведя четыре группы фактов, свидетельствующих о главных противоречиях теории натриевого насоса.

1. Минимальная потребность в энергии гипотетического натриевого насоса в мышце лягушки при неукоснительном соблюдении всех физиологических условий, *по меньшей мере* в 15—30 раз превышает максимальное количество энергии, которое клетка способна выработать [49; 98, p. 189—212] (табл. 2). На протяжении почти полувека, прошедшего после публикации этих данных, *никто* так и не попытался оспорить мое утверждение, что теория натриевого насоса противоречит основному закону физики — закону сохранения энергии. За эти же годы, с другой стороны, достоверность моих выводов была *дважды* подтверждена независимыми исследователями [274; 275].

2. Натриевый насос — лишь один из множества насосов, удерживающих клетку «на плаву». Линг, Миллер и Оксенфельд в 1973 году решили подсчитать, сколько же всего было предложено различных насосов. Неполный, к сожалению, список насчитывал 18 насосов, но зато некоторые из них представляли собой целые насосные ансамбли; в их числе оказались также всевозможные насосы для сахаров и свободных аминокислот [131, Table 2; 49, Table 1].

Но это только насосы поверхностной мембраны. А ведь органеллам клетки тоже нужны насосы. Одним только натриевым насосам саркоплазматического ретикулума поперечнополосатых мышечных волокон, площадь мембраны которого огромна, потребовалось бы в 50 раз больше энергии, чем всем насосам на поверхности клетки [49, p. 130—133]. А теперь вспомним первый пункт: клетка не в состоянии обеспечить энергией работу даже одного насоса поверхностной мембраны — натриевого.

Таблица 2

Дата	Длительность (час)	Средняя скорость обмена Na^+ мышечного волокна (моль/кг в час)	$\Psi + E_{Na}/F$ интегральное среднее (мВ)	Минимальный уровень энергопотребления натриевого насоса (кал/кг в час)	Максимальный уровень энергоснабжения мышечного волокна (кал/кг в час)	Минимальная потребность в энергии / максимальное количество доступной энергии (%)
9-12-56	10	0,138	111	353	11,57 (наивысшее значение 22,19)	3050
9-20-56	4	0,121	123	343	22,25 (наивысшее значение 33,71)	1542
9-26-56	4,5	0,131	122	368	20,47 (наивысшее значение 26,10)	1800

Сравнение *минимальной потребности в энергии* гипотетического натриевого насоса мышечных волокон лягушки с *максимальным количеством доступной энергии*, определяемой после подавления дыхания и гликолиза. Метаболизм подавляли сочетанием низкой температуры (0 °C), замещения кислорода среды чистым азотом, добавлением в среду 1 мМ NaCN и 1 мМ иодацетата натрия. В таких условиях единственным доступным для мышечных волокон источником энергии остаются только запасы АТФ, АДФ и креатинфосфата на момент начала действия ядов [131, p. 11—12]; вклад следов гликолиза, не подавлявшегося полностью в наших условиях, измерен по образованию лактата и учтен при вычислении окончательного энергетического баланса. Скорость откачивания натрия из клетки, как это называет теория натриевого насоса, определяли на тонких пучках мышечных волокон, выделенных из полусухожильной мышцы североамериканских леопардовых лягушек (*Rana pipiens pipiens*, Schreber). Откачивание проходило против как градиента электрохимического потенциала (т. е. потенциала покоя, измеренного микроэлектродами Джерарда—Грэхем—Линга), так и против градиента концентрации (вычислявшегося по концентрации меченого Na^+ внутри и снаружи клеток). Методические подробности этих экспериментов см. в недавнем обзоре [49]. (По Лингу [98]).

3. За год до того, как Скоу представил свою теорию натриевого насоса, Подольский и Моралес показали, что на повестке дня стоит вопрос о девальвации макроэргических связей [133]. Оказалось, что так называемая «высокоэнергетическая фосфатная связь» *не аккумулирует в себе много энергии*. Подольский и Моралес пришли к такому выводу, более точно измерив теплоту гидролиза АТФ, сделав остроумную поправку на теплоту нейтрализации кислоты, освобождающейся при гидролизе (табл. 3). К такому же выводу пришли Джордж и Рутман [134]: в так называемой высокоэнергетической фосфатной связи «высокой» энергии не оказалось.

Таблица 3

Гидролиз					Нейтрализация					Итого
Температура	Миозин	$n_{АТФ}$	h	ΔH_{obs}	Температура	n_{HCl*}	h	$\frac{h}{n_{HCl}}$	$\Delta H_{p(ioniz)}$	$\Delta H_{obs}+\Delta H_{p(ioniz)}$
°C	г/100 мл	мкмоль	милликал	ккал/моль	°C	мкмоль	милликал	ккал/моль	ккал/моль	ккал/моль
19,2	0,28	6,83	−45,9	−6,7	19,4	4,47	−8,7	−1,94	2,0	−4,7
19,2	0,28	6,93	−46,2	−6,7	19,4	4,52	−8,9	−1,97	2,0	−4,7
19,3	0,28	6,63	−43,6	−6,6	18,3	4,52‡	−8,8	−1,94	1,6	−5,0
18,5	0,09	6,83	−45,0	−6,6	18,7	4,57‡	−8,95	−1,96	2,0	−4,6
Среднее										−4,75
σ										0,2

Изменение теплосодержания (энтальпии) при гидролизе АТФ, катализируемом миозином в фосфатном буфере. Очищенный миозин был добавлен в раствор KCl концентрацией 0,60 М. Общая концентрация ортофосфата составила 0,05 М, pH — 8,00. $n_{АТФ}$ — исходное количество АТФ, подвергшейся полному гидролизу. n_{HCl} — количество HCl в нейтрализованном растворе KCl концентрацией 0,6 М. В последнем столбике приведено изменение теплосодержания при гидролизе одного моля АТФ с поправкой на теплоту нейтрализации образовавшихся ионов H^+. В параллельных исследованиях с другими буферными растворами получены аналогичные результаты. σ — стандартное отклонение. Значения других пометок см. в тексте оригинала. (По Подольскому и Моралесу [133]).

В связи с несостоятельностью концепции «высокоэнергетической фосфатной связи» дефицит энергии в клетке, создаваемый непомерными потребностями гипотетического натриевого насоса мышечных волокон лягушки (см. табл. 2), обостряется теперь в еще большей степени [49].

Таким образом, если в фосфатных связях АТФ не содержится той энергии, на которую все так рассчитывали, значит Na,K-зависимая АТФаза, как и любая другая АТФаза, не может совершать работу по перекачиванию ионов Na^+ и K^+, предписываемую ей мембранной теорией.

4) Техника удаления цитоплазмы, или аксоплазмы, из гигантского аксона кальмара была отработана в 1961 году в двух лабораториях [135]. При этом мембрана аксона сохраняла нормальную электрическую активность (несмотря на отсутствие аксоплазмы), что свидетельствовало о ее жизнеспособности. Если перевязать концы этого мембранного мешка, заполнив его предварительно морской водой со всеми веществами, необходимыми для нормального функционирования препарата (включая АТФ), то получится *идеальная модель* для проверки истинности теории мембранных насосов. Есть решительно все основания ожидать, что помпа тут же начнет выкачивать Na^+ из этого мешка и закачивать K^+ извне против градиентов концентрации этих ионов; все это должно произойти при условии, что теория мембранных насосов верна. На деле даже самые искусные исследователи так и не смогли продемонстрировать на этих идеальных препаратах активный транспорт K^+ или Na^+ [136, p. 95; 137; 138].

Точно также *отсутствует* активный перенос K^+ или Na^+ против градиентов концентраций в тенях эритроцитов, из которых удалены *все* цитоплазматические белки, но присутствует АТФ [139, 140, 107

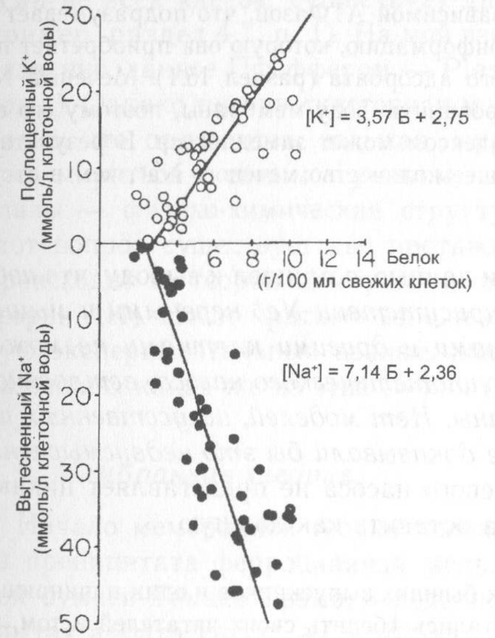


Рис. 33. Аккумуляция K^+ и вытеснение Na нями эритроцитов, полученными из отмытых троцитов человека. Эксперимент строго след методике, описанной в работе [471]. В основно пользовали свежую кровь от различных доно В редких случаях, когда взятие крови прово повторно, это делали не раньше шестинедель срока. По оси абсцисс — содержание белка нях. По оси ординат — изменение концентра K^+ или Na^+ в тенях по истечении 18 часов и бации при 37 °C в присутствии АТФ (АТФ п дала в эритроциты из инкубационной среды замыкании теней). Аналитические выражения эмпирических зависимостей, показанных на получены методом наименьших квадратов. щее содержание белка (параметр «Б» в у нениях) получено вычитанием из сухой ма теней эритроцитов массы жиров, фосфол дов, солей и сахарозы. (По Лингу и др. [1

р. 25—27]. Тени эритроцитов, содержащие АТФ, *могут*, однако, аккумулировать K^+ и вытеснять Na^+ в среду, но *только* тогда, когда в них содержится заметное количество белка [107, р. 25—27]. При этом оказывается, что количество накапливаемого K^+ *прямо* пропорционально количеству белка, оставшегося в тенях (в основном это гемоглобин), как это видно на верхней части рис. 33. А уровень, до которого снижается концентрация Na^+, *обратно* пропорционален содержанию внутриклеточного белка [140], что видно на нижней части рис. 33. Таким образом, все дело в количестве остаточного белка, а не в насосе.

Если мембрана, созданная самой природой, отказывается следовать мембранной теории, то что тогда говорить об искусственных мембранах со встроенными в них «мембранными насосами» в виде изолированной Na,K-АТФазы? Только одно: попытки показать на таких моделях реальность активного транспорта K^+ и Na^+ против градиента концентрации обречены на провал. Сообщения об ус-

Таблица 3

Гидролиз					Нейтрализация					Итого
мпе-тура	Миозин	$n_{АТФ}$	h	ΔH_{obs}	Темпе-ратура	n_{HCl*}	h	$\frac{h}{n_{HCl}}$	$\Delta H_{p(ioniz)}$	$\Delta H_{obs}+\Delta H_{p(ioniz)}$
°C	г/ 100 мл	мкмоль	милли-кал	ккал/ моль	°C	мкмоль	милли-кал	ккал/ моль	ккал/ моль	ккал/ моль
9,2	0,28	6,83	−45,9	−6,7	19,4	4,47	−8,7	−1,94	2,0	−4,7
9,2	0,28	6,93	−46,2	−6,7	19,4	4,52	−8,9	−1,97	2,0	−4,7
9,3	0,28	6,63	−43,6	−6,6	18,3	4,52‡	−8,8	−1,94	1,6	−5,0
8,5	0,09	6,83	−45,0	−6,6	18,7	4,57‡	−8,95	−1,96	2,0	−4,6
еднее.....										−4,75
.....										0,2

Изменение теплосодержания (энтальпии) при гидролизе АТФ, катализируемом миозином в фосфатном буфере. Очищенный миозин был добавлен в раствор KCl концентрацией 0,60 М. Общая концентрация ортофосфата составила 0,05 М, pH — 8,00. $n_{АТФ}$ — исходное количество АТФ, подвергшейся полному гидролизу. n_{HCl} — количество HCl в нейтрализованном растворе KCl концентрацией 0,6 М. В последнем столбике приведено изменение теплосодержания при гидролизе одного моля АТФ с поправкой на теплоту нейтрализации образовавшихся ионов H^+. В параллельных исследованиях с другими буферными растворами получены аналогичные результаты. σ — стандартное отклонение. Значения других пометок см. в тексте оригинала. (По Подольскому и Моралесу [133]).

В связи с несостоятельностью концепции «высокоэнергетической фосфатной связи» дефицит энергии в клетке, создаваемый непомерными потребностями гипотетического натриевого насоса мышечных волокон лягушки (см. табл. 2), обостряется теперь в еще большей степени [49].

Таким образом, если в фосфатных связях АТФ не содержится той энергии, на которую все так рассчитывали, значит Na,K-зависимая АТФаза, как и любая другая АТФаза, не может совершать работу по перекачиванию ионов Na^+ и K^+, предписываемую ей мембранной теорией.

4) Техника удаления цитоплазмы, или аксоплазмы, из гигантского аксона кальмара была отработана в 1961 году в двух лабораториях [135]. При этом мембрана аксона сохраняла нормальную электрическую активность (несмотря на отсутствие аксоплазмы), что свидетельствовало о ее жизнеспособности. Если перевязать концы этого мембранного мешка, заполнив его предварительно морской водой со всеми веществами, необходимыми для нормального функционирования препарата (включая АТФ), то получится *идеальная модель* для проверки истинности теории мембранных насосов. Есть

решительно все основания ожидать, что помпа тут же начнет выкачивать Na^+ из этого мешка и закачивать K^+ извне против градиентов концентрации этих ионов; все это должно произойти при условии, что теория мембранных насосов верна. На деле даже самые искусные исследователи так и не смогли продемонстрировать на этих идеальных препаратах активный транспорт K^+ или Na^+ [136, p. 95; 137; 138].

Точно также *отсутствует* активный перенос K^+ или Na^+ против градиентов концентраций в тенях эритроцитов, из которых удалены *все* цитоплазматические белки, но присутствует АТФ [139, 140, 107

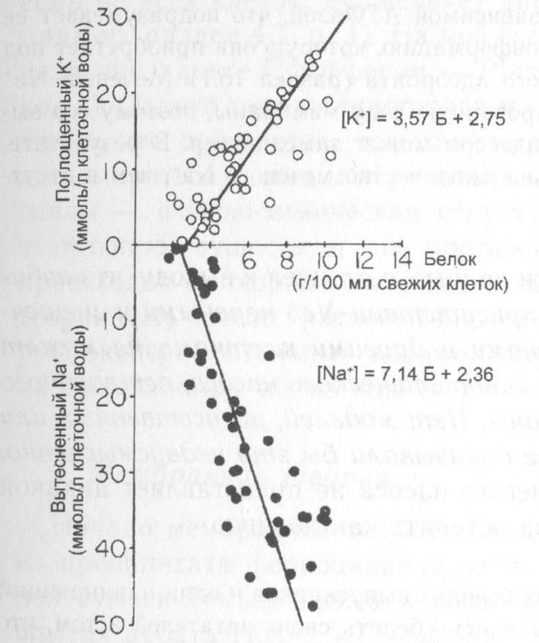


Рис. 33. Аккумуляция K^+ и вытеснение Na^+ тенями эритроцитов, полученными из отмытых эритроцитов человека. Эксперимент строго следовал методике, описанной в работе [471]. В основном использовали свежую кровь от различных доноров. В редких случаях, когда взятие крови проводили повторно, это делали не раньше шестинедельного срока. По оси абсцисс — содержание белка в тенях. По оси ординат — изменение концентрации K^+ или Na^+ в тенях по истечении 18 часов инкубации при 37 °C в присутствии АТФ (АТФ попадала в эритроциты из инкубационной среды при замыкании теней). Аналитические выражения для эмпирических зависимостей, показанных на рис., получены методом наименьших квадратов. Общее содержание белка (параметр «Б» в уравнениях) получено вычитанием из сухой массы теней эритроцитов массы жиров, фосфолипидов, солей и сахарозы. (По Лингу и др. [140]).

р. 25—27]. Тени эритроцитов, содержащие АТФ, *могут*, однако, аккумулировать K^+ и вытеснять Na^+ в среду, но *только* тогда, когда в них содержится заметное количество белка [107, р. 25—27]. При этом оказывается, что количество накапливаемого K^+ *прямо* пропорционально количеству белка, оставшегося в тенях (в основном это гемоглобин), как это видно на верхней части рис. 33. А уровень, до которого снижается концентрация Na^+, *обратно* пропорционален содержанию внутриклеточного белка [140], что видно на нижней части рис. 33. Таким образом, все дело в количестве остаточного белка, а не в насосе.

Если мембрана, созданная самой природой, отказывается следовать мембранной теории, то что тогда говорить об искусственных мембранах со встроенными в них «мембранными насосами» в виде изолированной Na,K-АТФазы? Только одно: попытки показать на таких моделях реальность активного транспорта K^+ и Na^+ против градиента концентрации обречены на провал. Сообщения об ус-

пехах таких попыток ошибочны и ошибка таится в недостаточном контроле за *утечкой изотопов* из нагруженных ими везикул, когда везикулы пропускаются через колонку с сефадексом для отделения их от маточного раствора изотопа. На эту очевидную опасность уже обращали внимание в 1980 году Линг и Негенданк [138, p. 224; 107, p. 22—25].

Линг и Негенданк также, между прочим, указывали [138, p. 234—235], что данные, поспешно расцененные как доказательство активного транспорта, питаемого АТФ, все-таки не лишены ценности. Они наводят на мысль, что вода в мембране везикул (см. электронно-микроскопическое изображение таких пузырьков на рис. 5D) может связываться, поляризоваться и ориентироваться *самой* Na,K-зависимой АТФазой, что подразумевает ее хотя бы частично развернутую конформацию, которую она приобретает под влиянием АТФ как кардинального адсорбата (раздел 15.1). Меченый Na^+ хуже проходит сквозь структурированную воду мембраны, поэтому его выход из везикул в колонке с сефадексом может замедлиться. В результате, внутри пузырьков остается большее количество меченого Na^+, чем в отсутствии АТФ.

Приняв во внимание все эти данные, я пришел к выводу, что *избирательное накопление K^+ в присутствии Na^+ нервными и мышечными волокнами, эритроцитами и другими клетками не может быть результатом работы гипотетического насоса, встроенного в их плазматические мембраны. Нет моделей, искусственных или полуискусственных, которые доказывали бы это недвусмысленно.* Следовательно, теория натриевого насоса не представляет никакой ценности и ее давно уже пора оставить как ложную.

Правда, в 1976 году двое моих бывших выпускников и один начинающий репортер журнала *Science* попытались убедить своих читателей в том, что теория натриевого насоса все еще жива. Но при тщательном анализе этой публикации обнаружился ее низкой уровень из-за голословных ссылок на некие несуществующие в реальности «решающие эксперименты» и упреков в мой адрес о сокрытии правды. Надуманный оптимизм этой статьи я развеял в 1997 году в статье «Разоблачение мифа о воскрешении теории натриевого насоса» [49].

В разделе 4.3 мы выяснили, что идея «насоса» явилась последней попыткой сохранить мембранную теорию на плаву. Отказ от теории натриевого насоса означает конец господства парадигмы *«клетка — разбавленный раствор электролитов, окруженный мембраной»* — парадигмы, владевшей умами ученых на протяжении всей истории физиологии клетки. Однако не все в мембранной теории оказалось ошибочным. Есть веские данные о реальном существовании диффузионного барьера на поверхности клетки, на чем всегда настаивала мембранная теория. Этот барьер, в разное время называвшийся *протоплазматической кожей, плазматической мембраной* и *клеточной мембраной*, будет предметом следующей главы.

ГЛАВА 13.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ

13.1. История вопроса
13.2. Проницаемость клеток и модельных систем для ионов
13.3. Обмен воды между клеткой и средой ограничен связанной водой, а не мембраной
13.4. Проницаемость клеток для воды на порядок выше, чем фосфолипидного бислоя
13.5. Поверхностное натяжение на границе раздела клетка/среда ниже, чем на границе раздела фосфолипиды/среда
13.6. Ионофоры на порядок усиливают проницаемость для ионов K^+ сплошного искусственного фосфолипидного бислоя, но слабо влияют на проницаемость для K^+ мембран почти всех исследованных клеток
13.7. Поляризованная структурированная вода вместо фосфолипидного бислоя

13.1. История вопроса

По многочисленным данным, на поверхности большинства, если не всех клеток, существует диффузионный барьер (см., например, раздел 4.1, п. 1). На мой взгляд, лучше всего ему подходит название, данное Пфеффером — Plasmahaut (протоплазматическая кожа). Однако термин «клеточная мембрана» используется уже так давно, что приходится, вздыхая, мириться с ним — как приходилось мириться с самим термином «клетка». Основной вопрос этой главы — физико-химическая структура клеточной мембраны. На этот вопрос существует две противоположные точки зрения: одна происходит из теории мембранных насосов, другая — из ТФЗЛ (и теории АИ). После краткого изложения обеих теорий я проанализирую экспериментальные данные, полученные в ходе поиска ответа на вопрос, какая же из этих теорий ближе к истине.

1. Мембранная теория

Начало мембранной теории положил опыт Траубе с мембраной из преципитата ферроцианида меди. В отличие от прокрахмаленной бумаги Томаса Грэма, и подобно свиному мочевому пузырю в опытах аббата Нолле, — мембрана ферроцианида меди не только непроницаема для коллоидов, но также «непроницаема» для таких кристаллоидов, как сахароза или ионы меди и ферроцианида. Эту избирательную проницаемость Траубе объяснил в 1867 году своей *теорией атомного сита*, наличием в мембране пор определенного размера, достаточно больших для одних ионов и молекул и слишком маленьких для других [17]. Эта идея была весьма новаторской: лишь много лет спустя подобные мысли вновь начали высказываться другими учеными, среди которых были Михаэлис [401], Монд и Амсон [51], Бойль и Конвей [44].

Однако идея сита Траубе оказалась ошибочной. Бигелоу, Бартелл и Хантер продемонстрировали, что мембрана ферроцианида меди сохраняет свои осмотические свойства даже при таком большом диаметре пор, как 0,5 мкм (5000 Å) [55; 56, p. 96; 13, p. 656—657]. Не может же, в самом деле, сито с порами диаметром 5000 Å быть препятствием для такой молекулы, как сахароза, с диаметром молекулы всего 8,8 Å. Тем не менее, такая мембрана для сахарозы непроницаема.

Интересно, что еще за 12 лет до идеи Траубе, в 1855 году, Лермит показал, что в основе полупроницаемости или, точнее, *дифференциальной проницаемости* мембран для различных веществ лежат различия в их *растворимости* в материале мембраны [57; 56, p. 98] (см. также статью Юстуса Либиха [482]). В подкрепление своей теории Лермит провел остроумный и убедительный эксперимент. Он создал в стеклянном цилиндре трехслойную систему: нижний слой — хлороформ, средний — вода, верхний — эфир (самый легкий из использованных растворителей). Эфир слабо растворим в воде, хлороформ — нерастворим. Поэтому эфир достигал слоя

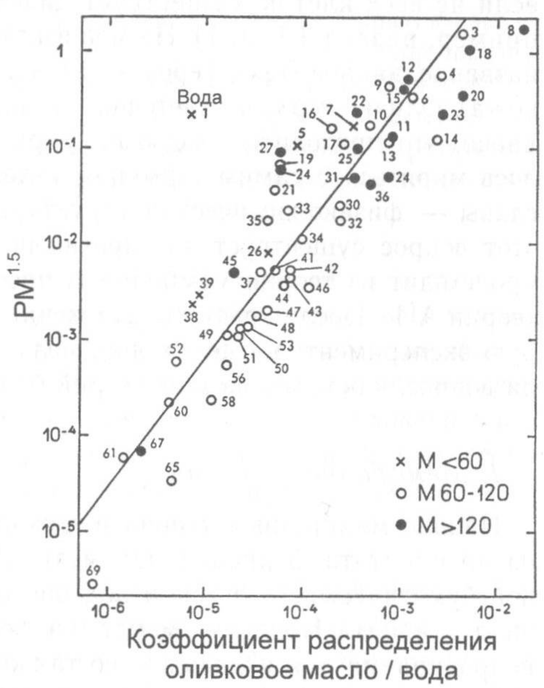


Рис. 34. Зависимость проницаемости клеток *Nitella mucronata* для 69 неэлектролитов от коэффициента равновесного распределения этих неэлектролитов между оливковым маслом и водой (коэффициент равновесного распределения = $C_{масло}/C_{вода}$, где $C_{масло}$ — концентрация вещества в оливковом масле, $C_{вода}$ — концентрация вещества в воде). Обратите внимание, что на оси ординат отложено произведение константы проницаемости (P) каждого из веществ на его молекулярную массу (M), возведенную в степень 1,5 (возведение в степень придало эмпирической зависимости линейный характер). 1 — тяжелая вода (HDO); 7 — этанол; 8 — паральдегид; 52 — этиленгликоль; 61 — мочевина; 69 — глицерин. (По Колландеру [320]).

хлороформа, диффундируя сквозь слой воды, а хлороформ не мог достичь слоя эфира из-за наличия водного барьера. Вода сыграла здесь роль *полупроницаемой* среды: проницаемой для эфира, но непроницаемой для хлороформа.

Знаменитым следствием теории Лермита «проницаемость через растворимость» стала *теория липоидных мембран* Чарльза Эдмунда Овертона [21]. Повторив идею Квинке о масляном слое на поверхности клеток [542], Овертон внес принципиально важное дополнение: неодинаковая проницаемость клеточных мембран для различных неэлектролитов обусловлена различной растворимостью веществ в этой масляной мембране.

Рунар Колландер провел эксперименты [320], результаты которых подтвердили теорию проницаемости липоидных мембран Овертона (см. рис. 34). По оси ординат отложено произведение измеренной

экспериментально проницаемости (P) клеток *Nitella* для данного вещества на его молекулярную массу (M), возведенную в степень 1,5 (см. подпись к рисунку). По оси абсцисс отложены коэффициенты распределения 69 веществ между оливковым маслом и водой. Сильная корреляция этих показателей свидетельствует о том, что проницаемость мембраны для неэлектролитов в самом деле определяется их растворимостью в липоидной мембране клетки. На первый взгляд все выглядит убедительно, но к этому опыту остаются серьезные претензии. Рассмотрим основные из них.

Во-первых, проницаемость определяли следующим образом: сначала клетки *Nitella* погружали в раствор исследуемого неэлектролита на определенное время, а затем производили сбор и анализ образцов жидкости из центральной вакуоли (см. рис. 1А). Однако внимательный читатель может вспомнить, что Хёфлер в своих поздних работах доказал: диффузионным барьером для сахарозы у зрелых растительных клеток является не плазматическая мембрана, а тонопласт — внутренняя, везикулярная мембрана (рис. 1). Колландер в своем опыте этого не учел. Поэтому весьма вероятно, что диффузионным барьером, который характеризуют данные рис. 34, является не клеточная мембрана, а именно тонопласт. Однако тонопласт — особая, специализированная структура, характерная лишь для зрелых растительных клеток, и ее нельзя рассматривать в качестве модели типичной клеточной мембраны.

Во-вторых, характерной особенностью *полупроницаемой* мембраны является гораздо бóльшая проницаемость ее для воды, чем для растворенных в ней веществ. Еще аббат Нолле в самом первом сообщении по этому вопросу заметил, что свиной мочевой пузырь проницаем для воды, но непроницаем для этанола. Взглянув же на рис. 34, мы узнаём, что коэффициент распределения этанола между оливковым маслом и водой не ниже, чем у воды, а более чем в 100 раз *выше*. Получается, по логике Колландера, что мембрана *Nitella* должна быть в 100 раз более проницаема для этанола, чем для воды, что противоречит всем фактам и даже самой идее «сита», объясняющей полупроницаемость биологической мембраны (молекула этанола намного больше молекулы воды).

В-третьих, межфазное натяжение между маслом и водой по меньшей мере в сто раз больше, чем фактическое натяжение на поверхности клетки (подробности см. в разделе 13.4).

Поскольку объяснения явления полупроницаемости (идея атомного сита и «проницаемость через растворимость») столкнулись с серьезными затруднениями, ряд ученых попытался объединить их в одну модель. Примеры многочисленны: мозаичная теория мембран Натансона [438], теория ультрафильтра Рухланда [422], теория липоидной фильтрации Колландера и Берлунда [403], олигомолекулярная теория Даниэли—Харви [483], а также принятая ныне жидкостно-мозаичная теория Зингера—Николсона [200], в которой масляный слой Овертона заменен фосфолипидным бислоем. Все эти

модели объединяет одна общая для них идея: слой жиров или фосфолипидов образует непрерывный барьер между внутренней средой клетки и наружной. Во всех этих моделях клеточная мембрана — это действительно мембрана, тонкая пленка с четкими границами как изнутри, так и снаружи. Однако в этом ряду моделей есть исключение. Это мембранная модель Вильгельма Пфеффера, часто называемого основателем мембранной теории. Однако в модели Пфеффера плазматическая мембрана частично или полностью образована белками [18, p. 156]. К тому же четкой границы между его «плазмокожей» и цитоплазмой может и не быть [18, p. 139]. Поэтому у самого основателя мембранной теории оказалось куда больше общего с Францем Лейдигом и Максом Шульце с их взглядами о том, что по химической природе клеточная мембрана не отличается от протоплазмы (см. гл. 1).

2. Теория фиксированных зарядов Линга и теория ассоциации-индукции

В теории фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ), представленной в 1951 и 1952 годах, я последовательно придерживался принципа: что справедливо для всей цитоплазмы, должно быть справедливо и для поверхности клетки [96, p. 781—782]. Конкретно, я предположил, что природа фиксированных анионов на поверхности клетки должна быть такой же, как и внутриклеточных, и поэтому они также должны обладать способностью избирательно адсорбировать K^+ в присутствии Na^+, как это происходит в цитоплазме. Руководствуясь этим, я, с одной стороны, разработал теорию избирательной проницаемости для K^+, а с другой, — позже, в 1955 году, — новую теорию потенциала покоя (см. рис. 4С). Эти вопросы будут подробно освещены в 15 главе.

Спустя 13 лет я предложил теорию МОПВ, согласно которой клеточная вода связана и представляет собой динамичную структуру из множества слоев молекул воды, каждая из которых приобретает в такой структуре дополнительный дипольный момент (поляризуется). И в этой части своей теории я не отошел от идеи принципиального сходства свойств протоплазмы во всем ее объеме, начиная с клеточной поверхности. Это неизбежно привело к созданию более полной модели клеточной мембраны.

Как и вся толща цитоплазмы, основная часть клеточной мембраны образована поляризованной ориентированной водой. Иными словами, клеточная мембрана — это, в первую очередь, мембрана из структурированной воды, в которой определяющую функциональную роль играют фиксированные анионы (или катионы), а также специализированные структуры, участвующие в трафике свободных аминокислот, сахаров и даже белков [15, p. 426—435].

Принимая идею *вездесущности* поляризованной ориентированной воды как непрерывной фазы всей клетки, включая клеточную мембрану, я хотел бы подчеркнуть *динамичность* этой модели. Что касается поверхности клетки, то непостоянство ее свойств выражается в непрерывных изменениях пропорций между участками, занятыми в основном поляризованной водой, белками или фосфолипидами. Не менее важно и то, что может изменяться прочность многослойной водной структуры и занимаемый ею объем. Модуляциям подвержены и степень полярности диполей, и количество заряженных функциональных групп мембранных белков; изменчивы и стерические условия, в которых они функционируют. О других аспектах нашей модели я расскажу позже, после представления *собственно теории АИ*.

Необходимо также пояснить, что, хотя в новой модели непрерывным барьером вместо фосфолипидов является поляризованная ориентированная вода, фосфолипиды также сохраняют важную роль. Например, они могут стабилизировать систему белки—вода на поверхности клетки.

Итак, непрерывной фазой клеточной мембраны является связанная структурированная вода. Основным структурным элементом мембраны являются белки. Эта модель, для того, чтобы начать работать, не нуждается в обязательной морфологической самостоятельности (хотя в каких-то случаях такая «автономия» возможна), она способна играть свою роль без внутренней границы раздела между собой и цитоплазмой, но в то же время представляет собой ясную демаркационную линию между клеткой и средой.

Очертив контуры двух соперничающих подходов к объяснению физико-химической природы клеточной мембраны, давайте теперь посмотрим, который из них получает недвусмысленную поддержку со стороны эксперимента.

13.2. Проницаемость клеток и модельных систем для ионов

В 1953 году я показал, что поступление меченого Rb^+ в мышечные волокна лягушки конкурентно ингибируется внешними ионами K^+ [147; 218; 219]. За год до этого Эпштейн и Хаген сообщили об аналогичном взаимодействии этих ионов при поступлении Rb^+ в корень ячменя, объяснив это теорией *переносчиков* [220], как позднее Конвей и Дагган таким же образом объяснили влияние в своих опытах ионов K^+ на скорость проникновения Na^+ в дрожжевые клетки [221].

Для проверки предположения, что причиной конкуренции катионов являются все-таки *фиксированные анионы*, связывающие свободные противоионы (раздел 10.1, п. 1), а не переносчики, мы выбрали следующие искусственные модели: ионообменную смолу, несущую фиксированные сульфонатные группы ($-SO_3H$); окисленную и высушенную коллодиевую мембрану, несущую карбоксильные группы; овечью шерсть, несущую β- и γ-карбоксильные группы остатков аминокислот; актомиозиновый гель, выделенный из мыш-

цы кролика [223]. Затем мы исследовали проницаемость каждой из этих моделей для ионов в том же ключе, что и Эпштейн и Хаген, Конвей и Дагган, и сопоставили полученные результаты с соответствующими данными по живым клеткам. Мы ожидали получить во всех случаях сходные результаты. Наши ожидания оправдались.

Оказалось, что поступление меченого Cs^+ в каждую модель действительно соответствовало «кинетике Михаэлиса—Ментен», описывающей как ферментативные реакции [446, Ch. 4], так и поступление ионов щелочных металлов в живые клетки [147; 222]. Это обстоятельство всегда расценивали как доказательство реальности

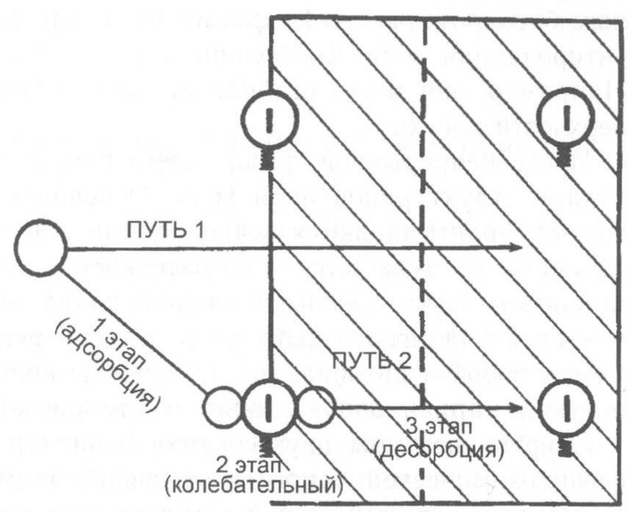


Рис. 35. Альтернативные пути входа одновалентного катиона (например, K^+) в систему фиксированных отрицательных зарядов модели или живой клетки с анионными центрами на поверхности. Изображено четыре фиксированных аниона (белок/белки, которым они принадлежат, не показаны). Путь 1 — *сквозной* путь. Он подразумевает преодоление слоя поляризованной воды между фиксированными анионами. Путь 2 — *адсорбционно-десорбционный* (для краткости — адсорбционный путь). Он включает три этапа: адсорбцию, колебание вокруг фиксированного аниона и десорбцию. (По Лингу и Оксенфельд [222]).

переносчиков, которые рассматривались как своего рода ферменты, а ионы — как их субстраты. Но возникает вопрос: а удалось ли кому-нибудь найти искусственную модель, в которой хоть какой-нибудь переносчик действительно работает?

Фосфолипидный бислой очень мало проницаем для ионов [209]. Следовательно, для того, чтобы они могли пересекать липидный барьер с физиологической скоростью, логично предположить, что им необходим особый *переносчик*. Когда было обнаружено, что валиномицин и другие сходные вещества действуют как высокоспецифичные переносчики ионов K^+, названные *ионофорами* (см. далее раздел 13.6), многие принялись за поиски их естественных аналогов. На эти искания ушла масса времени и усилий, в них были вложены огромные средства, и что в итоге? Пол Мюллер, начавший вместе с Доном Рудином в Психиатрическом институте Восточной Пенсильвании напряженные исследования фосфолипидного бислоя в то самое время, когда Эйзенман, я сам и другие старожилы как раз покидали этот институт (причины см. в разделе 14.1), в 1975 году признал: «Многие из нас впустую потратили около десяти лет, пытаясь всунуть всевозможные вещества внутрь бислоя...» [224]. Подобное заявление, по сути трагическое, редко можно встретить в научной литературе и, на мой взгляд, к нему следует отнестись с уважением и даже восхищением за решительность и предельную откровенность.

Вернемся, однако, к теоретической модели, основанной на ТФЗЛ (и теории АИ), вооруженные на этот раз результатами опытов на четырех модельных системах. На рис. 35 схематически изображена часть поверхности клетки. Непрерывная фаза этой поверхности представляет собой поляризованную и ориентированную воду, в ко-

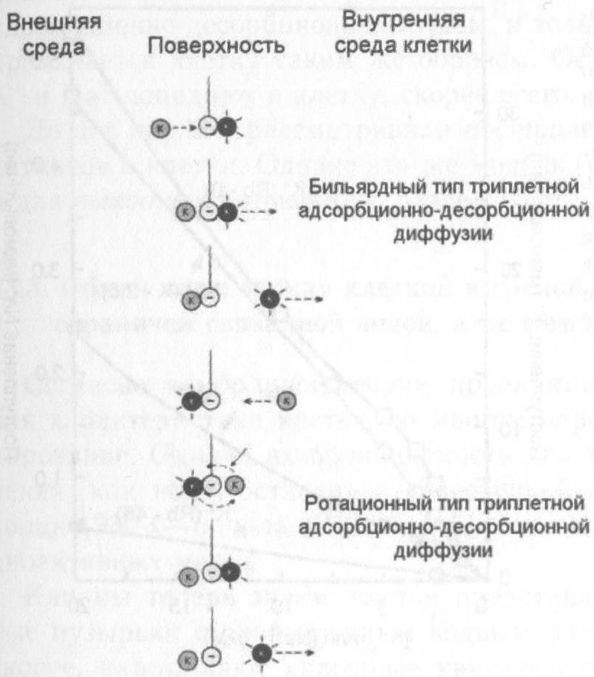


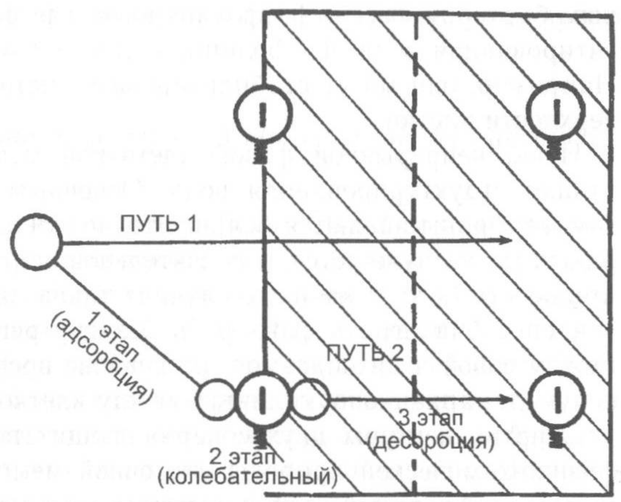
Рис. 36. *Триплетный адсорбционно-дес ционный путь* (диффузия, облегченная стием активирующего катиона) — вар адсорбционно-десорбционного пути (рис. по которому в клетку проникают катионы сравнительно более прочно связывающие фиксированными анионами. В зависим от происхождения третьего, активирую катиона (серые кружки), он подразделя на *«бильярдный»*, когда активирующий тион поступает снаружи, и на *«ротац ный»*, когда активирующий катион находи внутри клетки. Светлые кружки со зна «минус» — фиксированные анионы. Чер кружки — катионы, проникающие в кл из внешней среды. (По Лингу [15, p. 4

торой видны четыре β- и/или γ-карбоксильные группы (молекула белка, которой эти группы принадлежат, не показана) [222].

На рисунке показано, что одновалентный катион — скажем, K^+ — может войти в клетку либо *сквозным путем* (путь 1), либо *адсорбционно-десорбционным* (путь 2, для краткости — адсорбционный путь). Низкая растворимость ионов в поверхностной структурированной воде делает сквозной путь затруднительным. Входящий этим путем катион сталкивается с *непрерывным* энергетическим барьером, обусловленным необходимостью взламывать структуру связанной воды, электростатически взаимодействуя с ее молекулами. Такую воду можно сравнить с клочком стерильной ваты, позволяющим сохранить стерильность содержимого пробирки или колбы: поры в вате велики, но микробы, тем не менее, неспособны преодолеть этот барьер из-за бесчисленной череды взаимодействий, которые, в конце концов, останавливают их продвижение.

цы кролика [223]. Затем мы исследовали проницаемость каждой из этих моделей для ионов в том же ключе, что и Эпштейн и Хаген, Конвей и Дагган, и сопоставили полученные результаты с соответствующими данными по живым клеткам. Мы ожидали получить во всех случаях сходные результаты. Наши ожидания оправдались.

Оказалось, что поступление меченого Cs^+ в каждую модель действительно соответствовало «кинетике Михаэлиса—Ментен», описывающей как ферментативные реакции [446, Ch. 4], так и поступление ионов щелочных металлов в живые клетки [147; 222]. Это обстоятельство всегда расценивали как доказательство реальности



5. Альтернативные пути входа
лентного катиона (например,
систему фиксированных отри-
ных зарядов модели или живой
с анионными центрами на по-
ости. Изображено четыре фикси-
ных аниона (белок/белки, кото-
ни принадлежат, не показаны).
1 — *сквозной* путь. Он подразу-
т преодоление слоя поляризо-
й воды между фиксированными
ами. Путь 2 — *адсорбционно-*
бционный (для краткости — ад-
ионный путь). Он включает три
: адсорбцию, колебание вокруг
рованного аниона и десорбцию.
ингу и Оксенфельд [222]).

переносчиков, которые рассматривались как своего рода ферменты, а ионы — как их субстраты. Но возникает вопрос: а удалось ли кому-нибудь найти искусственную модель, в которой хоть какой-нибудь переносчик действительно работает?

Фосфолипидный бислой очень мало проницаем для ионов [209]. Следовательно, для того, чтобы они могли пересекать липидный барьер с физиологической скоростью, логично предположить, что им необходим особый *переносчик*. Когда было обнаружено, что валиномицин и другие сходные вещества действуют как высокоспецифичные переносчики ионов K^+, названные *ионофорами* (см. далее раздел 13.6), многие принялись за поиски их естественных аналогов. На эти искания ушла масса времени и усилий, в них были вложены огромные средства, и что в итоге? Пол Мюллер, начавший вместе с Доном Рудином в Психиатрическом институте Восточной Пенсильвании напряженные исследования фосфолипидного бислоя в то самое время, когда Эйзенман, я сам и другие старожилы как раз покидали этот институт (причины см. в разделе 14.1), в 1975 году признал: «Многие из нас впустую потратили около десяти лет, пытаясь всунуть всевозможные вещества внутрь бислоя...» [224]. Подобное заявление, по сути трагическое, редко можно встретить в научной литературе и, на мой взгляд, к нему следует отнестись с уважением и даже восхищением за решительность и предельную откровенность.

Вернемся, однако, к теоретической модели, основанной на ТФЗЛ (и теории АИ), вооруженные на этот раз результатами опытов на четырех модельных системах. На рис. 35 схематически изображена часть поверхности клетки. Непрерывная фаза этой поверхности представляет собой поляризованную и ориентированную воду, в ко-

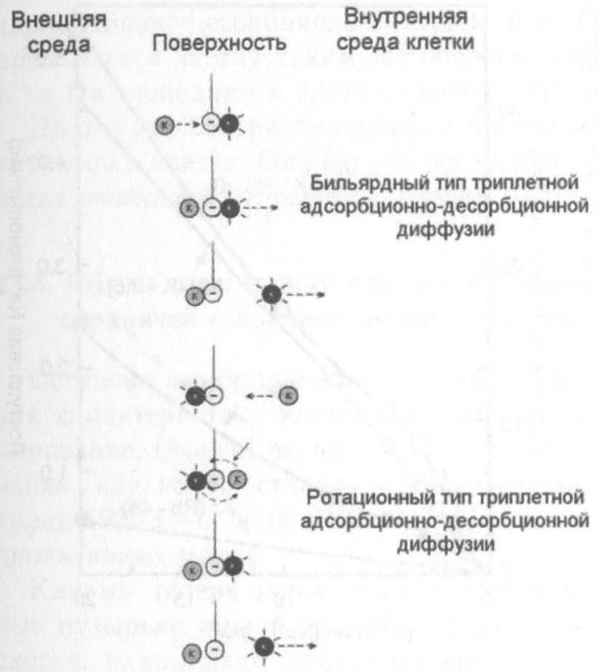


Рис. 36. *Триплетный адсорбционно-десорбционный путь* (диффузия, облегченная участием активирующего катиона) — вариант адсорбционно-десорбционного пути (рис. 35), по которому в клетку проникают катионы (К), сравнительно более прочно связывающиеся с фиксированными анионами. В зависимости от происхождения третьего, активирующего катиона (серые кружки), он подразделяется на «*бильярдный*», когда активирующий катион поступает снаружи, и на «*ротационный*», когда активирующий катион находится внутри клетки. Светлые кружки со знаком «минус» — фиксированные анионы. Черные кружки — катионы, проникающие в клетку из внешней среды. (По Лингу [15, p. 402]).

торой видны четыре β- и/или γ-карбоксильные группы (молекула белка, которой эти группы принадлежат, не показана) [222].

На рисунке показано, что одновалентный катион — скажем, K^+ — может войти в клетку либо *сквозным путем* (путь 1), либо *адсорбционно-десорбционным* (путь 2, для краткости — адсорбционный путь). Низкая растворимость ионов в поверхностной структурированной воде делает сквозной путь затруднительным. Входящий этим путем катион сталкивается с *непрерывным* энергетическим барьером, обусловленным необходимостью взламывать структуру связанной воды, электростатически взаимодействуя с ее молекулами. Такую воду можно сравнить с клочком стерильной ваты, позволяющим сохранить стерильность содержимого пробирки или колбы: поры в вате велики, но микробы, тем не менее, неспособны преодолеть этот барьер из-за бесчисленной череды взаимодействий, которые, в конце концов, останавливают их продвижение.

моделях (рис. 38). Для диффузии, ограниченной мембраной или поверхностью, характерна S-образная зависимость (A). Диффузия же в объеме характеризуется выпуклым графиком в случае среды с однородными свойствами (B) или кривой с линейным участком (C) в случае, если диффузия сопровождается адсорбцией вещества или его распределением по внутриклеточным компартментам.

На рис. 39 представлены экспериментальные данные *поступления* меченной тритием воды в яйцеклетки лягушки (подробности см. в подписи). На основании этих данных, а также аналогичных данных, полученных на гигантских мышечных волокнах морского желу-

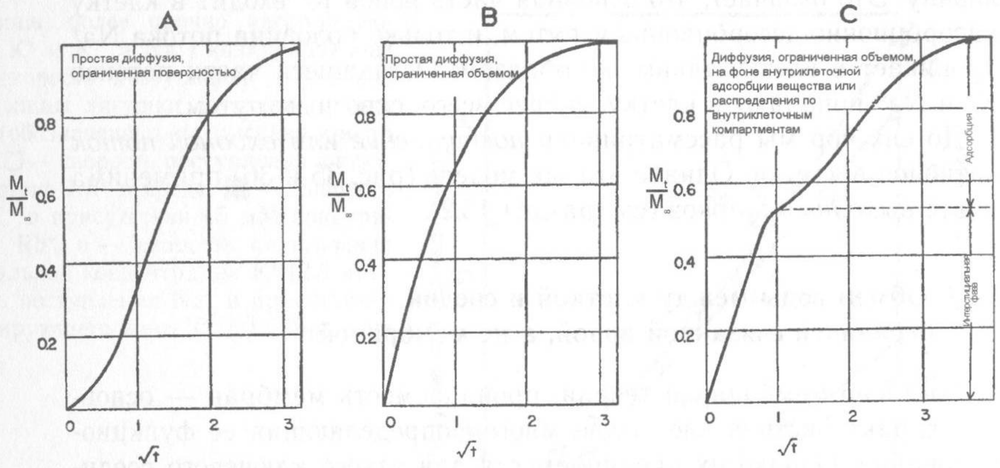


Рис. 38. Динамика поступления меченого вещества в системы с различными типами диффузионных барьеров. Представленные кривые — аналитические выражения, полученные для соответствующих моделей. По оси ординат отложена доля меченого вещества (M_t), поглощенного за время t, от общего количества вещества, поглощенного системой (M_∞) за бесконечное время. По оси абсцисс — квадратный корень времени t. Обратите внимание, что диффузионный профиль через мембрану (A) заметно *вогнут* на начальном этапе диффузии. При диффузии через объем вещества с однородными свойствами (B) (*простая* диффузия) или в сочетании с адсорбцией или компартментализацией диффундирующего вещества (C), диффузионный профиль имеет *слегка выпуклую* форму или *линейную* в начале процесса. Точка перегиба (C) появляется в случае, если скорость адсорбции или компартментализации диффундирующего вещества выше скорости диффузии. (По Лингу и др. [201]).

дя, нами был сделан вывод, что скорость обмена меченой воды между яйцеклетками/мышечными волокнами и средой соответствует, вопреки общепринятому мнению, модели *объемного* сопротивления диффузии (панели B и C на рис. 38), а не мембранного. Это означает, что скорость диффузии воды сквозь плазматическую мембрану *такая же*, как и сквозь тело клетки.

Кроме того, данные, полученные в эксперименте, спланированном так, чтобы подтвердить факт объемного характера сопротивления, явились внутренней проверкой теоретической модели. Действительно, методика эксперимента, созданная в строгом соответствии с

теоретическими требованиями — самый опасный для теории этап исследований. Но наш подход выдержал этот экзамен и привел нас к однозначному выводу: величину потока воды в исследованные клетки определяет объемное сопротивление тела клетки.

Если рассматриваемая диффузия определяется объемными факторами среды, в которой она протекает, то измерение входного (или выходного) потока меченой воды становится *новым* инструментом изучения коэффициента диффузии воды *в цитоплазме*. Если это действительно так, то обоснованность нашего заключения, что обмен воды в этих клетках определяется объемным сопротивлением

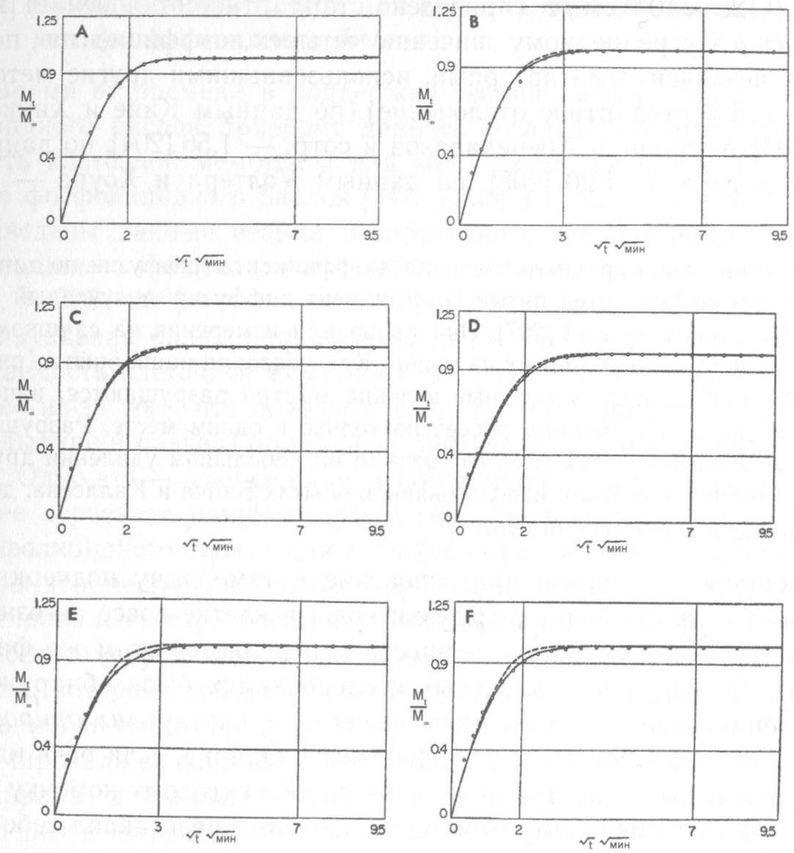


Рис. 39. Динамика поступления тритиевой воды в *группы* из нескольких яйцеклеток (A, B и C) и в отдельные яйцеклетки лягушки (D, E и F). Различий между одиночными клетками и группами найдено не было. Все полученные данные свидетельствуют о том, что вода в своем диффузионном движении преодолевает *объемное сопротивление* внутриклеточной среды; клеточная мембрана (поверхность клетки) не является особым и единственным барьером на пути воды из среды во внутриклеточное пространство. Сплошными линиями показаны аналитические выражения соответствующих эмпирических зависимостей, рассчитанные в соответствии с моделью диффузии в объеме однородной среды (A), — *простая* диффузия, — или в среде с адсорбцией или компартментализацией диффундирующего вещества (B—F). Пунктирные линии на графиках B—F рассчитаны по тем же экспериментальным данным, что и сплошные, но без учета адсорбции и компартментализации, то есть для случая *простой* диффузии (см. кривую B на рис. 38). Усредненный коэффициент диффузии, полученный из восьми групп экспериментов, оказался равным 1,00 ± ± 0,10 × 10^{-5} $см^2/с$ (приведена стандартная ошибка); сравните с коэффициентом диффузии тритиевой воды в обычной воде при той же температуре (25 °C): 2,44 × 10^{-5} $см^2/с$. (По Лингу и др. [201]).

движению ее молекул должна подтверждаться и другими методами определения коэффициента диффузии клеточной воды в тех же клетках. Такие подтверждения существуют [107, p. 224]. Однако здесь я рассмотрю лишь данные, касающиеся гигантских мышечных волокон морского желудя, так как на этом объекте в разных лабораториях получен большой материал, что позволит провести более детальное сравнение.

Коэффициент диффузии меченой воды в упомянутых гигантских мышечных волокнах был рассчитан Лингом и Рейзином на основе допущений модели объемного сопротивления диффузии. Восемь групп наших данных дали средний коэффициент диффузии, равный $1{,}35 \pm 0{,}125 \times 10^{-5}$ см^2/с (приведено стандартное отклонение) [202], что близко к усредненному значению четырех коэффициентов, полученных независимыми авторами, использовавшими другие методы: $1{,}36 \pm 0{,}13$ (стандартное отклонение) (по данным Кайе и Хинке — 1,34 [203]; по данным Абецедарской и сотр. — 1,56 [204]; по данным Финча и сотр. — 1,20 [205]; по данным Уолтера и Хоупа — 1,35 [206]).

При вычислении среднего значения коэффициента диффузии по данным литературы не был учтен пятый коэффициент диффузии, полученный Банчем и Каллсеном — 2,42 [207]. Они проводили измерения на слишком коротких сегментах, *вырезанных* из мышц. Как показали наши опыты (рис. 8, 17 и 18), рассеченные мышечные волокна быстро разрушаются, начиная от среза, даже если мышца рассечена только в одном месте. Разрушение коротких мышечных сегментов со срезами на небольшом удалении друг от друга, а именно они были использованы в опытах Банча и Каллсена, должно было быть еще более быстрым.

Завершая это первое прикосновение к теме, хочу подчеркнуть: объемное сопротивление диффузии воды в клетке вовсе не означает, что движение остальных веществ определяется этим же фактором. Напротив, в параллельных исследованиях было обнаружено, что проникновение целого ряда веществ в клетку *лимитировано именно ее поверхностью* [15, p. 404—417]. Однако, если речь идет о диффузии воды, то клетка ведет себя подобно «голому комочку протоплазмы», не имеющему мембраны, как это представлял себе еще Макс Шульце более 140 лет назад в своей *протоплазматической доктрине*.

Диффузия воды через сплошной липидный или фосфолипидный бислой имеет иные физические характеристики, и такая модель диффузии не может объяснить полученные нами параметры процесса, обусловленного в действительности объемным сопротивлением диффузионному потоку (*вода очень медленно проходит через липидные мембраны* — см. следующий раздел). Известные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что диффузионный вход воды в клетку ограничивается именно объемным сопротивлением среды, что является серьезным аргументом против теории *барьерной* роли липидного бислоя клеточных мембран.

После исключения липидного бислоя из числа кандидатов на роль форпоста клетки на границе со средой, остается только одна структура, способная выполнять эту функцию, служить квазинепроницаемым барьером почти для всех веществ, растворенных в воде, — это сама вода, связанная, поляризованная, структурированная (о проницаемости этого барьера для самой воды см. раздел 11.3, п. 4).

В следующем разделе аргументация *против* модели липидной мембраны и *за* модель водного барьера получит дальнейшее развитие.

13.4. Проницаемость клеток для воды на порядки выше, чем фосфолипидного бислоя

Время от времени в поддержку теории барьерной роли фосфолипидного бислоя приводят данные, согласно которым проницаемость клеточной мембраны для воды такая же как у искусственного фосфолипидного бислоя [344, Table 4.1]. Однако в этой работе приведены данные весьма некорректного эксперимента, случайно совпавшие с предсказанием ошибочной теоретической модели [208; 107, p. 225—230].

Фатальная ошибка произошла из-за серьезной недооценки проницаемости клеточной мембраны для воды [107, p. 228]. Недооценили ее из-за того, что *объемное* сопротивление диффузии воды (см. предыдущий раздел) приняли за диффузию, ограниченную *мембраной*. Одно это — уже серьезная погрешность. Но была сделана еще более серьезная ошибка: *правильно* определенная проницаемость фосфолипидного бислоя для воды (во время измерений которой растворы перемешивали с обеих сторон липидной мембраны) сравнили с *неправильно* определенной проницаемостью для воды клеточной мембраны (перемешивали лишь омывающий раствор). В результате время, которое требовалось меченой воде для диффузии через неподвижную клеточную воду (процесс сам по себе очень медленный) суммировали со временем, необходимым для пересечения клеточной мембраны; а итоговая сумма была принята за время, затраченное на переход *только* через мембрану, что существенно «уменьшило» ее проницаемость. Иначе говоря, дистанция, пройденная водой в эксперименте, на порядки превысила толщину мембраны, но время, затраченное на нее, было учтено как время прохождения *только* мембраны. В результате ее проницаемость снизилась и случайно совпала с проницаемостью искусственной мембраны.

На самом же деле проницаемость клеток для воды на порядки выше, чем фосфолипидного бислоя, почти непроницаемого как для воды, так и для гидратированных ионов [209] и неэлектролитов [435].

13.5. Поверхностное натяжение на границе раздела клетка/среда ниже, чем на границе раздела фосфолипиды/среда

Межфазное поверхностное натяжение между маслом и водой составляет 10 дин/см или больше [344, p. 91; 197, p. 2197]. Межфазное натяжение между фосфолипидным бислоем (фосфолипиды выделены из эритроцитов барана) и водой ниже, но колеблется в пределах от 1 до 2 дин/см [405]; в случае липидов мозга — 1 дин/см [406]; яичного лецитина с холестерином — также 1 дин/см [407]. В целом, межфазное натяжение между искусственными мембранами из простых липидов или из фосфолипидов и водой более чем на один и два порядка, соответственно, превышает натяжение между наиболее изученной клеткой — яйцеклеткой морского ежа и морской водой, которое, по данным профессора Коула, составляет 0,08 дин/см [408].

Харви также исследовал межфазное натяжение яйцеклеток морского ежа и получил значения не более 0,2 дин/см [409]. Однако Коул заметил, что Харви исследовал деформированную яйцеклетку, «поверхность которой была весьма растянута», что могло увеличить межфазное натяжение. Поэтому Коул пришел к выводу, что и его данные, и данные Харви соответствуют, с необходимыми поправками, одному результату — 0,08 дин/см. Однако и в своем собственном исследовании он допустил натяжку, решив, что «упругостью и вязкими свойствами поверхности и внутренней среды» яйцеклетки можно пренебречь. На самом деле это недопустимо, так как протоплазма клетки по своей природе — квазитвердое тело, которое легко меняет свои свойства при деформации. Поэтому истинное межфазное натяжение яйцеклеток морского ежа может быть даже ниже 0,08 дин/см.

Представление об очень низком межфазном натяжении клеток хорошо согласуется с весьма низким межфазным натяжением у *капель протоплазмы*, выдавленных из клеток *Nitella*: значения этого показателя не превышают 0,04 дин/см [410—416]. Достоверность этих данных подкрепляется знаменательным сходством между этими каплями и интактными клетками: капли не только обладают отрицательным *потенциалом покоя* от −70 до −90 мВ, как и большинство возбудимых клеток [411], но и являются электрически возбудимыми (как настоящие клетки), воспроизводя *потенциал действия* в ответ на короткий импульс электрического тока [411, 413, 414, 416].

Уеда, Инуе и их сотрудники, осуществившие эту блестящую серию опытов, предположили, что вначале на поверхности вытекающей из клетки цитоплазмы образуется фосфолипидная мембрана, а затем емкость, ограниченная ею, заполняется цитоплазмой, как воздушный шарик воздухом (в доказательство они продемонстрировали, что фосфолипаза А быстро разрушает такие капли) [415]. Однако это предположение противоречит известному факту: межфазное натяжение на поверхности капель протоплазмы значительно ниже поверхностного натяжения на границе раздела фосфолипид/вода. Более того, с повышением температуры межфазное натяжение капель падает еще больше и может стать гораздо ниже 0,001 дин/см. При понижении температуры натяжение возвращается к 0,04 дин/см. Столь низкое межфазное натяжение, наблюдаемое при физиологических условиях, не увязывается с идеей непрерывного фосфолипидного бислоя. Значит, липидов на поверхности капель на самом деле нет.

Подобно каплям протоплазмы *Nitella*, простой коацерват желатина и комплексный коацерват желатина и гуммиарабика также обладают очень низким межфазным натяжением, колеблющимся от 0,0015 до 0,0023 дин/см [61, p. 434, Fig. 1]. А фосфолипидов в этих образованиях вообще нет, ни внутри, ни на поверхности. Согласно теории МОПВ, а также представленной здесь усовершенствованной теории коацервации, чрезвычайно низкое межфазное натяжение обусловлено высоким содержанием воды в поверхностных слоях коацервата, связанной и структурированной линейными макромолекулами, ось симметрии которых перпендикулярна поверхности капли.

Низкое межфазное натяжение, объединяющее и яйцеклетки морского ежа (0,08 дин/см или ниже), и капли эндоплазмы Nitella (0,04 дин/см), и коацерват желатина-гуммиарабик (0,0023 дин/см), говорит о том, что мембрана клетки мало отличается от ее протоплазмы, структурную основу которой составляют полноразвернутые белки и связанное с ними множество слоев поляризованной ориентированной воды.

Однако, как я уже говорил, фосфолипиды могут играть роль стабилизатора структуры мембраны. Возможно, именно поэтому капли протоплазмы *Nitella* разрушались под влиянием фосфолипазы А [411]. С другой стороны, Цвааль и сотр. обнаружили, что эритроциты устойчивы по отношению к фосфолипазе А [417]. Возможно, это объясняется тем, что в мембране эритроцитов содержится больше всего фосфолипидов (47% сухого веса мембраны) по сравнению с 13 другими типами клеток [344, Table 9-2]. Далее я рассмотрю и другие аргументы против самого существования непрерывного фосфолипидного бислоя на поверхности клеток и его якобы барьерной функции.

13.6. Ионофоры на порядки усиливают проницаемость для ионов K^+ сплошного, искусственного фосфолипидного бислоя, но слабо влияют на проницаемость для K^+ мембран почти всех исследованных клеток

Как уже сказано, фосфолипидный бислой почти непроницаем для ионов, в том числе, и для K^+ [209] (раздел 13.2). Однако Андреоли с сотрудниками показали, что проницаемость для ионов K^+ бислоя фосфолипидов, выделенного из эритроцитов барана, увеличивается в 1000 раз в присутствии 10^{-7} М валиномицина [210]. Линг и Ок-

сенфельд увидели в этом выдающемся открытии редкую возможность проверить на практике достоверность модели фосфолипидного бислоя в целом и жидкостно-мозаичной модели мембраны в частности применительно к живым клеткам.

Мы решили, что, если мембраны всех клеток в самом деле содержат непрерывный фосфолипидный бислойный барьер, добавление к клеткам *валиномицина* в концентрации 10^{-7} М (или двух других калий-специфичных ионофоров, *нонактина* и *монактина*, также в количестве 10^{-7} М) должно повысить проницаемость клеток для K^+ во столько же раз, во сколько она повышается в искусственных мембранах, заведомо состоящих исключительно или почти исключительно из фосфолипидов.

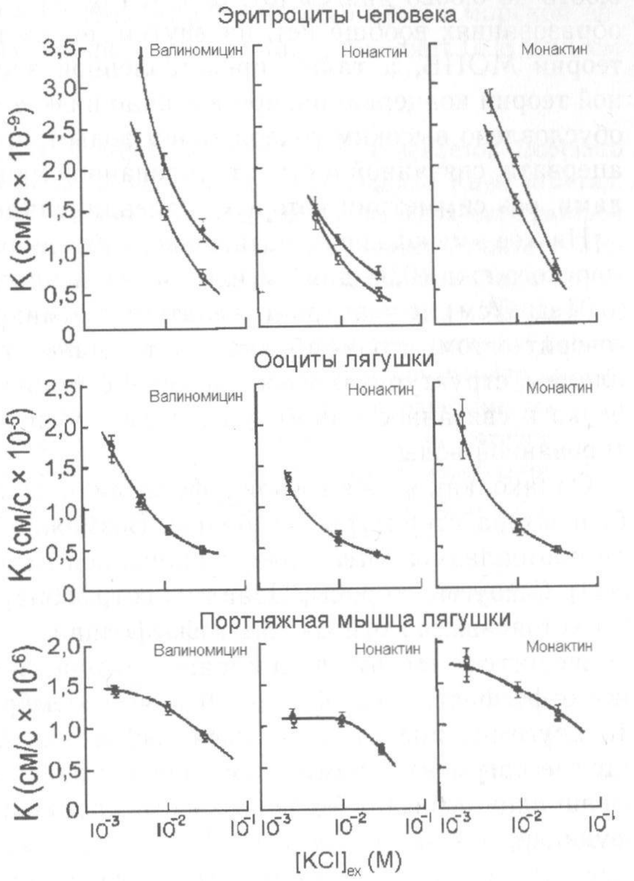


Рис. 40. Влияние трех антибиотиков («ионофоров»): валиномицина, нонактина и монактина (концентрация каждого — 10^{-7} М) на входной поток ионов K^+ в эритроциты человека, яйцеклетки лягушки (ооциты) и портняжные мышцы лягушки при различных концентрациях KCl в среде (ось абсцисс). Проницаемость для K^+ дана в см/с. ▲ — обработанные антибиотиком; о — контроль. (По Лингу и Оксенфельд [211]).

Но наши опыты опровергли эти ожидания [211]. Как видно на рис. 40, проницаемость ни яйцеклеток лягушки, ни мышц лягушки для K^+ не изменилась в присутствии какого-либо ионофора. Проницаемость эритроцитов человека для K^+, напротив, в присутствии каждого из ионофоров заметно повышается. Однако это повышение составило лишь 20% для монактина, 28% для нонактина и 80% для валиномицина, а вовсе не 100 000%, что соответствовало бы увеличению проницаемости в 1000 раз, если бы проницаемость исследованных клеток для K^+ действительно определялась наличием сплошной липидной пленки-мембраны. Эта громадная разница показывает, что даже в не совсем типичной мембране эритроцитов фосфолипидный бислой не может быть сплошным и не может быть настолько основательным барьером, насколько это необходимо мембранной теории.

Но не только нам не удалось обнаружить значимого влияния валиномицина на проницаемость мембран для K^+. Стиллман и сотр., Малофф и сотр., а также Негенданк и Шаллер также не обнаружили повышения проницаемости соответственно аксона кальмара [212], внутренней мембраны митохондрий печени мыши [213] или лимфоцитов человека [69] для ионов K^+ под влиянием валиномицина. Собрав все имеющиеся факты, мы приходим к выводу, что *нативные мембраны живых клеток — а именно, мембраны яйцеклетки лягушки, аксона кальмара, лимфоцитов человека, или внутренние мембраны митохондрий печени — не содержат непрерывного диффузионного барьера в виде фосфолипидного бислоя*, что подтверждает и расширяет наши собственные данные, представленные выше в разделе 13.3 и в этом разделе.

А теперь рассмотрим данные об *искусственной* «мембране из поляризованной воды», проницаемость которой для меченой воды, а также шести меченых сахаров и сахарных спиртов количественно соответствует проницаемости мембраны *живой клетки*.

13.7. Поляризованная и структурированная вода вместо фосфолипидного бислоя

Для начала вспомним о том, что удаление даже 95% фосфолипидов из внутренней мембраны митохондрий печени крысы, как и из любых клеточных мембран, не устраняет известной трехслойности их строения [214; 15, p. 382—384]. Более того, абсолютно *безлипидная* мембрана протеиноидных микросфер также имеет трехслойную структуру, как и клеточная мембрана (рис. 5Е) [216]. Эти факты еще раз подтверждают нашу точку зрения: не липиды, а *сильно поляризованная и структурированная вода образует на поверхности клетки сплошной барьер*. Поверхностные белки не только придают воде новые свойства, они также контролируют перемещение ионов и других веществ через клеточную поверхность, делая это посредством β- и γ-карбоксильных и других полярных и неполярных групп [15, Chapter 12]. В целом, поверхностные белки клетки образуют вместе с водой *избирательный диффузионный барьер на пути обмена воды, неэлектролитов* [217] (раздел 16.6, п. 3.2), *ионов* (раздел 13.2) и других веществ между клеткой и средой.

На рис. 41 представлены результаты сравнения проницаемости кожи лягушки и ацетилцеллюлозной мембраны для воды и шести

неэлектролитов при трех температурах. «Диализные» мешочки из кожи были обращены своей серозной поверхностью в омывающий раствор; ацетилцеллюлозные мембраны насыщали водой и активировали нагреванием. Как и в первом в истории осмотическом эксперименте, проведенном аббатом Нолле (гл. 2), проницаемость кожи для воды оказалась выше, чем для этанола и других исследованных веществ. Этот же результат был получен и для целлюлозной мембраны. А вот липидные мембраны Овертона были, наоборот, в 100 раз более проницаемы для этанола, чем для воды (рис. 34) [320, p. 43].

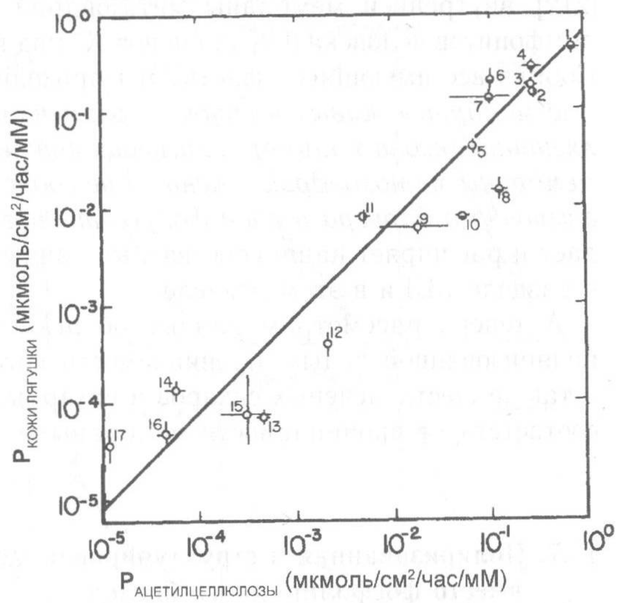


Рис. 41. Сравнение проницаемости *кожи лягушки* для меченой воды (ТНО), спиртов, сахарных спиртов и сахаров при трех температурах с проницаемостью *активированной нагреванием, гидратированной ацетилцеллюлозной* мембраны для этих же веществ и температур («диализные» мешочки из кожи лягушки были обращены в омывающий раствор серозной поверхностью). Точки — средние значения параметра; вертикальными и горизонтальными линиями показаны соответствующие стандартные ошибки определения среднего значения. В редких случаях, когда было доступно лишь два значения проницаемости, стандартную ошибку не вычисляли. 1 — ТНО, 25 °С; 2 — ТНО, 4 °С; 3 — ТНО, 0 °С; 4 — метанол, 25 °С; 5 — метанол, 0 °С; 6 — этанол, 25 °С; 7 — n-пропанол, 25 °С; 8 — этиленгликоль, 25 °С; 9 — этиленгликоль, 0 °С; 10 — глицерин, 25 °С; 11 — глицерин, 4 °С; 12 — глицерин, 0 °С; 13 — эритритол, 0 °С; 14 — ксилит, 0 °С; 15 — сорбит, 0 °С; 16 — L-глюкоза, 0 °С; 17 — сахароза, 0 °С. Светлые кружки — данные, полученные при 0 °С; кружки с темной правой половиной — при 4 °С; кружки с темной нижней половиной — при 25 °С. (По Лингу [217]).

Была найдена сильная положительная корреляция ($r = +0{,}96$) между проницаемостью кожи лягушки и проницаемостью ацетилцеллюлозной мембраны при всех трех температурах. Ввиду того, что на осях абсцисс и ординат на рис. 41 отложены величины одной размерности, мы можем констатировать *однозначное соответствие* проницаемости двух мембран в гигантском диапазоне значений проницаемости — пять порядков величины. Это соответствие означает, что и в коже, и в ацетилцеллюлозной мембране барьерную функцию выполняет одно и то же вещество — вода. Используя метод наименьших квадратов, можно получить аналитическое выражение рассматриваемой эмпирической связи:

$$\log (P_{кожи\ лягушки}) = 0{,}990\ 1 \log (P_{ацетилцеллюлозной\ мембраны}) + 0{,}16959, \quad (3)$$

где P — проницаемость двух исследованных систем для воды и 10 других веществ. Обратите внимание, что наклон прямой близок к 1, что и является экспериментальным свидетельством идентичности механизмов, обеспечивающих полупроницаемость обеих систем.

По данным Шульца и Асунмаа, средний размер пор активированной нагреванием ацетилцеллюлозной мембраны составляет 44 Å [343]. Это в пять раз больше диаметра молекул сахарозы (8,8 Å [311]), для которых она непроницаема. Объяснение этому парадоксу дает теория МОПВ: вода в широких порах обеих систем связана, поляризована и структурирована настолько сильно, что она слой за слоем заполняет собой все пространство поры. Такие же пробки из поляризованной воды (домены) закрывают поры и в других системах, например, в мембране ферроцианида меди Бигелоу и Бартелла, упомянутой в разделе 13.1, п. 1.

Напомню, что проницаемость водной мембраны для веществ зависит от объема молекул последних, что получает свое выражение в количественной связи между коэффициентом распределения веществ между структурированной водой клетки и обычной водой среды (q) и объемом молекул растворенного вещества (рис. 23, 25 и 26). А проницаемость (P) представляет собой произведение растворимости (величины q) и коэффициента диффузии (D) [277, p. 43]. В отличие от мышечных клеток и модельных систем, рассмотренных выше, в случае с кожей и ацетилцеллюлозной мембраной значения проницаемости для исследованных веществ покрывают огромный диапазон — пять порядков величины. Этот масштаб объясняется одним для всех механизмом проницаемости — барьерной функцией структурированной воды. Возникновение этого барьера обусловлено взаимодействием воды с макромолекулами, ее поляризацией при связывании и увеличением количества слоев структурированной воды. Растущие водные оболочки заполняют собой все свободное пространство между макромолекулами. Именно структурированная вода может быть ответственной за проницаемость, характеризующуюся объемным сопротивлением диффузии, которую уже давно заметили у коллодиевых мембран Фудзита [402] и Михаэлис [401], у серной бактерии *Beggiatoa mirabilis* — Рухланд и Хоффман [422], у водорослей *Characeae* — Колландер и Берлунд [403].

Подытоживая эту главу, мы приходим к заключению, что концепция клеточной мембраны на основе сплошного фосфолипидного бислоя, выполняющего барьерную функцию, явно устарела. Первое тому доказательство — чрезвычайно высокая проницаемость клеточной мембраны для воды. Второе — гораздо более низкое межфазное натяжение на границе клетка/среда, чем на соответствующей границе фосфолипидного (липидного) бислоя. Третье — неспособность валиномицина и других K^+-селективных ионофоров повышать проницаемость мембран живых клеток (мышцы лягушки,

аксона кальмара, яйцеклетки лягушки, митохондрии печени мыши, лимфоцитов человека) для K^+ в той же мере, в какой они увеличивают проницаемость искусственных фосфолипидных мембран, то есть в 1000 раз или около того.

С другой стороны, эти три группы данных хорошо согласуются с новой моделью клеточной мембраны, которая принципиально повторяет в своем строении и функционировании любую другую часть клетки, где бы она ни находилась. Подобно цитоплазме, клеточная мембрана содержит сеть полноразвернутых белков, поляризующих и структурирующих воду в многослойные образования, покрывающие клетку сплошным, непрерывным барьером. Термодинамические характеристики этой водной мембраны обусловливают ее полупроницаемость для растворенных веществ, объясняют ее квазинепроницаемость для крупных неэлектролитов и гидратированных ионов, механизм входа веществ в клетку и их выхода из нее. Функциональные группы мембранных белков, включая фиксированные β- и γ-карбоксильные группы, определяют адсорбционно-десорбционный характер диффузии веществ в клетку и из нее.

ГЛАВА 14.

ЖИВОЕ СОСТОЯНИЕ: ЭЛЕКТРОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ И УПРАВЛЕНИЕ

14.1. Появление теории ассоциации-индукции

14.2. Что отличает жизнь от смерти на уровне клетки и субклеточных структур? Новая концепция «живого состояния»

14.3. Электронный механизм дистанционного каскадного управления

Вначале немного истории. Думаю, читателю будет интересно узнать о том, как сотрудничество с другими учеными, знакомство с их идеями послужило толчком для превращения ТФЗЛ в единую физико-химическую теорию жизни — в *теорию ассоциации-индукции* (теорию АИ), первую в истории теорию такого рода.

История этой теории включает три ключевых события: появление ТФЗЛ в 1952 году, *теории ассоциации-индукции* — в 1962 и *теории многослойной организации поляризованной воды (МОПВ)* в клетке — в 1965. Несмотря на эту хронологию, я рассказал о самой поздней теории МОПВ *перед* тем, как изложить теорию АИ потому, что МОПВ, как и ТФЗЛ, рассматривает статические, *ассоциативные* характеристики, лежащие в основе физиологических отправлений клетки, а теория АИ объясняет ее динамические, *индуктивные* свойства. Поскольку динамика опирается на статические свойства, говорить о ней логично в последнюю очередь.

Для такой исторической непоследовательности в изложении есть еще одна причина. ТФЗЛ и теория МОПВ сосредоточены на молекулярных взаимодействиях (адсорбция ионов и воды), а теория АИ вторгается в сферу механизмов *электронной* регуляции этих взаимодействий, управления их ходом. Удивительно, но это направление молекулярной электроники также оставалось без внимания исследователей вплоть до появления теории АИ.

Свой рассказ об электронном управлении я разбил на две части. Первая часть — настоящая глава, в которой будет изложена природа и механизм электронного управления, его роль в поддержании так называемого *живого состояния*. Второй частью будет следующая глава. В ней будут рассмотрены электронные механизмы различных физиологических явлений и управление этими явлениями. Иначе говоря, это будет рассказ о том, как все это работает.

14.1. Появление теории ассоциации-индукции

1. Вступление

Как я уже говорил, мое обучение как физиолога началось под руководством профессора Ральфа Джерарда. Мне бы ни за что не удалось найти лучшего учителя и наставника, со столь обширными знаниями и интересами, блестящего в мыслях и действиях, и при этом так преданно воспитывавшего своих студентов, среди которых

был я сам. В аспирантуре я занимался совершенствованием методики изготовления стеклянного капиллярного электрода и заполнения его раствором KCl, чтобы с его помощью можно было проводить точные и воспроизводимые измерения электрических потенциалов клеток. С его помощью профессор Джерард и я смогли продолжить исследование потенциалов покоя мышечных волокон лягушки, начатые им с Джудит Грэхем ранее [88, 441, 442, 443]. Спустя некоторое время это привело меня к вопросу о механизме избирательного накопления K^+ клетками, а в конечном итоге — к теории фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ).

В 1952 году, впервые представляя ТФЗЛ [96, Fig. 5], а также в 1955 в короткой статье [145], я указал, что теоретически та же самая система фиксированных зарядов (т. е. β- и γ-карбоксильные группы белков), которая в цитоплазме избирательно адсорбирует K^+ в присутствии Na^+, могла бы играть также роль субстрата для возникновения потенциала покоя клетки (рис. 4С) в тонком поверхностном слое.

В 1949 году Ходжкин и Катц сделали эпохальное открытие, обнаружив, что во время *потенциала действия* селективные свойства клеточной мембраны изменяются: избирательная проницаемость для K^+ заменяется избирательной проницаемостью для Na^+ [233]. После этого удивительного известия я спросил себя: если потенциал покоя является результатом избирательной адсорбции K^+ фиксированными β- и γ-карбоксильными группами на поверхности покоящейся клетки (а не избирательной проницаемости ее мембраны), то не могут ли β- и γ-карбоксильные группы изменять свою избирательность с K^+ на Na^+ при формировании потенциала действия? И если да, то каким образом? Подсказки для ответа на этот интересный вопрос я нашел в экспериментах с ионообменными смолами и стеклянными электродами.

В 1952 году я привел в поддержку ТФЗЛ данные о целом ряде *систем фиксированных зарядов,* существующих в неживой природе, среди которых были пермутиты, почвы, а также синтетические ионообменные смолы [96, p. 773]. Все они несут фиксированные анионы, и избирательно накапливают K^+ в присутствии Na^+. Можно вспомнить, что еще задолго до этого Бенджамин Мур и Герберт Роуф упоминали почвы в этом же контексте [77] (глава 7).

Ионообменные смолы — гораздо более удобные модели для исследования, чем почвы. Во-первых, они проще по строению, и потому более понятны. Во-вторых, это продукт стремительно развивающихся новых технологий. Когда ТФЗЛ еще только вставала на крыло, непрерывно появлялись все новые и новые открытия о взаимосвязи между химическим строением смол и их ионообменными свойствами [15, p. 261—263; 478]. Все K^+-селективные смолы, на которые я ссылался в 1952 году [96], несут фиксированные анионные *сульфонатные* группы ($-SO_3H$). Когда же появились ионообменные смолы с фиксированными *карбоксильными* группами, оказалось, что они

избирательны к Na^+ в присутствии K^+ [143], на что первым обратил мое внимание профессор Конвей из Дублина, когда оспаривал мое мнение, что β- и γ-карбоксильные группы в клетках способны избирательно адсорбировать K^+ в присутствии Na^+ (раздел 10.1, п. 3). Несмотря на резкую дискуссию, навязанную им, я был благодарен ему за эту находку.

Уже тогда я был твердо убежден в том, что именно β- и γ-карбоксильные группы в мышечных волокнах избирательно адсорбируют K^+: помимо прочих причин, никакие другие фиксированные *анионные* группы в клетках не были достаточно многочисленны, чтобы обеспечить адсорбцию всего клеточного K^+. Однако в ионообменных смолах карбоксильные группы избирательно адсорбировали вовсе не K^+, как предписывала моя теория, а, наоборот, Na^+ [143]. Могут ли карбоксильные группы действовать по-разному? Если да, то как это можно объяснить?

Джекоб Брегман, систематизировавший знания о катионообменных смолах, отметил в 1953 году в своем обзоре [143, p. 135], что сульфонатные группы (более избирательные к K^+, чем к Na^+) весьма кислотны — имеют низкое pK, тогда как карбоксильные группы (более избирательные к Na^+, чем к K^+) слабо кислотны — имеют высокое pK. Пытаясь дать объяснение этим различиям в избирательности, он процитировал Тёниссена и Бунгенберг-де-Йонга [319], видевших причину различной избирательности коллоидов к K^+ и Na^+ в различной *поляризуемости* сульфонатных и карбоксильных групп.

Когда (гораздо позже) я решил копнуть поглубже, то обнаружил, что Бунгенберг-де-Йонг и его сотрудники очень много работали над вопросом ионной селективности коллоидов, но их основные публикации на эту тему появились в далеких 1930-х и 1940-х годах. Во избежание искажения их идей, я привожу их высказывания по большей части дословно.

Упомянутый уже не раз коллоидный химик Бунгенберг-де-Йонг, а также Тёниссен и другие ученые исследовали перемещение коллоидов в воде под влиянием постоянного тока. Они заметили, что при введении в раствор различных катионов направление перемещения коллоидов может меняться. Бунгенберг-де-Йонг с сотрудниками приписали это смене суммарного электрического заряда коллоида и назвали это явление «реверсией заряда» [161, p. 159—334]. Бунгенберг-де-Йонг позднее пояснил, что «если... реверсию заряда обычно вызывает связывание избыточного количества (положительно заряженных) катионов с ионизированными (отрицательно заряженными) группами (коллоида), то сродство катионов и ионизированных групп должно зависеть от *валентности, радиуса и поляризующей силы катиона, а также от поляризуемости отрицательно заряженных ионизированных групп коллоида*» (курсив Бунгенберг-де-Йонга) [61, p. 287].

Далее он продолжил: «Если же говорить, к примеру, об одновалентных ионах — Li, Na и K, то, если ограничиться только «напряженностью поля» на поверхности этих ионов, связывание с данной отрицательно заряженной группой будет легче всего для наименьшего иона — Li, и более

проблематичной для более крупных ионов — Na и K. Однако необходимо учитывать и вклад энергии поляризации. Если ионизированная группа более поляризуема, чем вода, то энергия поляризации суммируется с кулоновской энергией. В таком случае приведенный выше порядок катионов не изменится, но в ряду Li > Na > K увеличатся различия в энергии взаимодействия... Если же поляризуемость ионизированной группы меньше, чем у воды, то энергия поляризации молекул воды (при гидратации катиона) будет вычитаться из энергии кулоновского взаимодействия. В этом случае ион Li, как самый гидратированный, будет наиболее склонным оставаться в растворе, в состоянии полной гидратации» [61, p. 287—288] (А ионы по склонности к связыванию выстроятся в обратном порядке: K > Na > Li, — *добавление ГЛ*).

Бунгенберг-де-Йонг с сотрудниками также попытались объяснить различную избирательность к ионам коллоидов, *несущих карбоксильные группы,* различиями в их *поляризуемости.* Следующая цитата прояснит ход их мыслей:

«Кажется вполне естественным приписать меньшую поляризуемость карбоксильных групп последнего (то есть — арабината, карбоксильная группа которого сравнивалась с карбоксильной группой олеата, — *пояснение ГЛ*) некоему конституциональному влиянию. Они (арабинаты) являются производными полимерных углеводов, поэтому их карбоксильные группы соседствуют с гидроксильными, что и могло стать причиной снижения поляризуемости...» [61, p. 293].

Проверяя предположение, что ключевую роль играет именно поляризуемость анионных групп, Тёниссен, Розенталь и Зайер [144] показали в 1938 году, что наличие множества гидроксильных групп в молекуле арабината коррелирует с рядами избирательности $K^+ > Na^+ > Li^+$ и $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$, тогда как у олеата, чья молекула лишена гидроксильных групп, порядок избирательности обратный.

Ионообменные смолы, как модельные системы, побудили меня к поиску более убедительной теоретической модели, которая могла бы объяснить не только ионную избирательность $K^+ > Na^+$ (как в модели ТФЗЛ 1952 года), но и обратную — $Na^+ > K^+$. Но только встреча с Джорджем Эйзенманом, Дональдом Рудином и Джимом Кесби, а также предложенная ими позднее в качестве расширения ТФЗЛ новая гипотеза изменения ионной селективности, послужили для меня толчком к немедленным действиям.

В 1955 году я представил свою новую теорию электрических потенциалов клеток на собрании Федерации обществ экспериментальной биологии США в Атлантик-сити. И в устном выступлении, и в опубликованных тезисах я подчеркивал, что моя новая теория электрических клеточных потенциалов «тесно связана с теорией потенциала стеклянного электрода» [145].

Среди моих слушателей был профессор Гарри Грандфест из Колумбийского университета. Кроме того, эти собрания (но не мои выступления) посещал молодой доктор медицины из Гарварда Джордж Эйзенман. Незадолго до этого Эйзенману, Дональду Рудину и Джиму Кесби было предложено организовать отдел фундаментальных исследований в только что созданном Психиатрическом институте Восточной Пенсильвании (ПИВП) в Филадельфии. И среди наиболее интересующих их направлений были исследования электрических явлений в центральной нервной системе.

Во время экспериментов им потребовалось измерить уровень Na^+ в спинномозговой жидкости подопытных животных, заполняющей центральный канал спинного мозга. Но в то время необходимых для этого Na^+-селективных микроэлектродов еще не было на рынке. Тогда они приобрели подходящую электрическую печь и попытались сами изготовить Na^+-чувствительные электроды. Эйзенман с сотрудниками варьировал химический состав стеклянных электродов, и в результате были получены электроды с различной избирательностью к пяти ионам щелочных металлов: Li^+, Na^+, K^+, Rb^+ и Cs^+.

Грандфест рассказал Эйзенману о моем докладе и о моих исследованиях стеклянных электродов как модели электрических потенциалов живых клеток. После этого я и был приглашен посетить отдел фундаментальных исследований ПИВП. Во время визита я объяснил Эйзенману, Рудину и Кесби мою теорию усиления ассоциации противоионов, если один из них становится фиксированным, и теорию избирательной адсорбции K^+, в основе которой лежат, в первом приближении, различия в напряженности поля фиксированных карбоксильных групп, и вытекающие из этого различия в их взаимодействии с ионами K^+ и Na^+.

Во время обеда, неподалеку, в одном из ресторанов «Говард Джонсон» на Генри Авеню, я вслух размышлял со своими новыми друзьями, как можно модифицировать мою модель 1952 года с учетом их новых данных о факторах, влияющих на ионную селективность. Помнится, я предложил объединить мою модель фиксированных анионов с концепцией жестких пор на поверхности стекла. Я также предположил, что именно жесткая стеклянная стенка узкой поры, на дне которой расположен фиксированный анион, может заставить более гидратированные ионы терять ту или иную часть их гидратной воды, что и создаст различия в ионной избирательности. Но то была лишь мимолетная мысль, и я не стал ее развивать (лишь впоследствии мне стало известно о вышеупомянутой работе Бунгенберга-де-Йонга и его сотрудников).

Эйзенман, Рудин и Кесби предложили новую гипотезу, объясняющую различия в избирательности в ряду ионов щелочных металлов. Для начала они безоговорочно приняли мою теорию прочного связывания противоионов при фиксации одного из них, а также мою теорию избирательной адсорбции K^+, обусловленной *колебаниями напряженности электростатического поля* фиксированного аниона и соответствующим изменением силы взаимодействия с ионами K^+ и Na^+. Затем, в качестве расширения ТФЗЛ, они предположили, что вода из гидратных оболочек ионов щелочных металлов действительно может выжиматься в результате *изменения напряженности поля* фиксированного аниона, а не по причинам стерического характера (как это было в случае стеклянных пор, в моих рассуждениях в ресторане) и не из-за различной поляризуемости анионных групп, как предполагали Бунгенберг-де-Йонг с сотрудниками.

Затем, на основе этих допущений, они решили, что из пяти ионов щелочных металлов наименее гидратированный Cs^+ должен терять свою гидратную оболочку с наибольшей легкостью, Rb^+ — следующим, и так далее по порядку. В итоге было предсказано одиннадцать возможных рядов избирательной адсорбции ионов [146]. Поз-

же они сообщили, что разнообразие рядов ионной избирательности, которое они обнаружили в опытах со стеклянными электродами, подтвердило их предсказания [148, p. 274—279].

Ввиду растущего сближения наших интересов, Эйзенман уговорил меня оставить постоянную должность адъюнкт-профессора в Нейропсихиатрическом институте Медицинской школы Иллинойского университета и перейти к нему на должность штатного старшего научного сотрудника ПИВП. Он умел убеждать, а предложенные преимущества были велики. Я согласился без колебаний. И вот 1 марта 1957 года моя жена Ширли, наш малыш Марк и я сам прибыли в Филадельфию, где только что зацветала форзиция...

2. Величина c и количественная модель управления избирательной адсорбцией ионов

Блестящая идея Эйзенмана, Рудина и Кесби о дегидратации ионов [146], тем не менее оставалась лишь умозрительным намеком на возможность *количественной* оценки селективности, точно так же, как и идея Бунгенберг-де-Йонга и его сотрудников касательно поляризуемости фиксированных анионов. Сама причина, по которой гидратная оболочка ионов вообще должна утрачиваться в неком определенном порядке, оставалась неясной. Но *лично для меня* расширение ТФЗЛ Эйзенманом, Рудином и Кесби явилось толчком к дальнейшему совершенствованию моей *количественной теоретической модели* 1952 года с учетом всех предыдущих открытий Ходжкина и Катца, Конвея, Брегмана и Бунгенберг-де-Йонга с сотрудниками. И, конечно, нельзя забывать о неоценимом вкладе Эйзенмана, Рудина и Кесби.

С помощью Маргарет Сэмюелс и Мери Кэрол Вильямс моя напряженная работа принесла плоды уже в ближайшие месяцы. Итоги этой работы изложены в 4-й главе моей первой книги «Физическая теория жизни: теория ассоциации-индукции» [98]. Ниже я расскажу об основных ее моментах.

Я уже говорил о значениях pK сульфонатных и карбоксильных групп. pK — это отрицательный десятичный логарифм *константы диссоциации кислоты*, характеризующий сродство ионизированной кислотной группы к такому *особому* катиону как протон (H^+). Однако меня интересовал не сам pK, а то, что определяет его величину, некий параметр, лежащий в его *основе*. В то время подобного параметра в литературе никто не предлагал. Для восполнения этого пробела я ввел *величину c* [147; 98, p. 57—60; 15, p. 155; 107, p. 126—127].

Этот параметр имеет размерность длины (в ангстремах) и характеризует степень смещения единичного отрицательного заряда от геометрического центра однозарядного атома кислорода кислотной группы. Если смещение происходит в сторону от катиона, взаимодействующего с кислотной группой (по линии, соединяющей центры

атома кислорода и катиона), то параметр принимает отрицательные значения; если в сторону катиона — положительные. Величину смещения заряда вычисляли таким образом, чтобы его величина соответствовала бы реальным индуктивным изменениям (подробности см. в работах [98, Fig. 4.2] или [107, Fig. 6.7]). Так, карбоксильная группа уксусной кислоты обладает сильным сродством к H^+ (и, следовательно, высоким pK) ввиду, как мы увидим, большого значения параметра *c*. Карбоксильная группа трихлоруксусной кислоты, напротив, обладает слабым сродством к H^+ (низким pK) ввиду низкой величины *c* (поскольку в данном случае величина *c* принимает отрицательные значения, понятия «больше» и «меньше» имеют алгебраический смысл, то есть $-1 > -2$). Таким образом, величина параметра *c* может упрощенно рассматриваться как мера смещения электронной плотности заряженного атома кислорода кислотной группы, ее асимметрии. Кроме того, мною по аналогии была введена *величина c'* как мера смещения плотности положительного заряда фиксированной катионной группы [98, p. 60].

Определившись с физическим смыслом величин *c* и *c'*, я должен был вычислить наиболее энергетически выгодное количество гидратных молекул воды между фиксированным анионом и катионом в одномерной поре цилиндрической формы [98, Fig. 4.3; 173, Fig. 6] для каждого из пяти ионов щелочных металлов (а также H^+ и NH_4^+) при различных значениях *c* и при каждом из трех возможных значений поляризуемости фиксированной анионной группы [98, p. 61; 15, p. 157; 173, p. 15]. В этих вычислениях были учтены восемь видов взаимодействий. Затем методом зарядов Борна я рассчитал среднюю энергию диссоциации каждого иона и построил график ее зависимости от величины *c* [98, p. 60—78].

Одна из групп теоретических данных, рассчитанная для анионной поляризуемости $2{,}0 \times 10^{-24}$ см^3, показана на рис. 42. Из полученных зависимостей следует, что *высокая избирательность к K^+ по сравнению с Na^+ наблюдается при низких значениях c (−5 — −3,3), а при более высоких значениях c анионные группы связываются предпочтительней уже с Na^+*. Полученный результат соответствует наблюдениям Брегмана о том, что *сульфонатные смолы с низким pK кислотных групп избирательны к K^+ в присутствии Na^+, тогда как карбоксилатная смола, имеющая больший pK, более избирательна к Na^+, чем к K^+. Подобная же инверсия избирательности при изменении величины c показана и для других пар ионов, включенных в вычисления.*

Обозначенный мною подход к молекулярной электронике имеет исторические корни, состоящие вкратце в следующем:

1) Численные данные, полученные на теоретической модели, связывающей электронную плотность на фиксированном заряде (параметр *c*) с избирательностью его взаимодействия со свободными противоионами, подтверждают догадку Эйзенмана, Рудина и Кесби в том плане, что изменение величины *c* (эквивалентное их понятию

«изменение напряженности поля») — действительно является ключевым фактором, определяющим селективность фиксированных зарядов. В принципе, именно наименее гидратированный ион «обезвоживается» первым, что также соответствует их догадкам.

2) Однако в модели Эйзенмана никак не учтена такая важная характеристика, как поляризуемость фиксированного аниона (краткое и доступное изложение поздней теории Эйзенмана см. в работе Изарда [148, p. 70—75]), которая является не менее важным фактором; ее влияние на избирательность взаимодействия со свободными катионами весьма сложное и включает множество действующих сил.

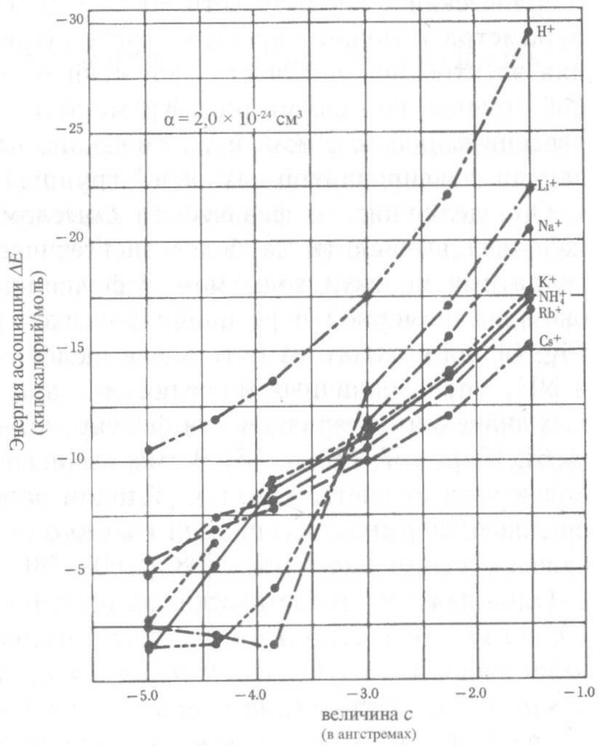


Рис. 42. Теоретически вычисленная энергия ассоциации (ккал/моль) ионов H^+, Li^+, Na^+, K^+, Rb^+, Cs^+ и NH_4^+ с однозарядной кислотной группой, обладающей поляризуемостью $2{,}0 \times 10^{-24}$ см^3 при различных значениях параметра c (ось абсцисс). Так, в случае иона K^+, при значении c −4,0 Å, энергия его связывания с фиксированным анионом будет почти в 2,5 раза выше (−8,3 ккал/моль), чем у Na^+ (−3,3 ккал/моль) и он будет предпочтительнее адсорбироваться фиксированным кислотным анионом. Однако при увеличении параметра c до −2,5 Å избирательность фиксированного аниона меняется на противоположную: энергия связывания Na^+ (−14,3 ккал/моль) становится больше, чем для K^+ (−13,2 ккал/моль). Реверсия ионной избирательности при изменении величины c играет, согласно теории АИ, важную роль в физиологии. (По Лингу [98]).

Важность этого параметра состоит, например, в том, что избирательность к иону H^+ становится *ниже,* чем к K^+ и Na^+ при любом значении c, если поляризуемость анионной группы составляет $0{,}876 \times 10^{-24}$ см^3 (или равна нулю, как в модели Эйзенмана) [98, Fig. 4.9]. Напротив, во всем исследованном диапазоне значений c избирательность к ионам H^+ *на два порядка превышает* избирательность к K^+, если анионная поляризуемость равна $2{,}0 \times 10^{-24}$ см^3, как на рис. 42. Действительно, получены веские экспериментальные данные, показывающие, что β- и γ-карбоксильные группы, адсорбирующие ионы K^+ как в цитоплазме, так и на поверхности мышечных волокон лягушки, адсорбируют ионы H^+ примерно на два порядка прочнее, чем K^+ [107, p. 133, n. 8, p. 248, n. 6, p. 289] (раздел 16.6, п. 3.4).

Нельзя забывать о *необходимости комплексного подхода* (примером которого может служить моя работа) к обсуждаемому вопросу и учитывать в ней все известные физические взаимодействия, ни одно из которых не может быть исключено из расчетов без достаточных на то оснований.

Бунгенберг-де-Йонг подчеркивал важность различий в поляризуемости анионных групп. Однако различна поляризуемость не только анионных групп, но и катионных. Так, поляризуемость иона H^+ равна нулю, Li^+ — $0{,}075 \times 10^{-24}$ см^3 и продолжает расти в ряду щелочных металлов до Cs^+ — $2{,}79 \times 10^{-24}$ см^3 [98, Table 4.1]. Однако учитывать только поляризующую силу катионов и поляризуемость фиксированных анионов так же ошибочно, как учитывать лишь поляризующую силу фиксированных анионов и поляризуемость катионов. *Все должно быть учтено,* как это сделал я. Однако даже мои результаты — не более чем *приблизительная* оценка.

Тёниссен, Розенталь и Зайер объясняли влияние введения OH-групп на катионную избирательность олеата, жирной кислоты, изменением *поляризуемости* карбоксильной группы, однако это предположение до сих пор не подтверждено прямыми экспериментальными данными. Тем не менее я считаю, что новые OH-группы способны изменять pK (а, значит, и величину c) карбоксильных групп, чему есть много подтверждений (см. рис. 45).

На рис. 42 видно, что расчеты проведены не только для пяти ионов щелочных металлов, но и для таких ионов, как H^+ и NH_4^+. Ионы H^+ присутствуют повсеместно в клетке и ее окружении. Ионы NH_4^+ также часто обнаруживаются внутри клеток и во внеклеточном пространстве. Однако эти ионы важны еще по одной причине. Их можно рассматривать как своего рода прототип вездесущих *фиксированных катионов*, будь то ε-аминогруппа ($R\text{-}NH_3^+$) остатка лизина или гуанидиновая группа ($R\text{-}C(NH_2)NH_3^+$) остатка аргинина в молекуле белка. Обратимо образуя солевые связи с β- и γ-карбоксильными группами, эти фиксированные катионы играют важную роль во всех видах физиологических и патологических изменений (см. абзацы с мелким шрифтом в разделах 10.2, п. 5 и 15.3, п. 2). Кроме того, образование солевых связей объясняет безуспешность попыток в прошлом продемонстрировать адсорбцию K^+ или Na^+ β- и γ-карбоксильными группами нативных белков (раздел 10.2, п. 2).

Читатель может спросить: «Как бóльшая избирательность к K^+ по сравнению с Na^+ была теоретически предсказана моделью ТФЗЛ, которая еще не учитывала ни величину c, ни поляризуемость кислотной группы»? Дело в том, что в модели ТФЗЛ я изначально исходил из *гораздо* большего диаметра гидратированного иона Na^+, чем K^+, чем невольно присвоил, как теперь становится ясно, соответствующим фиксированным анионным группам низкое значение c и высокую поляризуемость, то есть как раз те условия, при которых более гидратированный Na^+ слабее взаимодействует с фиксированными анионами, чем K^+ (подробнее об этом см. [98, Fig. 4.3, 4.6, 4.8]*).

* См. также статью Ling G. N. An ultra simple model of protoplasm to test the theory of its long-range coherence and control so far tested (and affirmed) mostly on intact cell(s). Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR (2006) 38: 105–145. *Прим. ред.*

3. Аналог величины c и его влияние на соотношение между степенью свернутости белка и количеством поляризованной воды

Представляя теорию ассоциации-индукции в 1962 году, я впервые выдвинул идею о том, как именно свойства и функции белка определяются его аминокислотной последовательностью: основной функцией полипептидной цепи является передача индуктивных эффектов от одной функциональной группы к другой, а характер индуктивных влияний определяется первичной структурой белка [98, p. xxxii]. В главе «Теория белков» [98] я также показал, как и почему *индуктивный эффект* зависит от аминокислотной последовательности, и как этот эффект работает, определяя характер свертывания белковой молекулы, ее *вторичную структуру,* в том числе влияя на образование солевых или дисульфидных мостиков и на участие NH- и CO-групп полипептидного остова в водородных связях. Чтобы воплотить эти идеи в численные данные, я ввел понятие *аналога величины c*, отражающего электронную плотность на диполях, — на карбонильных атомах кислорода пептидных связей, — и *аналога величины c′,* отражающего электронную плотность на NH-группах пептидных связей [98, p. 60; 488; 173] (физический смысл «*аналога величины c*» и «*аналога величины c′*» полностью совпадает с физическим смыслом «*величины c*» и «*величины c′*»; понятие «аналога» введено для того, чтобы подчеркнуть, что «параметр *c*» используется применительно к диполям, а не к единичным зарядам).

3.1. Регуляция вторичной структуры белков

Будучи явно неосведомленным о теории АИ и моей идее о том, как первичная структура белка определяет вторичную (см. ниже), профессор Анфинсон экспериментально доказал, что вторичная структура нативного белка может быть полностью восстановлена из денатурированного состояния прекращением действия денатурирующего фактора и воссозданием нормальных условий [149]. Это выдающееся достижение было удостоено Нобелевской премии по химии 1972 года.

Однако так и осталось неясным, каким именно образом первичная структура белка определяет вторичную. Было лишь выяснено, что нативное состояние белка термодинамически является для него в соответствующих условиях наиболее устойчивым. Это довольно важный факт, но сам по себе очень мало что говорящий. По крайней мере, для меня гораздо более значимым событием стало открытие в 1970-е годы определяющей роли *ближнего влияния* боковых групп каждого аминокислотного остатка на способность «своей» пептидной группы участвовать в образовании α-спиральной, β-складчатой конформации или случайного клубка [421]. Ведь еще за десять лет до этой публикации, в 1964 году [488, p. 104—106] и повторно в 1969 [173, p. 39—42] мною был предложен механизм влияния боковых групп на вторичную структуру белка.

Руководствуясь данными Кеннона [393] и других ученых [394—396] о том, что карбонильный кислород полипептидного остова гораздо более поляризуем, чем иминогруппа, я предположил, что *сила водородных связей между CO- и NH-группами полипептидного остова в α-спиральной структуре зависит в первую очередь от электронной плотности (или аналога величины c) на карбонильном атоме кислорода.* Чем выше электронная плотность на этих атомах кислорода, тем прочнее водородная связь, которую они образуют с NH-группами пептидных связей. А чем сильнее водородная связь NH...OC, тем выше шанс образования α-спирали.

Впервые предлагая эту гипотезу, я имел мало количественных данных о взаимосвязи между природой боковой группы и вторичной структурой белка. Но в дальнейшем ситуация изменилась, и к середине 80-х я уже имел вполне достаточно оснований вернуться к этому вопросу для более глубокой его разработки.

К тому времени была расшифрована вторичная структура многих белков, главным образом при помощи рентгеновского кристаллографического анализа. Собранные данные позволили рассчитать статистическую вероятность (*потенциал*) любого аминокислотного остатка участвовать в образовании α-спирали, β-складчатого листа, конформации случайного клубка и т. д. [150] (табл. 4). Эти цифры открыли для меня возможность проверить свою теорию формирования вторичной структуры на деле. Ведь если я смогу вычислить *электронодонорную силу* наиболее распространенных боковых групп, то эта сила должна прямо коррелировать с эмпирически установленным *α-спиральным потенциалом* каждой аминокислоты. Оставался нерешенным главный вопрос: как мне измерить *электронодонорную силу* боковой группы каждого аминокислотного остатка? Чтобы понять, как мне удалось решить эту проблему, давайте вернемся к основам.

Как я уже говорил, pK представляет собой отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации кислоты. pK уксусной кислоты (CH_3COOH) составляет 4,75. Как нам теперь известно, столь высокий pK обусловлен в первую очередь сильным *электронодонорным эффектом* метильной группы CH_3 [337; 338] (рис. 45). Остаток аминокислоты аланина ($CH_3CH_2NH_2COOH$) имеет ту же метильную боковую группу. Поэтому можно сказать, что 4,75 — мера электронодонорной силы боковой группы аланина. pK муравьиной кислоты ($HCOOH$) ниже, чем уксусной, и составляет 3,75. Эквивалентом (гомологом) муравьиной кислоты среди аминокислот является глицин (HCH_2NH_2COOH). Таким образом, 3,75 — численное выражение электронодонорной силы боковой группы остатка глицина (то есть атома водорода). Вот на этих двух примерах можно составить представление о предложенном мною методе вычисления электронодонорной силы всех 19 аминокислотных остатков, приведенных в последнем столбце табл. 4.

Таблица 4

Амино-кислота	Chou и Fasman (P_α)	Tanaka и Sheraga (w_{h,j^*})	Garnier *et al.* (j)	Уточненная pK_a соответствующих карбоновых кислот
Глу(−)	1,51	1,188	164	5,19
Ала	1,42	1,549	151	4,75
Лей	1,21	1,343	118	4,77
Гис(+)	1,00	0,535	98	3,63
Мет	1,45	1,000	139	4,50
Глн	1,11	0,795	96	4,60
Три	1,08	1,105	98	4,75
Вал	1,06	1,028	100	4,82
Фен	1,13	0,727	102	4,25
Лиз(+)	1,16	0,726	109	4,70
Иле	1,08	0,891	92	4,84
Асп(−)	1,01	0,481	91	4,56
Тре	0,83	0,488	60	3,86
Сер	0,77	0,336	47	3,80
Арг(+)	0,98	0,468	77	4,58
Цис	0,70	0,444	73	3,67
Асн	0,67	0,304	35	3,64
Тир	0,69	0,262	41	4,28
Гли	0,57	0,226	0	3,75

α-спиральный потенциал (P_α, w_{h,j^*}, j) 19 α-аминокислот по трем литературным источникам и уточненные константы диссоциации (pK_α) соответствующих им карбоновых кислот (Ling [150]).

К пролину и гидроксипролину этот метод неприменим из-за отсутствия атома водорода у пирролидинового атома азота, отчего у него ослаблена способность образовывать водородные связи, на которых держится вторичная структура. В этом случае правило электронной плотности не работает. По причинам, которые прояснятся позже, я хотел бы напомнить уже сейчас, что аланин давно известен как «создатель спиралей», а глицин — как «разрушитель спиралей». В подтверждение правомерности моего метода, pK этих двух аминокислот оказались на противоположных полюсах диапазона pK всех 19 изученных аминокислот (табл. 4).

Моим следующим шагом был линейный регрессионный анализ зависимости между электронодонорной силой 19 аминокислотных остатков и их α-спиральными потенциалами, данные о которых я почерпнул в работах Шу и Фасмана [151], Танаки и Шераги [152], а также Гарнье с сотр. [153] (табл. 4). Результаты подтвердили мою теорию.

При анализе данных из этих источников средний *коэффициент корреляции* составил +0,75 (при анализе отдельно данных Танаки и Шераги +0,75; данных Шу и Фасмана +0,77; данных Гарнье с сотр. +0,72). Если учесть, что достоверность прогнозирования структуры белков (исходя из аминокислотной последовательности) по этим α-спиральным потенциалам сама колеблется между 60 и 80%, средний коэффициент корреляции +0,75 можно считать вполне удовлетворительным.

Я пытался также обнаружить аналогичную корреляцию между электронодонорной силой боковых групп и их способностью к образованию β-складчатой конформации. После исключения из расчетов всех пяти заряженных боковых групп (либо только глутамата), способных разрушать β-складчатую структуру, опять же была найдена положительная корреляция, хотя и гораздо более слабая (r = +0,55; +0,42; +0,39) [150].

Для ясности я кратко повторю предположение, касающееся различной поляризуемости карбонильного кислорода и иминогруппы полипептидного остова. Любая боковая группа белка присоединена к атому углерода, находящемуся между карбонильной (CO) и иминогруппой (NH) пептидной связи. Поэтому изменение электронодонорной силы боковой группы может влиять на электронную плотность не только на карбонильном кислороде, но и иминогруппы. Откуда же мы знаем, что увеличение или уменьшение электронной плотности на одном только карбонильном кислороде определяет склонность полипептида к образованию α-спирали?

Ответ кроется в том факте, что *карбонильная группа, в отличие от иминогруппы, высоко полярна,* как уже давно установили Кеннон [393] и Мизусима с сотр. [394]. В связи с этим, боковая группа оказывает сильное влияние на электронодонорную силу ближайшего карбонильного кислорода и слабо влияет на протоноакцепторную силу ближайшей NH-группы (см. демонстрацию этого же принципа в аналогичной системе ниже, в разделе 14.3, п. 1 и на рис. 47).

Приведенные данные подсказывают решение следующего мнимого парадокса [107, p. 120]: раз белок имеет *лишь одну* первичную структуру, то он должен иметь *только одну* вторичную структуру, если мы утверждаем, что она определяется последовательностью аминокислот. Однако известно, что белок может менять свою вторичную структуру — например, под действием некоторых лекарств и гормонов [397], значит, она не задана раз и навсегда. Теперь это можно объяснить при помощи только что предложенной гипотезы о динамичной природе электронной плотности функциональных групп белка. Адсорбция молекулы лекарственного препарата или гормона на участок аминокислотной последовательности, образующий *рецепторный центр,* модифицирует электронодонорную силу боковых групп соответствующих аминокислотных остатков. В результате образуется новая вторичная конформация. Более подробно мы разберем механизм действия лекарств в разделе 14.3 и в главе 15.

3.2. Регуляция физического состояния клеточной воды

В предыдущем разделе я показал, что *увеличение* электронной плотности *(аналога величины c)* у карбонильного кислорода усиливает водородные связи, необходимые для формирования α-спиралей, а также, хотя и в меньшей степени, водородные связи β-складчатых

структур. В целом, это подтверждает работоспособность предложенного мною механизма ближних (индуктивных) взаимодействий, посредством которого первичная структура белка определяет его вторичную структуру. Но если взглянуть на эти данные с другой стороны, то обнаруживается еще одна интересная вещь.

В самом деле, если *повышение* электронной плотности у карбонильного кислорода полипептидного остова облегчает образование α-спиральной или β-складчатой конформации, то ее *понижение* должно, наоборот, увеличивать вероятность альтернативной конформации. Основной альтернативой является, конечно, «случайный клубок», или, если говорить языком теории МОПВ, *полноразвернутая конформация.*

Данные, представленные в главе 11, указывают, что если белок (или часть его молекулы) развернут настолько, что его полипептидный остов становится доступным воде, это неизбежно влечет за собой ее связывание с образованием *многослойной структуры из поляризованных и ориентированных* молекул воды. Выходит, что мы имеем дело со следующей последовательностью событий: снижение электронной плотности (аналога величины *c*) на карбонильном атоме кислорода полипептидного остова облегчает переход белка в полноразвернутую конформацию, а этот переход, в свою очередь, влечет за собой образование многослойной структурированной водной оболочки вокруг полипептидного остова.

На основе фактов, а также логики предлагаемой концепции, можно нарисовать схему, принципиально аналогичную рис. 42, но с тем отличием, что величину *c* β- и γ-карбоксильных групп (на оси абсцисс) заменит *аналог величины c* карбонильных групп полипептидного остова, а вместо двух конкурирующих адсорбатов, ионов K^+ и Na^+, появятся два других конкурента — либо функциональные группы белка, взаимодействие с которыми приводит к возникновению α-спиралей, либо вода, взаимодействие с которой приводит к появлению структурированных водных слоев. При высоких значениях электронной плотности будет предпочтительней образование α-спиральных водородных связей, а при низких — множества слоев поляризованной и ориентированной воды.

Итак, у нас появилось весомое теоретическое объяснение одной из важнейших биологических закономерностей — того, как именно первичная структура белка определяет его вторичную структуру, что, однако, никак не умаляет безусловно заслуженную профессором Анфинсоном Нобелевскую премию за открытие *de facto* связи между двумя этими структурными уровнями белка. В дополнение к этому, у нас есть теоретическая модель (с 1962 года), объясняющая механизм избирательной адсорбции K^+ в присутствии Na^+ β- и γ-карбоксильными группами белков как в толще цитоплазмы, так и на поверхности клетки, прекращающейся с ее гибелью. У нас есть также теоретическая модель, в которой вода связывается в виде множества слоев, что обусловливает распределение растворенных веществ между клеткой и средой в соответствии с размером их молекул (полупроницаемость), — свойство, также исчезающее при гибели клетки. Мне уже приходилось упоминать выше, что гибель клетки сопровождается утратой АТФ. Возникает вопрос, как связаны между собой ионы, вода и АТФ? Новый взгляд на роль АТФ, ее связь с величиной *c* β- и γ-карбоксильных групп, а также с электронной плотностью на карбонильных группах полипептидного остова будет главным предметом обсуждения в следующем разделе.

14.2. Что отличает жизнь от смерти на уровне клетки и субклеточных структур? Новая концепция «живого состояния»

Я не знаю, как определяет жизнь и смерть клетки теория мембранных насосов, но теория АИ дала свое определение этим понятиям. Жизнь и смерть клетки (или протоплазмы) определяются теорией АИ на основе концепции *живого* состояния. Эта концепция фигурирует в названии моей первой монографии, вышедшей в 1962 году: *Физическая теория жизни: теория ассоциации-индукции.*

1. Живое состояние

Сам термин «живое состояние» использовали время от времени и раньше [177], но лишь как замену слову «жизнь». Однако были и исключения. Например, идея Аристотеля о жизни как «форме» или организации [309, p. 19—20]. В Эпоху Возрождения (с XIV по XVII век) ученые заметили, что в неблагоприятных условиях организм может перейти в состояние спячки, не уходя из жизни. Это также привело их к мысли, что неотъемлемой составляющей жизни является ее *организация* [309, p. 20, footnote 2]. Но еще более содержательной была апелляция Жана Батиста Ламарка (1744—1829) к *«état de chose»* (положению вещей) [308; 3, p. 138—139], и понятие Лепешкина — «состояние жизни» [62, S. 269], появившееся два столетия спустя после Ламарка.

«État de chose» Ламарка, как и «состояние жизни» Лепешкина — предтечи «живого состояния», как оно понимается в теории АИ. Однако *живое состояние* в теории АИ отличается от более ранних идей тем, что его можно выразить четкими физико-химическими терминами [98].

Прежде чем перейти к определению живого состояния, как оно видится в теории АИ, нам необходимо выяснить, что есть мельчайшая единица живой материи. Большинство людей, не знающих о кризисе теории мембранных насосов (глава 12), полагает, что живой может быть только *целая клетка*, и не менее чем *целая клетка* [3, p. 310]. Однако это не так.

Несложно найти признаки жизни и на субклеточном уровне. Так, участок нервного отростка — аксона, отделенный от тела нервной клетки с ядром, никак не может рассматриваться в качестве *целой*

клетки. Но при этом он сохраняет все свои электрические функции, и именно на нем получена основная часть нынешних сведений о функционировании нервного волокна. Как же можно считать его мертвым? Капля эндоплазмы водоросли *Nitella* (рис. 3) может три дня прожить в подходящей среде [63]. А ведь она тоже никак не может считаться *целой* клеткой.

С точки зрения теории АИ, наименьшая единица живой материи — не клетка, а ее структурный материал — протоплазма. *Именно после появления нашей концепции живого состояния впервые обрела жизнеспособность сама концепция протоплазмы, выдвинутая еще полтора века назад Дюжарденом, фон Молем и остальными.* Конечно, лишь протоплазма, поддерживаемая в живом состоянии, может служить «физической основой жизни» [72], как ярко выразился Томас Хаксли. Смерть протоплазмы — это и есть конец жизни.

Однако я должен подчеркнуть, что в контексте теории АИ, структурная организация протоплазмы может принимать самые разные формы. Это не всегда описанное Дюжарденом, фон Молем и другими гистологами вязкое, но текучее «живое желе» (рис. 3), которое коллоидные химики называют «гелем» или *«коацерватом»*. Если мы рассечем мышцу лягушки, что мы делали при изготовлении препарата БНК (рис. 7), либо аксон кальмара [341, p. 36; 342], вязкая желеобразная консистенция протоплазмы не даст ей вытечь наружу, в противоположность эндоплазме поврежденной клетки водоросли *Nitella* [63]. Несмотря на различия в консистенции, любая протоплазма обладает способностью существовать в *живом состоянии* и переходить в *мертвое состояние*, если к этому принуждают изменения окружающей среды.

Представить физико-химическое определение живого состояния поможет простая модель — цепочка стальных гвоздей, свободно соединенных друг с другом проволочкой (рис. 43) [173, p. 37; 107, p. 31—38]. Если приставить к концу цепочки сильный магнит, вся цепочка намагничивается. В результате не только цепочка гвоздей приобретает более жесткую и упорядоченную «конформацию», намагничиваются также хаотично разбросанные вокруг железные опилки, которые притягиваются к цепочке гвоздей поодиночке или «множеством поляризованных слоев». В итоге образуется единая система из сцепленных гвоздей, железных опилок и магнита, свободная энергия которой выше, чем у исходной, а энтропия такой системы ниже, чем у системы невзаимодействующих элементов. Удаление магнита размагничивает гвозди и железные опилки, система распадается, возвращаясь в исходное *высокоэнтропийное* состояние с более низким уровнем свободной энергии. Первое, «живое», состояние я называю высоко(отрицательно)энергетическим и низкоэнтропийным состоянием, а второе, «мертвое», — высокоэнтропийным низко(отрицательно)энергетическим состоянием.

Слово «отрицательная» в скобках введено перед словом «энергия» в конце 1980-х во избежание недоразумений. До этого я описывал живое состояние просто как высокоэнергетическое, низкоэнтропийное состояние. Это было равноценно высказыванию, что адсорбируемое вещество обладает высокой энергией адсорбции на белке, равной, допустим, −15 ккал/моль. То есть свободная энергия системы при адсорбции снижается. Вот почему данное выражение впоследствии было дополнено словом «отрицательная». Я могу заметить также, что выражение «отрицательная энергия» отнюдь не является чем-то новым. К примеру, вполне привычно выражение «отрицательная энтропия», фигурирующее в разделе 14.3, п. 4.

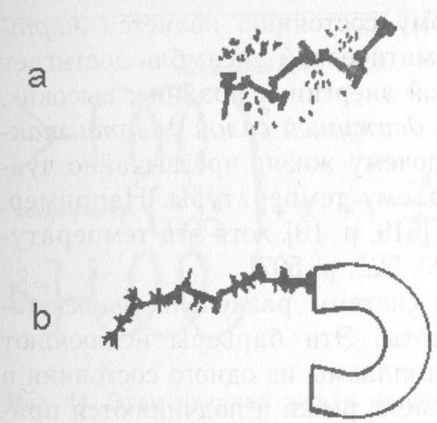


Рис. 43. Магнит, гвозди и железные опилки. Цепочка из гвоздей, свободно соединенных между собой проволочкой, имеет случайную конфигурацию и не взаимодействует с рассыпанными железными опилками (a). Сильный магнит, приложенный к одному из концов цепочки, заставляет всю цепочку гвоздей намагнититься, спрямиться и притянуть к себе железные опилки, которые прилипают к гвоздям поодиночке или скоплениями, слоями (b). (По Лингу [173]).

Протоплазма, будь то вязкая жидкость или плотный гель, является тесно ассоциированной и *кооперативно связанной* системой элементов — белков, ионов и воды (определение *кооперативности* см. ниже в подразделе 2). Белок — аналог цепочки гвоздей. Ионы K^+ и молекулы воды — железные опилки. И, наконец, аналогом магнита является *главный кардинальный адсорбат* — АТФ. Протоплазма, поддерживаемая в живом состоянии, подобно модели с магнитом, гвоздями и опилками, имеет низкую энтропию и высокую (отрицательную) энергию, но в протоплазме вместо намагничивания и размагничивания имеет место *электронная поляризация и деполяризация (или индукция)*.

Живое состояние может быть различным. Протоплазма может существовать в *покоящемся живом состоянии* или в *активном живом состоянии,* которые перекликаются соответственно с *пассивным* и *активным состоянием жизни* в трудах Лепешкина [62, p. 269]. В активном живом состоянии отрицательная энергия ниже, а энтропия выше, чем в покоящемся. Переход из покоящегося состояния в активное — главное содержание большинства *физиологических явлений,* и этот переход, как правило, *приводится в действие энтропией.* Иными словами, именно прирост энтропии в первую очередь является движущей силой перехода протоплазмы из покоящегося

состояния в активное (другие примеры процессов, определяющихся энтропией, см. в работе Лоффера [548]).

Однако утверждение, что движущей силой физиологических процессов является рост энтропии, справедливо лишь для процессов, совершающихся *однократно* — при переходе из покоящегося состояния в активное. Если же речь идет о циклическом процессе, в результате которого система постоянно возвращается в исходное состояние покоя, энтропия и энергия этой системы остаются неизменными. В этом процессе совершается лишь работа за счет энергии, полученной из питательных веществ. Я вернусь к этому вопросу ниже в подразделе 4.

Предельной альтернативой живому состоянию является *мертвое состояние*, в котором протоплазматический ансамбль достигает самого низкого уровня отрицательной энергии и крайних, высоких, значений энтропии. Таким образом, *движущей силой смерти также является рост энтропии*. Вот почему жизнь чрезвычайно чувствительна даже к небольшому подъему температуры. Например, мышца лягушки погибает при 41 °С [519, p. 19], хотя эта температура тела обычна для многих птиц [520; 521, p. 507].

Все возможные состояния живой системы разделены *энергетическими барьерами* различной высоты. Эти барьеры исключают спонтанный переход клетки или протоплазмы из одного состояния в другое. Сами эти переходы, как правило, резки и подчиняются правилу «все или ничего». Причину этого я исследую в конце раздела о *кооперативных* переходах между альтернативными состояниями (раздел 14.3, п. 2).

2. Элементарная живая машина

В 1939 году Энгельгардт и Любимова [283] взбудоражили мировое сообщество физиологов простым экспериментом. Оказывается, АТФ, конечный продукт метаболизма питательных веществ, вызывает укорочение нагруженной белковой нити, полученной из сократительного белка мышечных волокон — актомиозина. При этом АТФ подвергается гидролизу вследствие АТФазной активности данного сократительного белка. Этот опыт наглядно показал, как скрытая химическая энергия, содержащаяся в высокоэнергетических фосфатных связях АТФ, может переходить в механическую работу. Мне хорошо знаком этот предмет: давным-давно, когда я еще аспирантом читал цикл лекций студентам-медикам, этот простой опыт был моим коронным номером.

Однако читатель уже знает из 12-й главы, что концепция высокоэнергетической фосфатной связи была опровергнута еще в середине 1950-х [133; 134]. Ни одна фосфатная связь АТФ не содержит энергии, которую можно было бы использовать. Вскоре после этого революционного открытия такие ученые, как Райзман и Кирквуд [109], а также Моралес и Боттс [284], принялись за поиски иного способа,

каким бы АТФ могла осуществлять свою ключевую роль в клетке. Ранее, в разделе 10.1, п. 2, я говорил, как однажды использовал идею Райзмана и Кирквуда, чтобы объяснить роль АТФ в избирательном накоплении K^+ клетками [96, p. 777—778] и как впоследствии заменил первую модель теории АИ другой — индуктивной.

В новой модели к прямому электростатическому эффекту (*D-эффекту*), распространяющемуся в пространстве согласно закону Кулона (как и в модели Райзмана-Кирквуда), добавлен более прецизионный *индуктивный эффект (I-эффект)*, распространяющийся по цепи атомов [98, p. 97—98]. Так как в большинстве физиологических явлений, происходящих в протоплазме, явно преобладает именно индуктивный компонент, я продолжу называть индукцией то, что, строго говоря, следовало бы называть прямым F-эффектом, как я делал в своих первых работах [98; поскольку на практике I- и D-эффекты трудно различать, их суммарное действие обозначается в теории АИ как F-эффект].

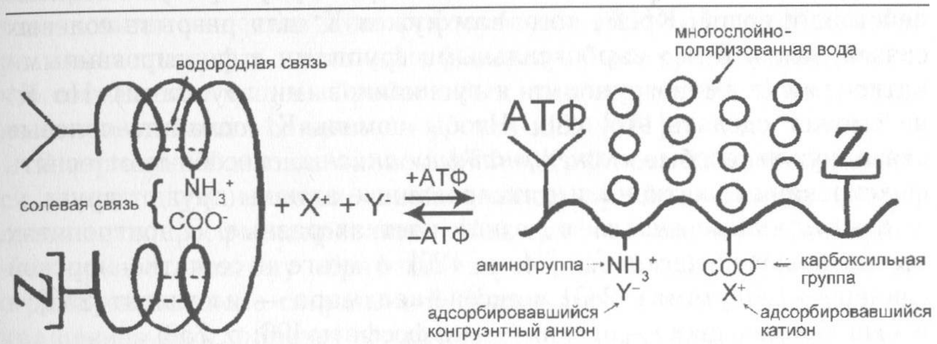


Рис. 44. Элементарная живая машина. Слева и справа — альтернативные состояния молекулы белка, определяющие альтернативные состояния протоплазмы: активное состояние (слева) и состояние покоя (справа). Адсорбция активным белком, его *кардинальным* АТФ-связывающим *центром,* кардинального адсорбата — АТФ, а также «помощников», в том числе *конгруэнтных анионов* (показанных здесь как «адсорбированные конгруэнтные анионы») и *белка X* (отмеченного знаком «Z»), разворачивает *интровертную* (свернутую) вторичную структуру белка. В ходе этой трансформации рвутся солевые связи и освобождающиеся β- и γ-карбоксильные группы (изображенные в правой части рисунка в виде карбоксильных групп) начинают избирательно сорбировать ионы K^+, а освободившиеся от участия в формировании вторичных структур NH- и CO-группы пептидных связей начинают взаимодействовать с водой, формируя многослойную структуру из поляризованных и ориентированных молекул воды — одного из ключевых факторов в поддержании живого состояния покоя. (Последняя версия рисунка, впервые опубликованного в 1969 году в работе [173]).

На рис. 44 изображена схема минимального фрагмента протоплазмы, который обладает всеми необходимыми чертами *живого состояния покоя* и способен к структурным изменениям, необходимым для перехода в альтернативное обратимое *активное живое состояние*, и необратимое — *мертвое состояние*. Иными словами, это схема *элементарной живой машины*.

В правой части рис. 44 элементарная машина изображена в покоящемся живом состоянии, в левой — в активном живом состоянии *или* в мертвом состоянии. Различия между этими двумя последними состояниями будут рассмотрены в следующем разделе.

Теоретически, чтобы вдохнуть жизнь в умирающую элементарную живую машину и вернуть ее в покоящееся живое состояние, нужно развернуть «интровертную» *активную* либо *мертвую* протоплазму, и снова превратить ее в «экстравертную». Для этого нам нужна, кроме АТФ, поляризованная и ориентированная вода, способная ослабить внутри- и межмолекулярные водородные связи между NH- и CO-группами полипептидного остова и «развернуть» их для взаимодействия с водой. Кроме того, нам нужен K^+ для разрыва солевых связей между β- и γ-карбоксильными группами и фиксированными катионами (ε-аминогруппами и гуанидиновыми группами). Но K^+ не сможет сделать это один. Чтобы помочь K^+ ослабить солевые связи, нужны особые *«конгруэнтные» анионы*, способные оттеснять фиксированные катионы и фиксированные анионы друг от друга.

Конгруэнтные анионы в разных клетках разные. В эритроцитах это по большей части Cl^- [74, p. 120], в мозге и сетчатке морской свинки — L-глутамат [285], в аксоне кальмара — изетионат [286], а в мышцах лягушки — органические фосфаты [96, p. 758].

Еще одним ценным помощником АТФ является схематично изображенное на рис. 44 вещество (отмеченное знаком «Z»), которое я называю *белком (или белками) X*. Наша исследовательская группа в Пенсильванской больнице гналась по пятам за этим гипотетическим веществом, содержащимся в эритроцитах. И вот мы уже почти его идентифицировали [107, p. 184—186], как вдруг наша лаборатория была закрыта Национальным институтом здоровья и Управлением морских исследований США. Собрание их послушных консультантов или что там у них было, потребовало прекращения нашей работы [247]. И, несмотря на невероятно любезную и своевременную помощь доктора Реймонда Дамадьяна и его компании Fonar, мы оказались лишены средств, необходимых для завершения наших поисков, — радиоизотопных технологий, высокоскоростных центрифуг, приборов для ионного анализа и т. д. Загадка белка X так и осталась нераскрытой.

Однако есть веские основания подозревать, что белком X (или одним из белков семейства X) является *актин* [107, p. 186; 543, p. 47] в мономерной форме или как часть системы микрофиламентов [544; 545].

3. Чем отличается мертвое состояние от активного живого?

Согласно теории АИ, движущей силой физиологических процессов и самой гибели клетки является *увеличение энтропии*, то есть именно рост энтропии является необходимой предпосылкой для перехода системы из покоящегося живого состояния в активное (например, сокращение мышцы). Поэтому нет ничего удивительного в том, что

изменения в интенсивно работающей клетке зачастую качественно сходны с изменениями при гибели клетки. Например, повторяющиеся сокращения поперечнополосатой мышцы сопровождаются утратой клеточного K^+ и притоком в клетку Na^+, что наблюдается и в умирающей мышце [122] (см. также рис. 56). Согласно ТФЗЛ, ключевую роль в развитии обоих состояний играет утрата АТФ.

Многие годы исследователей физиологии мышц озадачивало отсутствие снижения уровня АТФ после *одиночного* мышечного сокращения. Причиной этому является фермент *креатинфосфокиназа,* сразу восполняющий затраты АТФ при работе клетки за счет запасов креатинфосфата (КрФ). Когда же Инфант и Дэвис обнаружили, что ядовитое вещество динитрофторбензол (ДНФБ) способно избирательно подавлять креатинфосфокиназу, было сразу же показано, что сокращение мышц, обработанных этим веществом, действительно сопровождается снижением уровня АТФ [371].

В нормальной мышце запасы АТФ и КрФ постоянно восполняются за счет двух основных метаболических путей: гликолиза и окислительного фосфорилирования. Иодуксусная кислота блокирует этот процесс, поэтому обработанные ею мышцы способны лишь на ограниченное число сокращений. Кроме того, с каждым новым сокращением расслабление отравленной мышцы становится все менее полным до тех пор, пока она полностью не перестает сокращаться, достигнув стойкого укорочения — *окоченения,* что означает ее гибель [372] (см. Fig. 8.3 in Appendix 1 в работе [49]).

Итак, *главным отличием мертвого состояния от активного живого является необратимость одного и полная обратимость второго, хотя существуют и количественные отличия — степень изменений при мертвом состоянии, как правило, более глубока.* Главная роль метаболизма — после каждого перехода в низко(отрицательно)энергетическое высокоэнтропийное состояние обеспечить быстрое и полное возвращение в исходное высоко(отрицательно)энергетическое низкоэнтропийное живое состояние.

4) Что дает пища: энергию или отрицательную энтропию?

Крайне интересно и поучительно будет узнать, что говорил о *жизни* один из величайших физиков-теоретиков Эрвин Шрёдингер [363]. В своей книжке «*Что такое жизнь с точки зрения физики*», вышедшей в 1944 году, Шрёдингер презрел общепринятое убеждение, что мы и все остальные организмы питаемся *энергией.* Он настаивал: «То, чем кормится организм, — отрицательная энтропия» [363, p. 71].

Это высказывание вызвало протесты многих ученых, отвечая на которые он признал, что энергетическая составляющая пищи все же имеет значение [363, p. 74]. Однако теперь мы остались без четкого ответа. Чем же мы питаемся — энергией или «отрицательной энтропией»? Почему более чем за полвека, на протяжении которых

книжка Шрёдингера переиздавалась не менее 18 раз, никто так и не предложил своего варианта ответа? Я вижу основную причину этой нерешительности в логике теории мембранных насосов, прямо противоречащей предположению Шрёдингера.

Как читатель уже отлично знает, согласно теории мембранных насосов, клетка содержит *лишь свободные* вещества *и свободную* воду, а это — уже максимум энтропии и дальнейший ее рост невозможен. В этом случае живая клетка, согласно теории мембранных насосов, содержит не больше «отрицательной энтропии», чем погибшая. А если учесть, что погибшая клетка склонна к большей жесткости *(трупное окоченение)*, можно даже подумать, что в погибшей клетке больше отрицательной энтропии (упорядоченности), чем в живой. Однако Шрёдингер твердо верил, что именно отрицательная энтропия «бережет нас от смерти» [363, p. 71].

Выходит, что либо Шрёдингер не прав, либо теория мембранных насосов. В главе 12 было показано, что определенно не права теория мембранных насосов. Значит ли это, что мы, в самом деле, потребляем именно отрицательную энтропию?

И да, и нет. Дело вот в чем. В разделе 10.2 и главе 11 были представлены данные, доказывающие, что адсорбированное состояние клеточного K^+ и клеточной воды — неотъемлемая черта покоящегося живого состояния. Адсорбция ограничивает свободу их перемещения и создает тем самым отрицательную энтропию, что полностью согласуется с акцентом Шрёдингера на необходимости высокой отрицательной энтропии для существования жизни. Но нельзя ведь потреблять саму по себе отрицательную энтропию и прямо направлять ее к молекулам воды и ионам K^+, к примеру, чтобы они адсорбировались. Однако мы можем добиться этого *косвенно*.

Благодаря потрясающим достижениям биохимии нам стало известно, что распад каждой молекулы глюкозы до CO_2 и воды в результате гликолиза и окислительного фосфорилирования сопровождается синтезом 36 молекул АТФ [273, p. 517]. Адсорбция АТФ кардинальными центрами основных внутриклеточных белков (например, миозина в мышечных волокнах) влечет за собой тотальную адсорбцию воды и K^+ с утратой ими свободы перемещения и соответствующим ростом отрицательной энтропии. (Более подробное обсуждение того, как АТФ выполняет эту жизненно важную функцию, см. ниже в разделе 14.3, п. 4).

Итак, мы потребляем не отрицательную энтропию как таковую. Мы потребляем пищу, содержащую доступную для использования энергию, благодаря чему образуется АТФ. АТФ, в свою очередь, адсорбируясь на белке, вызывает адсорбцию большей части внутриклеточного K^+ и, что самое важное, — адсорбцию почти всей внутриклеточной воды с образованием множества поляризованных, ориентированных слоев. При этом отрицательная энтропия существенно растет (а по абсолютной величине — снижается) и поддерживается на высоком уровне клетками в состоянии покоя. При циклической работе клетки, когда с каждым новым циклом протоплазма возвращается в исходное состояние покоя, энергия пищи тратится на ресинтез АТФ, затрачиваемой во время каждого цикла физиологической активности для восстановления этого исходного состояния.

Я использовал модель с магнитом, чтобы продемонстрировать механизм дистанционной каскадной регуляции энергии системы и ее энтропии. Однако уже говорилось, что аналогом магниту в живой клетке, как гласит теория АИ, являются внутримолекулярные электронные взаимодействия, которые и будут предметом рассмотрения в следующем разделе.

14.3. Электронный механизм дистанционного каскадного управления

Электрический импульс, переданный по медному проводу длиной в 7 земных экваторов, пройдет это расстояние менее чем за секунду. Исключительная скорость электрической передачи по проводам, открытая Бенджамином Франклином, позволила создать такие великие изобретения, как телеграф, телефон и интернет, превратившие обычных людей в волшебников, ежедневно творящих технические чудеса.

Естественно, биологи задавались вопросом о том, может ли в основе координированности физиологических явлений лежать тот или иной способ дистанционной передачи сигналов. Но ответ оказался отрицательным — нет, не может. Единственным кандидатом на роль биологических проводов могли бы быть вездесущие белки с их длинными молекулами. Но белки не являются проводниками. Наоборот, нити такого типичного белка, как шелк, используют для подвешивания и *изоляции* металлических шаров при школьных демонстрациях феномена электростатического взаимодействия зарядов [328, p. 6].

Конечно, мы знаем, что сигналы могут передаваться в виде *потенциалов действия* по мембране нервных и мышечных волокон. Менее известно, что в основе функционирования элементарной живой машины на молекулярном уровне лежит *дистанционный каскадный контроль*. Более того, оба эти способа дистанционной передачи сигнала имеют, похоже, близкий механизм, что можно продемонстрировать на искусственной модели.

Более двух тысячелетий тому назад враждебные взаимоотношения с гуннами (называемыми в Китае Hsiung-nu) привели к возведению Великой китайской стены, которую можно рассматривать как своего рода аппарат для скоростной передачи информации на большие расстояния. Длиной более 6350 км, пересекающая пустыни и скалистые горы, эта рукотворная структура видна даже из космоса. Отлично вымощенная и настолько широкая, что по ней рядом могут скакать две лошади, она являлась также скоростным шоссе древности, поднятым над землей на много метров.

Стена соединяет между собой череду сторожевых башен, расположенных друг от друга на расстоянии 200—500 метров. При появлении неприятеля часовые, находящиеся в такой башне, тут же разжигали костер и подавали этим световой и дымовой сигнал другим постам. Увидев их, часовые соседних сторожевых башен в свою очередь тоже зажигали костры, передавая сигнал тревоги дальше. И так сигнал быстро передавался по цепочке сторожевых башен, пока не достигал гарнизонов, охранявших границу. На помощь постам, подвергшимся нападению, быстро прибывала конница и отражала натиск врага. Этот цепной способ передачи сигналов по Великой китайской стене может служить моделью быстрой передачи информации способом, альтернативным проводной связи — передача информации на большие расстояния обеспечивается многократным повторением ближних взаимодействий соседних сторожевых башен. Эта модель обладает существенным сходством как с распространением *потенциала действия* вдоль нервных и мышечных волокон, так и с распространением *индуктивного эффекта* вдоль белковых цепей (согласно теории АИ).

1. Электронная индукция в белках

Белки — основной субстрат жизни. Нельзя отрицать важность и ДНК с РНК, без которых жизнь не смогла бы долго продолжаться. Но функции ДНК и РНК не выходят за рамки функции кодирования ими белков (если не считать самокопирования), так что их роль не так тесно связана с жизнью, как роль белков.

Каждый белок — это уникальная последовательность аминокислотных остатков, разнообразие которых, как правило, составляет двадцать две аминокислоты. Поэтому язык жизни можно сравнить с письменным языком (английским, например), алфавит которого включает двадцать шесть букв. Слова *eat* и *ate* имеют разные значения, хотя набор букв в них одинаков. Так и белок характеризуется не только природой и количеством аминокислотных остатков, но и порядком их расположения в цепи.

Разница между словами *eat* и *ate* чисто внешняя. Различие же между разными последовательностями аминокислотных остатков гораздо более глубокое. Во-первых, у них разная форма молекулы, или конформация. Еще важнее их *электронные* отличия в силу действия *индуктивного эффекта*.

Еще раз приведу в качестве примера превращение приятного острого уксуса, или уксусной кислоты (CH_3COOH) с pK = 4,75, в чрезвычайно едкую трихлоруксусную кислоту (CCl_3COOH) с pK меньше единицы.

Каждый атом хлора в молекуле трихлоруксусной кислоты более *электроотрицателен*, чем замещенный им атом водорода [485, Table 3.7]. Атом хлора с 17 положительно заряженными протонами в ядре сильнее притягивает отрицательно заряженные электроны, чем замещенный им атом водорода с его единственным протоном. Поэтому при замещении атомов водорода на хлор притяжение к ним электронов возрастает. Более того, эффект притяжения электронов в конце концов достигает по цепочке атомов отрицательно заряженного атома кислорода карбоксильной группы. При этом электронная плотность на этом атоме снижается, и связь с положительно заряженным атомом водорода, — протоном (H^+), — ослабевает. При замещении же всех трех атомов водорода на хлор образуется кислота с очень низким сродством к H^+. И слабая кислота в результате индуктивного эффекта становится очень сильной.

Как видно на рис. 45, замещение атома водорода уксусной (CH_3COOH) или n-пропионовой кислоты (CH_3CH_2COOH) атомом хло-

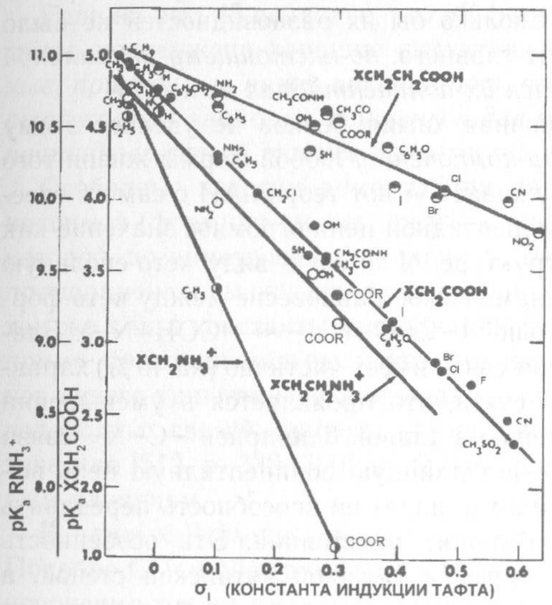


Рис. 45. Линейная связь между константами кислотной диссоциации (pK_a) двух модифицированных карбоновых кислот (уксусной и n-пропионовой), а также двух модифицированных аминов (метиламина и этиламина) (ось ординат), и константами индукции Тафта (σ_I) для соответствующего заместителя (обозначенного в структурной формуле кислот и аминов как X) (ось абсцисс). (По Лингу [453]).

ра или другими заместителями снижает или увеличивает pK (изображенный как pK_a) производных XCH_2COOH и XCH_2CH_2COOH, в зависимости от природы заместителя X. Направление этих изменений оказывается связанным с эмпирически найденными *константами индукции* соответствующих заместителей, а именно: с константами индукции Тафта [506; 338], константами Гаммета (σ) [338] и индуктивными индексами Чианг и Тая [507; 338; 15, pp. 185—188].

По данным, приведенным на рис. 45, видно, что константа индукции каждого конкретного заместителя остается величиной неизменной, несмотря на различия функциональных групп-мишеней, индуктивный эффект на которые мы исследуем (здесь, к примеру, карбоксильные и аминогруппы). Однако влияние заместителя на значение pK ослабевает пропорционально количеству атомов углерода, или метиленовых групп ($-CH_2-$), между местом замещения и конечной функциональной группой молекулы. Несложные вы-

числения с использованием данных рис. 45 позволяют определить *проницаемость* каждой метиленовой группы, которая оказывается необычайно высокой: 0,48 ± 0,14 на каждую группу [448, p. 100]. Таким образом, на протяжении *трех* последовательных метиленовых групп ($-CH_2CH_2CH_2-$) индуктивный эффект еще реализуется на 11% от максимума. Но существует гораздо более эффективная трасса для передачи возмущений, чем цепь насыщенных метиленовых групп, это — *цепь пептидных связей.*

Белки — основное вещество протоплазмы, и в природе их умеют создавать лишь живые клетки, включая и те, из которых состоят сами биохимики, научившиеся синтезировать белки искусственно. Уникальными соединениями их делает вовсе не разнообразие аминокислотных остатков. Сколько бы их разновидностей не было еще открыто, это не изменит главного: *по-настоящему уникальной структурой белков является их полипептидная цепь* [424].

На мой взгляд, традиционная химия белков не уделяет этому *уникальному структурному компоненту* любой формы жизни того внимания, которого он заслуживает. А вот теория АИ с самого своего основания придавала полипептидной цепи огромное значение как уникальной *резонансной* структуре. Я имею в виду кето-енольную таутомерию [485, p. 498]: динамическое равновесие между кето-формой пептидной связи и енольной ($-C{=}O-NH- \leftrightarrow -COH{=}N-$). Благодаря таутомерии пептидная связь имеет частично (на 40%) характер двойной (сопряжённой) связи, что проявляется в уменьшении её длины (1,32 Å), по сравнению с длиной одинарной −C−N− связи (1,47 Å). Эта «вибрация» делает длинную полипептидную цепь высокополяризуемой и тем самым придает ей способность передавать *индуктивный эффект* на большие расстояния. Эта особенность сближает цепь пептидных связей с Великой китайской стеной, а также с более непритязательной цепочкой из гвоздей, превращая пептидный остов белка в *главную информационную трассу* элементарной структуры жизни (рис. 44).

Как же далеко может передаваться локальный или, как я его называю, *прямой индуктивный эффект* по полипептидной цепи белка *in vitro*? Существует, по меньшей мере, четыре группы независимых экспериментальных данных, дающих ответ на этот вопрос (рис. 46). Взятые вместе, они показывают, что прямой индуктивный эффект может передаваться через три пептидные связи, и еще — через короткий участок насыщенной метиленовой цепи бокового радикала (подробности см. в работах [488, p. 98–106] и [107, p. 116–125], а также в пояснениях к рис. 46). Если вернуться к аналогии с Великой китайской стеной, то дистанцию, на которую распространяется индуктивное влияние, можно уподобить расстоянию между двумя ближайшими сторожевыми башнями.

Ввиду относительно быстрого ослабления индуктивного эффекта метиленовыми группами, — хотя приведенное значение проницаемости (0,48) демонстрирует неожиданно слабое затухание, — функциональные группы, расположенные на *коротких боковых радикалах,* в большей мере испытывают его влияние, чем более удаленные. В числе этих *проксимальных функциональных групп* находятся прежде всего пептидные связи полипептидного остова белка и уже хорошо знакомые нам β- и γ-карбоксильные группы. Кроме того, ближе других к остову белка расположены функциональные группы на коротких боковых цепях остатков серина, треонина, цистеина, тирозина, фенилаланина, гистидина и триптофана [107, p. 148]. Так как функциональная группа каждого из них отделена от полипептидного остова не более чем двумя метиленовыми группами, индуктивному эффекту не так сложно достичь их, что подтверждают данные рис. 45 и 46.

Если на рис. 45 показано, что pK (или величина *c*) карбоксильных групп подвержена влиянию индуктивного эффекта, то *другие данные, приводимые ниже, показывают, что сила водородных связей, выражаемая аналогом величины c для диполей, входящих в состав пептидных связей, также подвержена этому влиянию.*

Свободные энергии димеризации паразамещенных ацетилфеноноксимов (формулу см. на врезке к рис. 47), измеренные значения которой позаимствованы из данных Рейзера [510, p. 446], прямо пропорциональны константе индукции σ заместителей X (рис. 47), так же как и константы диссоциации карбоксильных и аминогрупп прямо пропорциональны константе индукции σ_I (рис. 45). В этом нет ничего удивительного, ведь димеризация включает образование водородных связей, природа которых по большей части электростатическая [512, p. 339–360], а, следовательно, подвержена индуктивным влияниям.

В данных Рейзера есть кое-что еще, заслуживающее внимания. Подобно CO- и NH-группам пептидной связи, в молекуле ацетилфеноноксима так же имеются расположенные по соседству атомы, способные образовывать водородные связи: донор электронов — атом азота (несущий свободную пару электронов) и OH-группа — их акцептор. Если бы обе группы были одинаково поляризуемы, то пара-замещение не влияло бы на свободную энергию димеризации: ведь тогда разнонаправленное, но равное влияние заместителей на атом азота и OH-группу компенсировали бы друг друга. Линейная зависимость свободной энергии димеризации от электронодонорной силы заместителя доказывает, что атом азота в этой молекуле более поляризуем, чем OH-группа. Именно электронная плотность на атоме азота (или аналог величины *c′*) сильнее изменяется при пара-замещениях, и именно от нее зависит сила водородных связей, удерживающих димер от распада. Таким образом, относительная поляризуемость атомов азота и кислорода определяется конкретными условиями. Так, из двух групп пептидной связи карбонильный кислород поляризуется в большей степени, чем NH-группа, о чем речь шла в разделе 14.1, п. 3.1.

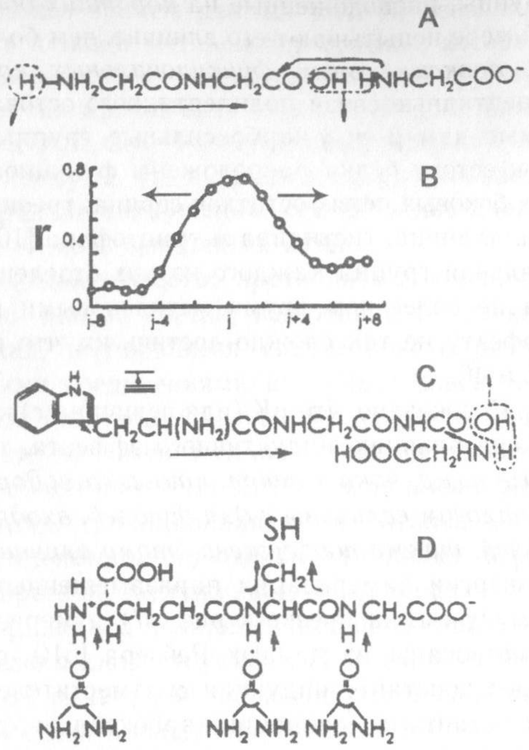


Рис. 46. Схематичное представление четырех групп экспериментальных данных, подтверждающих способность индуктивного эффекта распространяться по полипептидной цепи и по коротким участкам насыщенных углеводородных цепей боковых групп. A. Снижение сродства терминальной аминогруппы к H^+, проявляющееся снижением pK_a, под влиянием замещения отдаленной карбоксильной OH-группы на глицил, сильнее притягивающий электроны [98, p. 94]. B. Связь между коэффициентом корреляции, r (см. ниже), и положением аминокислотного остатка в первичной последовательности белка. Аминокислотный остаток, взятый при расчетах в качестве исходного, обозначен как «j». Последовательность соседних аминокислотных остатков в сторону C-конца белка обозначена как j+m, а в сторону N-конца — как j—m, где m — число от 0 до 8. Упомянутый коэффициент корреляции (r) характеризует связь между α-спиральным потенциалом 19-ти остатков α-аминокислот (см. [153] и табл. 4, столбец «Garnier et al.») и электронодонорной силой их боковых радикалов, выраженной через посредство констант диссоциации эквивалентных им α-карбоновых кислот (см. последний столбец табл. 4). Коэффициент корреляции для положения j вычислен по данным табл. 4 (см. столбец «Garnier et al.» и последний столбец). Остальные коэффициенты корреляций вычислены для случая, если бы карбоксильная группа занимала положение j±m, а боковые радикалы оставались в прежнем положении j. Наблюдаемое ослабление корреляционной связи означает ослабление влияния электронодонорной силы (индуктивного эффекта) бокового радикала в положении j на свойства соседних пептидных связей и соответствующих боковых радикалов по мере увеличения их удаленности от этого положения (подробности см. в разделе 14.1, п. 3 и в работе [150]). C. Тушение флюоресценции индольной группы остатка триптофана в синтетических полипептидах (триптофан—$(глицин)_n$) при замещении гидроксилов наиболее отдаленных карбоксильных групп глицильной группой, сильнее притягивающей электроны [107, p. 123—125]. D. Рост реакционной способности SH-группы глутатиона при его взаимодействии с мочевиной (подробности см. в работе [185]; обратите внимание на табл. II, в которой показано увеличение реакционной способности SH-групп глутатиона по мере увеличения количества связей с мочевиной).

Имеется обзор данных [488, p. 106—110], свидетельствующих об индуктивном влиянии на окислительно-восстановительный потенциал SH-групп остатков цистеина ближайших к нему пептидных групп при смене последними партнеров по образованию водородных связей. В 4-ом параграфе этого раздела будут приведены данные о том, что фенольные группы остатков тирозина, и индольные — остатков триптофана, также подвержены индуктивному эффекту.

В довершение рассматриваемого вопроса осталось показать, что если электронная плотность (величины c, c' и их аналоги) на атомах

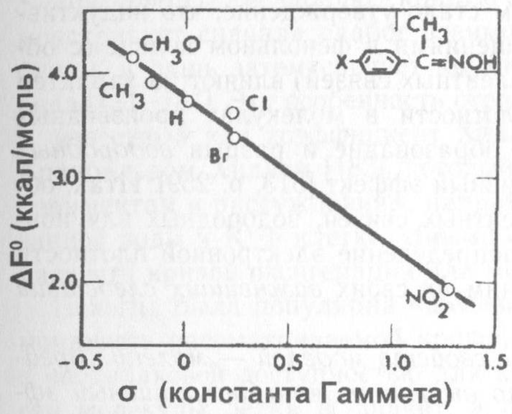


Рис. 47. Взаимосвязь между свободной энергией димеризации паразамещенных ацетилфеноноксимов и константами индукции Гаммета (σ) для заместителей X. Структурная формула производных ацетилфеноноксима приведена в верхнем правом углу рисунка, X — заместитель. Свободная энергия димеризации (ось ординат) указанных производных рассчитана на основе данных Рейзера [510] и допущения, что молекулы могут объединяться лишь в димеры. Тот факт, что такой мощный электронодонорный заместитель, как CH_3, существенно повышает свободную энергию димеризации (стимулирует ее), означает, что прочность водородных связей в димерах определяет, прежде всего, электронодонорная способность атома азота (электронная плотность на нем), а не электронакцепторная способность OH-группы. (По Лингу [453]).

кислорода и азота пептидной связи является *мишенью* индуктивного эффекта, то связывание карбоксильными группами белка ионов или десорбция ионов, а также образование и разрыв водородных связей в белке (и ряд других взаимодействий) тоже являются мощными *генераторами* индуктивных влияний.

Рассмотрим карбоксильную группу —COOH. Она диссоциирует на $-COO^-$ и H^+. Константа индукции Гаммета (σ) для *недиссоциированной* группы —COOH, находящейся в мета-положении некоторых производных фенола, составляет +0,355, а *диссоциированной* группы $-COO^-$ (в том же мета-положении) — лишь +0,104 [522] (этот пример аналогичен примеру с хлорпроизводными уксусной кислоты, к которому мы уже не раз обращались, только в этом случае роль атома хлора играет диссоциированная или недиссоциированная карбоксильная группа). Таким образом, индуктивный эффект, обусловленный замещением недиссоциированной группы —COOH на диссоциированную $-COO^-$, должен быть равным индуктивному эффекту замещения атома водорода в мета-положении ($\sigma = 0$) электроотрицательным заместителем с σ, равной $+0{,}355 - 0{,}104 = +0{,}251$. Выражение «замещение группы —COOH группой $-COO^-$» — лишь

иной способ выразить индуктивный эффект диссоциации протона от карбоксильной группы или связывания его с группой $-COO^-$. Например, превращение бензоат-аниона в бензойную кислоту обязательно сопровождается сдвигом электронов от остальной части молекулы к карбоксильной группе, так как присоединенный протон сильно притягивает электроны [522]. Выходит, индуктивный эффект, распространяющийся по молекуле, можно вызвать разрушением или образованием ионных, то есть вторичных, связей, а не только ковалентных (как в случае с уксусной и трихлоруксусной кислотами). Но это неудивительно, ведь ионная связь — связь электростатическая [511] и, следовательно, ее образование и разрыв должны сопровождаться индуктивными влияниями.

Уже достаточно тривиальным стало утверждение, что индуктивные эффекты, вызванные замещениями в фенольном кольце (с образованием или разрывом ковалентных связей) влияют на характер распределения электронной плотности в молекулах производных фенола. Буравой показал, что образование и разрыв *водородных связей* также вызывает индуктивный эффект [513, p. 259]. Итак, образование (или разрыв) ковалентных связей, водородных или ионных, способно вызывать перераспределение электронной плотности в молекулах, то есть имеет одним их своих *важнейших следствий* индуктивный эффект.

Таким образом, исследование свойств моделей — молекул органических веществ — позволило выяснить, что индуктивный эффект может запускаться образованием не только ковалентных связей, но и, что для нас особенно важно, новых ионных связей (например, ионов K^+ или Na^+ с β- и γ-карбоксильными группами) и новых водородных связей (например, между иминогруппами и карбонильными группами полипептидного остова или между этими группами и водой). Этот индуктивный эффект распространяет свое влияние в пределах трех пептидных связей и через короткие углеродные цепочки боковых групп, изменяя величину с находящихся в этой зоне β- и γ-карбоксильных групп, а также аналог величины с групп пептидной связи (это — как минимум). Эта передача посредством ближнего взаимодействия напоминает передачу сообщения между соседними сторожевыми башнями Великой китайской стены. Передача на дальние расстояния является результатом многократного повторения ближних взаимодействий.

2. *Кооперативное взаимодействие — основа быстрых согласованных переходов между различными стабильными состояниями*

Говоря выше (в разделе 14.3, п. 1) о системе *белки—ионы—вода—кардинальные адсорбаты,* я использовал слова «кооперативный» и «кооперативность» в том значении, в котором они применяются в *статистической механике* [178]. В контексте этого раздела физики *кооперативность* означает наличие сильного *взаимодействия* — как положительного, так и отрицательного — между *соседними* элементами системы. Начну с конкретного примера — дыхательного белка гемоглобина, составляющего не менее 97% всех белков эритроцитов человека [74, p. 120, 140].

Как уже давно известно, процесс ассоциации кислорода с гемоглобином (оксигенация) обладает рядом особенностей. Он не подчиняется правилу, гласящему, что в неоднородной системе с различными видами центров связывания первыми с лигандом связываются центры с наивысшей аффинностью (сродством), а последними — с минимальным сродством. В случае с гемоглобином все выглядит наоборот. Если мы построим график зависимости связывания кислорода с гемоглобином от его парциального давления, то получим *S-образную (сигмовидную)* кривую (врезка на рис. 55), которая демонстрирует сначала слабое взаимодействие кислорода с гемоглобином, и лишь затем следует крутой рост захвата молекул кислорода [181–184]. Эту особенность отражает эмпирический показатель *n,* известный как коэффициент Хилла. Он был введен тем самым Арчибальдом Хиллом [183], который уже знаком читателю по экспериментам и рассуждениям, направленным против концепции связанной воды и K^+ в клетке. Иными словами, *n* — это степень S-образности кривой оксигенации или мера кооперативности процесса.

Некогда была популярна «щелевая гипотеза», объяснявшая сигмоидность рассматриваемой кривой наличием центров связывания с неодинаковой доступностью для кислорода: центры на поверхности молекулы белка и, значит, в первую очередь доступные для кислорода, но с низким сродством к кислороду, и центры с сильным сродством, но локализованные в менее доступных участках молекулы гемоглобина. Эти последние становятся доступными для кислорода лишь после того, как кислород свяжется с центрами со слабым сродством к нему. Однако Перутц с сотрудниками, установивший строение гемоглобина, показал, что все четыре гемовых центра находятся на поверхности молекулы и равно доступны для кислорода [329].

Хотя S-образность кривой оксигенации время от времени уже пытались на качественном уровне объяснить с точки зрения *кооперативности*, впервые, насколько мне известно, лишь в 1964 году физик-теоретик, лауреат Нобелевской премии Янг и я показали, что коэффициент Хилла (n) равен $\exp(-\gamma/2RT)$, где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, а $-\gamma/2$ — *энергия взаимодействия соседних* кислородсвязывающих центров гема [185; 244; 295, p. 39; 313; 107, p. 136–140]. Изотерма кооперативной адсорбции Янга—Линга, предложенная в 1964 году, приведена в приложении (уравнение А4).

Если *n* равен единице, то величина $-\gamma/2$ равна нулю. В таком случае, например, при связывании кислорода с миоглобином (левая кривая на врезке на рис. 55), адсорбция каждой частицы происходит независимо, то есть без взаимных влияний центров связывания, а кривая поглощения кислорода принимает форму, знакомую по

изотерме адсорбции Ленгмюра. С ростом n кривая постепенно превращается в S-образную.

При увеличении n до 3,0 $-\gamma/2$ становится равной +0,649 ккал/моль. Положительное значение величины $-\gamma/2$ означает, что при каждом связывании молекулы кислорода одним из центров сродство двух соседних центров к кислороду возрастает на указанную величину. Если же с кислородом связываются сразу два центра, то энергия связывания центра, расположенного между ними, возрастает вдвойне, то есть указанное значение $-\gamma/2$ удваивается. Такое ступенчатое повышение сродства к кислороду является примером *ферромагнитного* кооперативного перехода, но я предложил более подходящее название — *автокооперативный* переход (см. раздел 4 приложения).

Установление кристаллической структуры гемоглобина и автокооперативности его молекулы поставило перед нами еще один фундаментальный вопрос. Оказалось, что все четыре центра гема в молекуле гемоглобина расположены *далеко друг от друга.* Каким же образом связывание кислорода одним из них может повлиять на сродство к кислороду других центров? В ответе именно на этот важный вопрос начинает работать молекулярный механизм передачи информации и энергии, предлагаемый теорией АИ [107, p. 145–149]. Подробности этого механизма будут изложены чуть ниже, в разделах 5 и 6. Чтобы облегчить понимание, к Великой китайской стене и гвоздям с опилками и магнитом я добавлю еще две несложные модели, с целью избежать ложного представления, будто по макромолекулам течет ток, как по электрическим проводам.

Третья модель дистанционной передачи информации и энергии — цепочка из домино. Падение одной костяшки неизбежно влечет за собой падение следующей, и так может продолжаться до бесконечности. Но костяшки падают лишь в одном направлении, так что данная модель не совсем корректна, хотя и удобна. Наилучшая модель — четвертая: ряд идеально сбалансированных, свободных от трения качелей (в виде доски с опорой посередине), концы которых соединены абсолютно гибкими нерастяжимыми тросами [107, Fig. 7.7, p. 146]. Опускание конца одной из досок тянет за собой конец соседней доски и т. д. Эта модель работает в обоих направлениях.

Во всех четырех моделях изменения, возникшие в одном месте, распространяются на всю систему, будь то цепочка из стальных гвоздей, костяшек домино, привязанных друг к другу качелей или бдительных часовых на сторожевых башнях. Точно так же автокооперативное взаимодействие при связывании кислорода гемоглобином затрагивает не только четыре кислородсвязывающих центра, но и *весь* ансамбль белок–ионы–вода [107, p. 149–155].

Толчком к *автокооперативному переходу* всей молекулы гемоглобина из «расслабленного», оксигенированного *R-состояния,* в «напряженное» деоксигенированное *T-состояние* (R–T-переход) может быть *небольшое* изменение парциального давления кислорода в среде. Это схематически показано на рис. 48A. Аналогичный переход может происходить и при неизменном давлении кислорода, если молекула гемоглобина взаимодействует с *кардинальным адсорбатом* — к примеру, с 2,3-дифосфоглицератом (2,3-ДФГ) [189]. Этот так называемый «контролируемый» вид автокооперативного перехода показан на рисунке 48B, где кардинальный адсорбат обозначен как W. Экспериментальные данные, полученные для обоих видов кооперативного перехода, строго подчиняются изотерме кооператив-

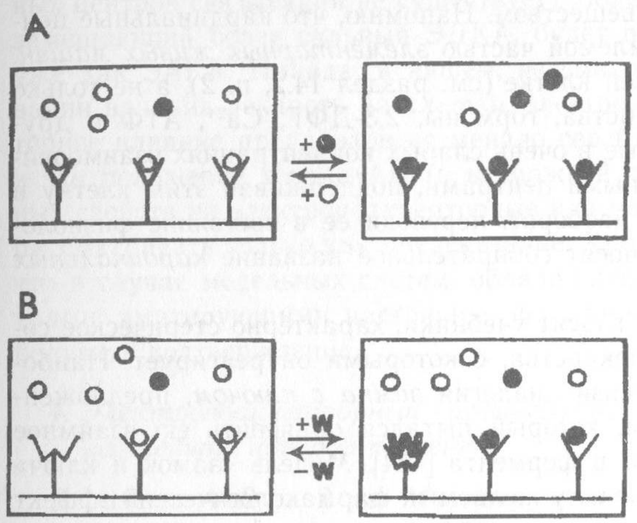


Рис. 48. Два типа *кооперативных* переходов между состоянием i, в котором центры связывания заняты веществом i (светлые кружки), и состоянием j, в котором они заняты веществом j (темные кружки). A. «Спонтанный» тип перехода, который происходит в результате изменения соотношения между концентрациями веществ i и j в окружающей среде. B. «Управляемый» тип перехода, когда смена состояния i на j происходит при неизменных концентрациях веществ i и j в результате взаимодействия кардинального центра с кардинальным адсорбатом (W). Рисунок является переработанной версией оригинала, впервые опубликованного в работе [313, Fig. 2].

ной адсорбции Янга—Линга (см. уравнение A4 в приложении) [186; 107, Fig. 7.3, Fig. 7.11].

Оксигенация-деоксигенация и структурная R–T-трансформация сопровождаются еще двумя глобальными изменениями свойств гемоглобина: изменением pK анионных групп (эффект Бора) [187] и существенным изменением энтропии [188]. С точки зрения теории АИ, изменение pK указывает на изменение *величины c* соответствующих анионных групп, а резкие изменения энтропии — на изменение *аналога величины c* карбонильных групп полипептидного остова, приводящее к адсорбции или десорбции воды, так как лишь молекулы воды достаточно многочисленны, чтобы вызвать заметное изменение энтропии. Изменение электронной плотности на указанных функциональных группах играет важнейшую роль во многих физиологических явлениях, что станет более очевидным по мере продолжения нашего анализа.

Кооперативные изменения, охватывающие всю молекулу гемоглобина, могут быть вызваны и АТФ [189], но, поскольку этот белок не является АТФазой, данные *изменения возникают в результате*

простой адсорбции АТФ. Этим АТФ (и 2,3-ДФГ) напоминает лекарства, способные в ничтожных концентрациях вызывать масштабный ответ.

3. Классификация лекарственных средств и других кардинальных адсорбатов на ЭАКА, ЭДКА и ЭИКА

Специализированные клеточные структуры, связывающие молекулы лекарственных препаратов, известны как *рецепторные центры*. Концепция *кардинальных центров*, включающих и центры рецепции, была введена в теорию АИ позже [98, p. 110; 15, p. 219; 107, p. 32], однако их функции шире, чем рецепторов, которые обычно находятся на поверхности клетки и *связываются* с введенным извне лекарственным веществом. Напомню, что кардинальные центры являются неотъемлемой частью *элементарных живых машин*, распределенных по всей клетке (см. раздел 14.2, п. 2), а не только по поверхности. Лекарства, гормоны, 2,3-ДФГ, Ca^{2+}, АТФ и другие вещества, способные в очень слабых концентрациях взаимодействовать с кардинальными центрами, поддерживая этим клетку в состоянии покоя или, наоборот, переводя ее в состояние физиологической активности, носят собирательное название *кардинальных адсорбатов*.

Для рецептора, как гласят учебники, характерно стерическое соответствие молекуле лекарства, с которыми он реагирует. Наиболее известна в этой связи аналогия *замка с ключом*, предложенная Эмилем Фишером, который пытался объяснить ею взаимное соответствие субстрата и фермента [444]. Модель «замок и ключ» позволяет объяснить, почему желаемый фармакологический эффект можно получить лишь с помощью лекарств, подходящих рецептору по своей структуре. Несмотря на широкое признание этой модели, кое-чего в ней все-таки не хватает.

Наш повседневный опыт подсказывает, что одного соответствия ключа замку недостаточно, чтобы открыть дверь. Ключ должен *совершить* определенное действие. Обычный ключ совершает механическое действие — поворот. Однако в традиционной физиологии или фармакологии не описан процесс, аналогичный этому «повороту». Именно это упущение могло послужить причиной недовольства профессора Альфреда Бюргера фармацевтической химией, слова которого процитированы во введении.

В противоположность такому положению вещей, *теория ассоциации-индукции с самого начала предложила «поворот ключа» — электронную поляризацию или индукцию.*

Если углубиться в детали, то можно сказать, что кардинальный адсорбат работает, взаимодействуя *электронно* с кардинальным центром. В результате на кардинальный центр может быть оказано, например, электронодонорное действие. Такой кардинальный адсорбат называется ЭДКА (*электронодонорный кардинальный адсорбат*). Однако эффект может заключаться и в оттягивании электронов от кардинального центра, такой кардинальный адсорбат называется ЭАКА (*электроноакцепторный кардинальный адсорбат*). Есть и третий, редкий тип кардинальных адсорбатов, которые просто занимают кардинальный центр. Их называют ЭИКА (*электроноиндифферентный кардинальный адсорбат*) [107, p. 144–145].

Определившись с понятиями ЭДКА, ЭАКА и ЭИКА, сделаю несколько оговорок. Каждое лекарство (или другое биологически активное соединение) является ЭДКА или ЭАКА лишь по отношению к тому конкретному типу кардинального центра, с которым оно взаимодействует. Связываясь с одним кардинальным центром, оно действует как ЭДКА, с другим — как ЭАКА (абсолютно специфичных центров связывания не существует). Более того, слабый ЭДКА, замещающий более сильный ЭДКА, будет выглядеть на его фоне уже как ЭАКА. Правда, в нашем, весьма ограниченном исследовании влияния лекарств на *клетки*, электронодонорное или акцепторное влияние препаратов не меняло своей направленности [398], и это положение теории АИ (о возможной смене электронодонорных свойств на электроноакцепторные или наоборот) можно сейчас рассматривать только как предсказание. Кроме того, есть надежда, что в случае модельных систем, обладающих кардинальными центрами, имитирующими настоящие, указанное предсказание может получить подтверждение.

4. Электроноакцепторный кардинальный адсорбат АТФ — важнейший адсорбат клетки

В разделе 14.2, п. 2 мы обсудили, каким образом царица всех кардинальных адсорбатов — АТФ — поддерживает в клетке состояние покоя, связываясь с особыми кардинальными центрами. Вопрос о том, как ей это удается, — один из главных вопросов физиологии клетки. Он приобрел ключевое значение в контексте последних попыток ученых обнаружить истинный источник энергии для биологической работы. Усилия по решению этой проблемы до появления теории АИ представляли собой длинную череду ошибок и заблуждений (см. раздел 16.1) [68, p. 144–148]. Ставит ли теория АИ точку в этой истории? Думаю, что, да, и постараюсь убедить вас в этом.

Сопоставим некоторые цифры. Раньше полагали (а многие и сейчас убеждены в этом), что основным источником энергии в клетке является АТФ с ее макроэргической связью. Некорректно проведенные эксперименты указывали на то, что в каждой такой связи запасено —12 ккал/моль энергии, которая якобы используется клеткой для выполнения биологической работы. С другой стороны, установлено, что *свободная энергия адсорбции* АТФ миозином составляет —14,3 ккал/моль [287]. Это означает, что практически вся АТФ в мышечных волокнах адсорбирована миозином. Напомню, что миозин является не только основным белком мышечных волокон, но и несет от 67 до 80% (что более вероятно) всех β- и γ-карбок-

сильных групп, адсорбирующих ионы калия [122]. С позиций теории АИ, именно прочное связывание АТФ миозином и прочими белками клетки позволяет АТФ выполнять свою жизненно важную роль — *главного кардинального адсорбата.*

Между тем, свободная энергия адсорбции миозином АДФ (продукта гидролиза АТФ) вдвое ниже, чем у АТФ (—6,82 ккал/моль) [288], что объясняет, почему роль АДФ в клетке так не похожа на роль АТФ. В ряде случаев, правда, слабое сходство имеет место, но отмечены также и противоположные эффекты этих соединений [289, p. 87]. О различиях в свойствах этих веществ говорит и такое сопоставление: *константа связывания* миозином АТФ равна 10^{10}–10^{11}, а АДФ — только 10^5, что, как нетрудно видеть, на 5–6 порядков величины меньше, чем у АТФ. Такое расхождение свойств АТФ и продукта ее гидролиза позволяет ей выполнять функцию *переключателя* клеток между состоянием покоя и активным состоянием (см., например, раздел 14.2, п. 2).

Выяснив, что АТФ прочно связывается со своим кардинальным центром, мы должны ответить теперь на следующий вопрос: АТФ — это ЭДКА или ЭАКА? Приведу пример, который не только явится ответом на этот важнейший вопрос, но и послужит серьезным основанием для следующих утверждений: 1) индуктивный эффект может передаваться *через* ионные и водородные связи, участвующие в акте адсорбции; 2) свойства молекулы, адсорбированной белком, могут быть индуктивно изменены другой молекулой, связавшейся с этим же белком, но в другом месте. Чтобы придти к таким выводам, начнем с флуоресценции.

Фенольная группа остатка тирозина и индольная группа остатка триптофана способны поглощать свет ближней ультрафиолетовой области спектра, испуская при этом видимый свет с большей длиной волны. Это явление известно как *флуоресценция.* Соотношение между поглощенной и испускаемой энергией называется *энергетическим выходом флуоресценции.* При встраивании тирозина или триптофана в полипептид выход флуоресценции резко падает. Он еще больше снижается при протонировании ионизированных α-аминогрупп образовавшегося пептида. Так как и *пептидная связь* [107, p. 116–121], и протон (H^+) известны как акцепторы электронов (электроноакцепторные свойства пептидной связи видны при замене боковых групп на группы с большей электронодонорной способностью), то этот и многие другие примеры позволили установить, что *оттягивание электронов от хромофорных групп снижает энергетический выход флуоресценции (вызывает тушение)* и, наоборот, *электронодонорное влияние на них повышает его* [107, p. 123–125]. Вооружившись этими фактами, давайте теперь выясним, чем является АТФ: ЭАКА или ЭДКА?

Антибиотик *ауровертин* обладает слабой флуоресценцией в водном растворе, но если добавить его к раствору фермента F_1 (*растворимая митохондриальная АТФаза*), с которым антибиотик связывается стехиометрически, то его флуоресценция возрастает в 100 раз. Однако рис. 49, взятый из работы [509], показывает, что добавление АТФ или ионов Mg^{2+} сопровождается существенным снижением выхода флуоресценции этого антибиотика.

Эффект так называемого тушения флуоресценции означает, что и Mg^{2+}, и АТФ выступают в качестве *электроноакцепторных кардинальных адсорбатов* (ЭАКА). Добавление же АДФ, напротив, повышает выход флуоресценции, указывая, что АДФ действует как *электронодонорный кардинальный адсорбат* (ЭДКА).

Поскольку ни ауровертин, ни АТФ не образуют с F_1 ковалентных связей, то тушение флуоресценции под действием АТФ говорит о

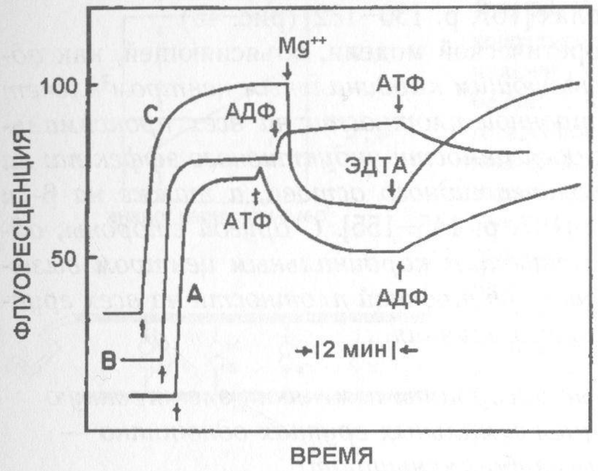


Рис. 49. Влияние АТФ, АДФ, Mg^{2+} и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, хелатор двухвалентных катионов) на интенсивность флуоресценции комплекса ауровертин–F_1. Реакционная смесь содержала либо 1,15 мкМ (А, В), либо 1,50 мкМ (С) F_1 (в 3-х мл буферного раствора). Первый вертикальный ряд стрелок означает добавление 3,3 (А, В) или 2,2 (С) нмолей ауровертина. Второй ряд — добавление 4,8 мкмолей АТФ (А) и 2,7 мкмолей АДФ (В) и 9 мкмолей $MgSO_4$ (С). Третий ряд — 2,7 мкмоля АДФ (А), 10 мкмолей ЭДТА (В), 4,8 мкмолей АТФ (С). Во всех случаях конечная концентрация АТФ составила 1,6 мМ, АДФ — 0,9 мМ, и Mg^{2+} — 3 мМ. Тушение флуоресценции при добавлении АТФ означает, что АТФ действует как электроноакцепторный кардинальный адсорбат — ЭАКА (мое прим. — ГЛ). (По Чангу и Пенефскому [509]).

передаче индуктивного эффекта от АТФ на хромофор через ионные, водородные или другие *вторичные* связи, образующиеся при адсорбции АТФ на ферменте. Причем можно говорить о двух ключевых сайтах в цепочке, передающей индуктивный эффект: один — в центре связывания АТФ с ферментом, второй — в центре связывания ауровертина с этим же белком.

Установив тот важный факт, что АТФ является ЭАКА (как в этом, так и во всех остальных исследованных на сегодня взаимодействиях), я выскажусь сначала на тему о том, как вообще лекарства и прочие кардинальные адсорбаты управляют функциями клеток, а затем мы углубимся в механизм использования клеткой этого, по-видимому, ключевого свойства АТФ в своей жизнедеятельности.

5. Как действуют лекарства и другие кардинальные адсорбаты?

Чтобы иметь возможность управлять физиологическими функциями, ЭДКА и ЭАКА должны действовать *дистанционно* и *каскадно.*

Мишенями для ЭДКА и ЭАКА являются по большей части функциональные группы белков, расположенные на некотором расстоянии от источника индуктивного возмущения. Как уже говорилось в разделе 14.3, п. 1, эти мишени, как правило, расположены вблизи (проксимально) от главной «трассы» передачи информации и энергии по белку — его полипептидного остова, являющегося резонансной структурой (кето-енольная таутомерия). В число этих «проксимальных центров» входят NH- и CO-группы пептидных связей (соседние по отношению к возмущенным), а также β- и γ-карбоксильные группы, расположенные на коротких боковых цепях. Как было показано раньше, индуктивный эффект может передаваться через три последовательные пептидные связи и, кроме того, через короткие цепочки атомов в боковых радикалах [107, p. 130–132] (рис. 45).

Теперь перейдем к теоретической модели, объясняющей, как *адсорбция ЭАКА соответствующим кардинальным центром влечет за собой снижение электронной плотности на всех проксимальных центрах в пределах досягаемости индуктивного эффекта: на карбонильных группах полипептидного остова, а также на* β- *и* γ-*карбоксильных группах* [107, p. 145–155]. *С другой стороны, адсорбция ЭДКА соответствующим кардинальным центром вызывает, наоборот, увеличение электронной плотности на всех группах — мишенях индуктивного влияния.*

6. Почему кардинальные адсорбаты изменяют электронную плотность на всех проксимальных группах однотипно — либо увеличивают ее, либо уменьшают?

Напомню, что величина *c* является количественной мерой электронной плотности на анионных β- или γ-карбоксильных группах (единичные заряды), а параметр, называемый *аналогом величины c,* характеризует электронную плотность на отрицательном полюсе диполя, такого как карбонильная группа CO полипептидного остова (см. раздел 14.1, п. 2 и 3). Соответственно, параметр *c′* — мера электронной плотности на катионных группах (единичные заряды), а параметр *аналог величины* c′ — мера электронной плотности на положительном полюсе дипольной иминогруппы NH полипептидного остова [173, p. 42–43].

Читателю уже в целом известно, как изменение величины *c* β- и γ-карбоксильных групп влияет на их относительное сродство к K^+ и Na^+ (рис. 42). Так, при низком значении *c* ионы K^+ адсорбируются предпочтительнее Na^+. При высоком — Na^+ адсорбируется предпочтительнее K^+. Аналогичные изменения избирательности наблюдаются и в случае дипольных групп полипептидного остова [173, p. 42–43], см. раздел 14.1, п. 3. Только на этот раз высокие значения аналога величины *c* благоприятствуют образованию водородных связей внутри молекулы белка (α-спирали и подобные структуры), а низкие — водородных связей с водой, с ее последующей адсорбцией полипептидным остовом с образованием множественных слоев, в которых молекулы воды ориентируются в пространстве и приобретают дополнительный дипольный момент (поляризуются).

Сказанное иллюстрирует верхняя часть рис. 50, где на оси абсцисс условно отложена электронная плотность на отрицательных (аналог величины *c*) и положительных (аналог величины *c′*) полюсах диполей, а на оси ординат — изменение свободной энергии при адсорбции. Видно, что от электронной плотности зависит степень избирательности к адсорбатам-конкурентам — a^+ и b^+, либо к a^- и b^-. Рост аналога величины *c* карбонильных групп полипептидного остова с 1 до 2 инвертирует избирательность связывающего центра с b^+

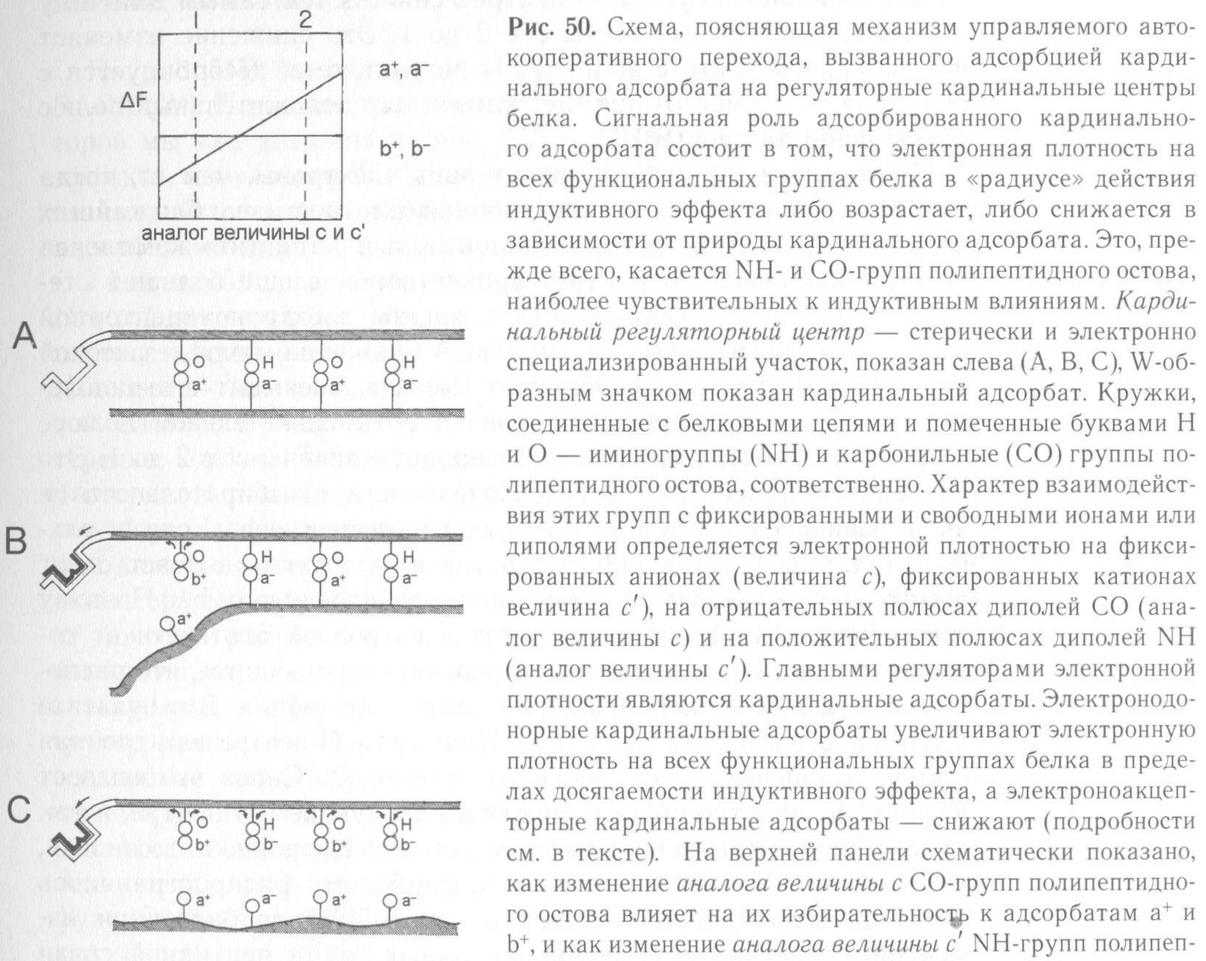


Рис. 50. Схема, поясняющая механизм управляемого автокооперативного перехода, вызванного адсорбцией кардинального адсорбата на регуляторные кардинальные центры белка. Сигнальная роль адсорбированного кардинального адсорбата состоит в том, что электронная плотность на всех функциональных группах белка в «радиусе» действия индуктивного эффекта либо возрастает, либо снижается в зависимости от природы кардинального адсорбата. Это, прежде всего, касается NH- и CO-групп полипептидного остова, наиболее чувствительных к индуктивным влияниям. *Кардинальный регуляторный центр* — стерически и электронно специализированный участок, показан слева (A, B, C), W-образным значком показан кардинальный адсорбат. Кружки, соединенные с белковыми цепями и помеченные буквами H и O — иминогруппы (NH) и карбонильные (CO) группы полипептидного остова, соответственно. Характер взаимодействия этих групп с фиксированными и свободными ионами или диполями определяется электронной плотностью на фиксированных анионах (величина *c*), фиксированных катионах величина *c′*), на отрицательных полюсах диполей CO (аналог величины *c*) и на положительных полюсах диполей NH (аналог величины *c′*). Главными регуляторами электронной плотности являются кардинальные адсорбаты. Электронодонорные кардинальные адсорбаты увеличивают электронную плотность на всех функциональных группах белка в пределах досягаемости индуктивного эффекта, а электроноакцепторные кардинальные адсорбаты — снижают (подробности см. в тексте). На верхней панели схематически показано, как изменение *аналога величины c* CO-групп полипептидного остова влияет на их избирательность к адсорбатам a^+ и b^+, и как изменение *аналога величины c′* NH-групп полипептидного остова влияет на их избирательность к адсорбатам a^- и b^- (подробности см. в тексте). (По Лингу [173] с более поздними модификациями).

на a^+. Уменьшение же аналога величины *c* дает обратный эффект. Точно так же при увеличении аналога величины *c′* NH-групп полипептидного остова с 1 до 2 они начинают лучше связывать a^-, а не ион или диполь b^-, но если величину параметра снова уменьшить, то система вернется в прежнее состояние. Теперь, вооруженные та-

ким пониманием, отчасти уже подтвержденным экспериментально, отчасти — нет, мы можем приступить к исследованию панелей A, B и C на рис. 50.

Для начала, предположим, что на рис. 50A все CO-группы (обозначенные буквой «O») и NH-группы (обозначенные буквой «H») полипептидного остова обладают аналогом величины *c* или аналогом величины *c′* соответственно, равным 2. Пусть теперь электроноакцепторный кардинальный адсорбат (ЭАКА) W свяжется с кардинальным центром белка (рис. 50B). Индуктивный эффект, возникший в результате этого связывания, приведет к снижению электронной плотности на ближайшем атоме кислорода карбонильной группы (O-центре), снижая тем самым величину параметра аналог величины *c* с 2 до 1. Это снижение изменяет его избирательность с a^+ на b^+. В результате a^+ десорбируется с O-центра, и его место занимает катион или положительный полюс какого-либо диполя (b^+).

Примем, что b^+ слабее притягивает электроны, чем a^+, тогда при замещении a^+ на b^+ электронная плотность на ближайших атомах возрастет и электроноакцепторный «аппетит» комплекса W-кардинальный центр будет удовлетворен в еще большей степени, что будет выглядеть, как усиление электроноакцепторной функции W после присоединения b^+. А движение «волны» высокой плотности в сторону ближайшего H-сайта уменьшит его дипольный момент, плотность электронов на его положительном полюсе возрастет, снижая тем самым его аналог величины *c′* с 2 до 1. Это приведёт к изменению его избирательности с избирательности к a^- на избирательность к b^-, и a^- будет замещен на b^-. Если b^- слабее отдает электроны, чем a^-, то такое замещение вызовет сдвиг электронной плотности в сторону адсорбированного b^-. Поэтому замещение a^- на b^- вызывает отток электронной плотности от соседних атомов молекулы белка, в первую очередь от тех, что расположены дальше от кардинального центра адсорбции. В результате этого процесса на следующем за H-центром O-центре электронная плотность снизится и он свяжет b^+ вместо a^+. Снова это вызовет увеличение электронной плотности на следующем H-центре, и так далее. Если первоначальное изменение электронной плотности, индуцированное кардинальным адсорбатом, распространялось лишь на ограниченное расстояние (рис. 50B), то благодаря изменению селективности функциональных групп пептидной связи и их взаимодействию с другими адсорбатами, первоначальный толчок распространяется по всей молекуле белка. В результате мы получаем то, что показано на рис. 50C — исходный белковый комплекс (рис. 50A) полностью распался.

На рис. 50, правда, не изображены боковые радикалы, но теперь мы можем заняться и ими.

На рис. 50 мы рассматривали адсорбцию O- и H-центрами полипептидной цепи по отдельности. Теперь пойдем дальше. На рис. 51

CO- и NH-группы, входящие в состав пептидной связи и принадлежащие одному аминокислотному остатку, показаны прямоугольниками со стрелками внутри. На панели A рис. 51 мы видим участок белка перед его связыванием с электроноакцепторным кардинальным адсорбатом (ЭАКА) — W. Буква «a» означает, что рассматриваемые группы пептидных связей взаимодействуют с адсорбатами вида a^+ и a^-; буква «b» (на панели B) означает взаимодействие с адсорбатами вида b^+ и b^-. Электроноакцепторная природа катионного адсорбата (a^+) обозначена в прямоугольниках стрелками вниз, а электронодонорная природа анионного адсорбата (a^-) — стрелками вверх; сила их электроноакцепторного или электронодонорного влияния на, соответственно, O- и H-центры показана длиной стрелок.

На рис. 51B мы видим тот же участок белка после связывания ЭАКА (W). При этом происходит последовательность событий, с которой мы уже знакомы по рис. 50A–C. В результате индуктивного эффекта, вызванного W, ближайшие к W O- и H-центры перестают взаимодействовать с адсорбатами вида a^+ и a^- и связываются с адсорбатами вида b^+ и b^-. Так как O-центр карбонильной группы CO пептидной связи более поляризуем, чем H-центр иминогруппы NH той же связи (см. раздел 14.1, п. 3), на O-центре электронная плотность снижается (под влиянием b^+, длинная стрелка), а на H-центре — несколько возрастает (перераспределение электронной плотности в случае с H-центрами выражено слабее, поэтому стрелка короче). Такое перераспределение электронной плотности повторяется в каждой пептидной группе. При таком неравном перераспределении электронной плотности группа атомов CO и NH при каждом аминокислотном остатке обретает в целом электроноакцепторные свойства и оттягивает на себя электронную плотность от боковых радикалов, показанных различными геометрическими фигурами (стрелка под каждой фигурой — направление смещения электронной плотности). Это изменяет свойства функциональных групп, расположенных на этих радикалах. Таким образом, присоединение кардинального адсорбата, изменение адсорбционных свойств полипептидного остова белка привело к появлению электроноакцепторных свойств у группировок атомов, входящих в состав пептидных связей. Это приводит к изменению свойств многих других функциональных групп белковой молекулы, расположенных в боковых цепях.

Важными функциональными группами боковых радикалов являются β- и γ-карбоксильные группы. Снижение электронной плотности на кислороде карбоксильных групп означает усиление их кислотности (величина *c* уменьшается, то есть, напомню, отрицательные значения параметра возрастают по абсолютной величине). В результате может измениться селективность этих групп к катионам: катион A^+ замещается на B^+. В свою очередь, связывание B^+ вызовет перераспределение электронной плотности в ближайшем

окружении и может облегчить замещение **a** на **b** на соседних группах пептидных связей (рис. 51). Множество событий такого рода могут, в свою очередь, повлиять и на взаимодействие белка с кардинальным адсорбатом. Кардинальный адсорбат, группы пептидных связей, функциональные группы боковых радикалов, конкурирующие за связывание адсорбаты ($\mathbf{a}/A^+$ против $\mathbf{b}/B^+$), представляют собой элементы автокооперативного ансамбля, действующие по отношению друг к другу либо синергично, либо антагонистично (этот ансамбль показан на рис. 48B, а математически охарактеризован уравнением A4 приложения).

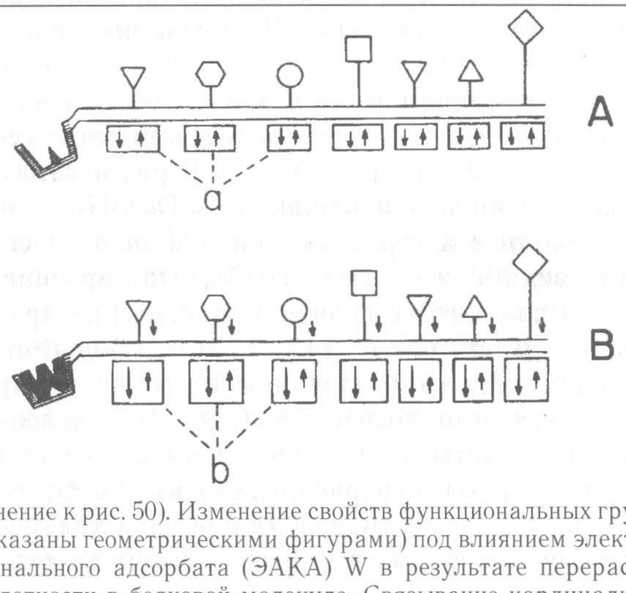


Рис. 51 (дополнение к рис. 50). Изменение свойств функциональных групп боковых радикалов (показаны геометрическими фигурами) под влиянием электроноакцепторного кардинального адсорбата (ЭАКА) W в результате перераспределения электронной плотности в белковой молекуле. Связывание кардинального адсорбата белком приводит сначала к изменениям в непосредственной близости от центра связывания W, а затем эти изменения распространяются на всю молекулу белка (см. рис. 50). Начало процессу распространения кладут изменения сорбционных свойств белка: взаимодействие с адсорбатами вида a (a^+ и a^-, панель A) заменяется связыванием адсорбатов вида b (b^+ и b^-, панель B). Согласно нашей модели, первостепенное значение имеет взаимодействие адсорбатов с группами пептидной связи: с отрицательно заряженным полюсом диполя CO и с положительно заряженным полюсом диполя NH. Изменение сорбционных свойств приводит к перераспределению электронной плотности на функциональных группах пептидной связи (группы CO и NH, принадлежащие данному аминокислотному остатку, показаны прямоугольниками со стрелками). Замещение более слабого электроноакцепторного адсорбата **a** (электроноакцепторные свойства a или b рассматриваются как *сумма электронодонорных или электроноакцепторных свойств* адсорбатов a^+—a^- или b^+—b^-, соответственно) на более сильный электроноакцепторный адсорбат **b** приводит к оттягиванию электронной плотности от групп пептидной связи, принадлежащих данному аминокислотному остатку (электроноакцепторный эффект показан стрелками вниз, электронодонорный — стрелками вверх; длиной стрелки обозначена степень изменений). В итоге, адсорбция W приводит к увеличению электроноакцепторной силы пептидной группировки всех остатков аминокислот в белке и, соответственно, к оттоку электронной плотности от всех боковых радикалов (показано стрелкой вниз), что, в конечном счете, вызывает изменение свойств функциональных групп этих радикалов. Развитие темы см. в тексте. (По Лингу; новая авторская версия рисунка, опубликованного в 1992 г. [107]).

При взаимодействии белка с электроноакцепторным кардинальным адсорбатом (W) на всех его функциональных группах (или большинстве), прежде всего на CO-группах полипептидного остова и на β- и γ-карбоксильных группах боковых цепей, происходит *снижение* электронной плотности. Их селективность изменяется и они связываются с другими адсорбатами. Если же W — электронодонорный кардинальный адсорбат (ЭДКА), то электронная плотность на функциональных группах белка меняется в противоположную сторону — она *возрастает* по всей длине макромолекулы. При этом во всех центрах происходит обратная замена партнеров по адсорбции. Принимая во внимание эту согласованность, мы можем сказать, что две *«команды» функциональных групп боковых цепей (прежде всего β- и γ-карбоксильные группы) и карбонильных групп полипептидной цепи, действуя раздельно или вместе, ведут себя как один связывающий центр* [98, p. 97; 15, p. 214; 107, p. 144].

Это и есть то, что я здесь называю *дистанционным каскадным влиянием кардинального адсорбата.*

Физиологическое значение снижений или повышений электронной плотности в масштабе всей белковой молекулы, возникающих под влиянием *одного или нескольких* лекарств, или других кардинальных адсорбатов, будет рассмотрено в следующем разделе.

7. Активный центр фермента контролируется множеством фармакологических «эффекторных» центров

В этом разделе будут затронуты две узкие области физиологии клетки: энзимология и фармакология. Я покажу, как вышеописанный молекулярный механизм дистанционного каскадного управления и контроля способен заполнить ряд зияющих пробелов в этих областях знания.

Слово «энзим» (фермент) было предложено Вилли Кюне (1837–1900) в 1878 году [455]. В 1902 году Генри предположил, что уровень активности фермента зависит от концентрации комплекса, образованного *субстратом* и *ферментом* [445]. В 1913 году Михаэлис и Ментен, исходя из этого предположения, опубликовали основы будущей теории ферментативной активности Михаэлиса—Ментен [446, p. 73–77].

Диксон и Уэбб в своем классическом труде по ферментам, вышедшем еще в 1958 году, перечислили не менее 123 идентифицированных, очищенных и кристаллизованных ферментов [446]. В настоящее время этот список стал гораздо длиннее. Стандартное исследование любого очищенного или неочищенного фермента почти всегда включает определение зависимости активности фермента от pH (см. рис. 52B), которое, как правило, имеет колоколообразную форму. Зависимость такой формы можно зачастую получить под влиянием и других ионов, например, K^+ (рис. 52C и E) и Mg^{2+} (рис. 52D). Но почему эта зависимость имеет именно такую форму? Насколько мне

известно, электронное объяснение этой закономерности дано только теорией АИ [98, Ch. 14; 458]. Мы вскоре вернемся к этому вопросу.

В 1926 году Альфред Кларк предложил *теорию действия лекарств* [447], в основе которой лежал тот же принцип, что и в теории ферментативной активности Генри и Михаэлиса—Ментен. Согласно теории Кларка, сила лекарственного действия зависит от концентрации *комплекса препарат-рецептор*. Арьенс и др. [448] развили теорию Кларка. Они успешно предсказали изменения характера физиологической (или фармакологической) реакции на одно или несколько лекарств в зависимости от заданного «*сродства*» ре-

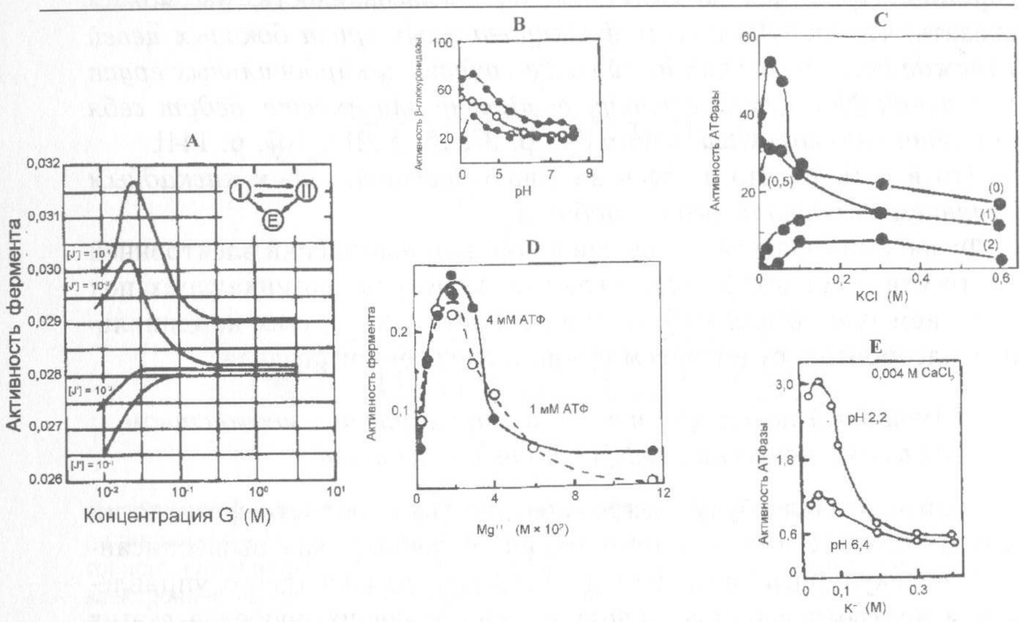


Рис. 52. Влияние изменения концентраций двух кардинальных адсорбатов на активность различных ферментов. Представлены экспериментальные данные различных авторов для сравнения с математической моделью (панель A), демонстрирующей тот же характер зависимостей, что и реальные ферменты. A. Зависимость активности фермента-модели (E) от концентрации кардинального адсорбата G в присутствии различных концентраций другого кардинального адсорбата J′. Моделью постулируется наличие в молекуле фермента, кроме активного центра, двух кардинальных центров (I и II), оказывающих влияние друг на друга и взаимодействующих соответственно с кардинальными адсорбатами J′ и G. Концентрация J′ (в молях/л) указана рядом с каждой кривой. B. Активность глюкуронидазы при различных pH. Каждая кривая соответствует глюкуронидазе разных животных [451]. C. АТФазная активность миозина B в присутствии KCl или хлористого уранила (UO_2Cl_2) в разных концентрациях [449]. D. Ферментативный синтез дезоксицитидинфосфата в присутствии Mg^{2+} и АТФ, исследованных в разных концентрациях [452]. E. Влияние pH и KCl на активность миозиновой АТФазы [450]. Сравнение показывает, что предложенная модель способна описывать весь спектр экспериментальных данных. (По Лингу [453]).

цептора к препарату и его «*удельной активности*» — доли физиологической активности, приходящейся на один комплекс «препарат-рецептор».

Однако они никак не объяснили ни причин исследованных ими изменений, ни их механизмов. Но если мы хотим осмыслить энзимологию и фармакологию как неотъемлемую часть физиологии клетки, мы должны понимать эти явления. В конце концов, большинство ферментов выделено именно из клеток, где их роль в высшей степени скоординирована и тесно взаимосвязана. Действие лекарств также увязано с условиями внутриклеточной среды. Они вторгаются в систему взаимодействий множества кардинальных адсорбатов, поддерживающих клетку в состоянии покоя. На первый взгляд кажется, что мы в состоянии понять и проследить действие только одного кардинального адсорбата, а не всего их множества, но на

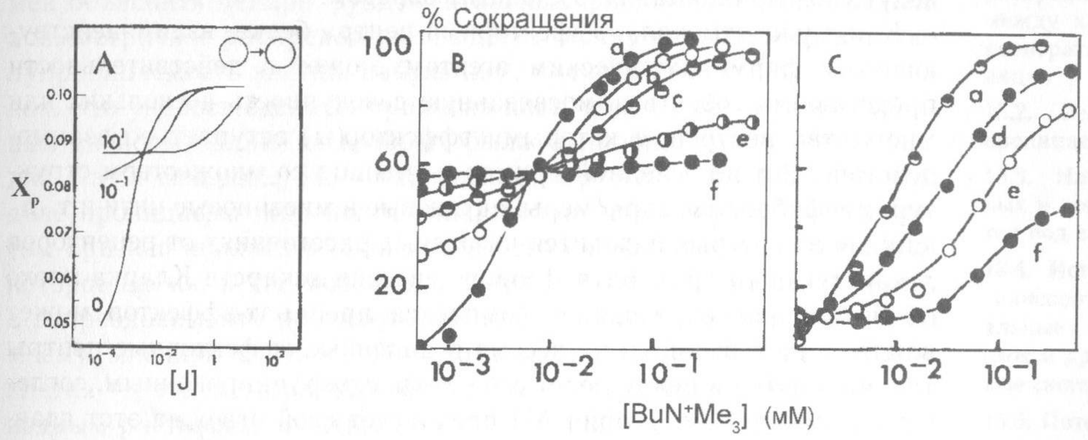


Рис. 53. Влияние изменения концентраций двух кардинальных адсорбатов на сократимость прямой мышцы живота лягушки. Представлены экспериментальные данные ван Россума с сотр. [454] для сравнения с математической моделью (панель A), демонстрирующей тот же характер зависимостей, что и мышцы. A. Математическая модель взаимодействия одного рецепторного кардинального центра и одного эффекторного кардинального центра (показаны кружками), связывающих препараты J и G соответственно. Концентрация G указана рядом с каждой кривой. Концентрация J — на оси абсцисс. На оси ординат показаны расчетные значения «ответной реакции» модели. B. Влияние иона бутилтриметиламмония на сократимость прямой мышцы живота лягушки в присутствии декапирролиниевого иона в концентрациях, возрастающих от a до f. По оси ординат — степень сокращения (в процентах от максимального); по оси абсцисс — концентрация иона бутилтриметиламмония. C. То же, что и на панели B, но в присутствии возрастающих от a до f концентраций декапиперидинового иона. Сравнение показывает, что предложенная модель способна описывать весь спектр экспериментальных данных не только на молекулярном (рис. 52), но и на клеточном уровне. (По Лингу [453]).

самом деле дела обстоят не так плохо: ведь все разнообразие клеточных процессов основано на фундаментальных свойствах одной живой структуры — протоплазмы.

Действительно, и за контролем ферментативной активности со стороны кардинальных адсорбатов и ионов, и за влиянием лекарственных препаратов на мышечное сокращение, просматриваются закономерности работы одного и того же образования — элементарной живой электронной машины, физической основы жизни (рис. 44).

Особенность фермента в том, что его активный центр представлен обычно конкретной структурой в его молекуле, а эффекторные «центры», хоть и показаны на рис. 52 и 53 как дискретные, на самом деле могут быть совокупностью множества взаимодействующих центров, работающих как единое целое.

Рис. 53 повторяет по смыслу рис. 52, но если раньше мы рассматривали свойства изолированных белков, то на этот раз речь идет о реакции на химическое воздействие *целой клетки*. Нетрудно видеть, что используемый мною подход одинаково успешно применим для описания и белков, и такой надмолекулярной структуры, как протоплазма. Клетка в целом и «элементарная живая машина» ведут себя принципиально сходным образом.

Как я уже отмечал, «эффекторный центр» белка, взаимодействующего с фармакологическим агентом, может в действительности представлять собой взаимосвязанную совокупность нескольких или множества центров, с которыми эффектор(ы) вступает во взаимодействие. Вот и последний пример — мышца со множеством структур: миофибриллы, саркомеры, актиновые и миозиновые нити и т. д., каждая из которых находится на разных расстояниях от рецепторов лекарственного препарата. Теория действия лекарств Кларка плохо объясняет, как образование комплекса препарат-эффектор может влиять и на близкие, и на весьма отдаленные эффекторные центры так, что клетка в целом ведет себя столь скоординированным, согласованным образом. Теория АИ предлагает свой ответ на этот главный нерешенный вопрос фармакологии, показывая, как связывание одного или более кардинальных адсорбатов приводит к одинаковым изменениям всех, и ближних, и отдаленных, центров так, как будто они являются единым целым.

ГЛАВА 15.

КЛЕТКА В СОСТОЯНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ: ЭЛЕКТРОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ, РОЛЬ АТФ, ЛЕКАРСТВ, ГОРМОНОВ И ДРУГИХ КАРДИНАЛЬНЫХ АДСОРБАТОВ

Мембранная теория когда-то приобрела мировое признание, сумев объяснить четыре фундаментальных физиологических явления: асимметричное распределение веществ между клеткой и средой, полупроницаемость клетки, набухание/сжатие клетки и потенциал покоя. Это удалось сделать, приписав клеточной мембране ряд странных свойств, одним из которых была непроницаемость мембраны для Na^+ и сахарозы. Но когда было обнаружено, что она на самом деле проницаема для них, позиции теории пошатнулись. Результатом кризиса явилась теория натриевого насоса. Но прошло еще некоторое время, и эта модифицированная теория также столкнулась с непреодолимыми противоречиями. В настоящее время можно, по моему мнению, считать, что эпоха парадигмы, согласно которой клетки — это мембранные пузырьки, заполненные разбавленным водным раствором электролитов, закончилась.

При знакомстве с теорией фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ) и теорией МОПВ в центре нашего внимания было два физиологических феномена: избирательная адсорбция K^+ с вытеснением Na^+ из центров связывания, а также многослойная адсорбция воды, молекулы которой в этих слоях ориентированы в пространстве в определенном порядке и поляризованы (то есть имеют увеличенный дипольный момент). И то, и другое — черты *статического* состояния системы, характерные для клетки в состоянии покоя. Теперь пришло время рассмотреть механизмы *активности* клетки. В начале этой главы мы рассмотрим четыре основных, фундаментальных, свойства клетки с позиций теории АИ, а затем исследуем, как АТФ, лекарства, гормоны и другие кардинальные адсорбаты влияют на эти физиологические явления, регулируют их посредством механизма электронного контроля, о котором мы узнали из предыдущей главы. Кроме того, мы рассмотрим такие *динамические явления,* как потенциал действия и активный транспорт, без которых физиология клетки невозможна.

15.1. Избирательность в распределении веществ между клеткой и средой: кооперативность и регуляция

15.2. Регуляция ионной проницаемости

15.3. Набухание интактных и поврежденных клеток под влиянием солей

15.4. Истинный активный транспорт через бифациальные эпителиальные слои и другие бифациальные системы

15.5. Потенциал покоя

15.6. Потенциал действия

15.1. Избирательность в распределении веществ между клеткой и средой: кооперативность и регуляция

В этом разделе мы продолжим разговор о распределении ионов Na^+ и K^+, а также Mg^{2+} между мышечными волокнами лягушки

и средой. Особенно пристально мы рассмотрим влияние АТФ на состояние клеточной воды и K^+, а также влияние сердечного гликозида уабаина на накопление K^+ и ионов других щелочных металлов в мышцах лягушки.

Затем мы разберем вопрос о накоплении мышечными волокнами лягушки D-глюкозы и аминокислоты глицина, и о влиянии на эти процессы гормона инсулина. Кроме того, я коснусь накопления лактозы клетками бактерии Escherichia coli (E. coli).

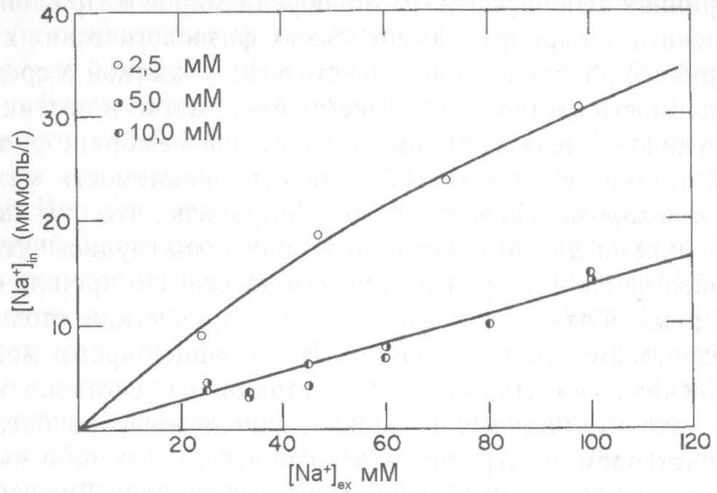


Рис. 54. Зависимость равновесного распределения ионов Na^+ между портняжными мышцами лягушки и средой от концентрации Na^+ в среде в присутствии 2,5, 5,0 или 10 мМ K^+ в омывающем растворе (при 0 °С). Представленные данные получены после внесения поправки на 10%-ю фракцию ионов Na^+, заключенную в межклеточном пространстве (согласно более поздним нашим данным, эта цифра составляет 9%, однако график пересмотрен не был и публикуется в том виде, в каком он был впервые опубликован в 1969 году). На оси ординат — внутриклеточное содержание Na^+ в мкмоль/г сырого веса; на оси абсцисс — концентрация Na^+ (в основном в виде хлорида) в среде в мМ. Нижняя группа экспериментальных данных, полученная при концентрации K^+ в среде выше физиологической нормы (2,5 мМ), характеризуется линейной зависимостью с наклоном 0,14, которому соответствует коэффициент распределения (q), равный 0,18, полученный делением тангенса угла наклона, 0,14, на содержание воды в мышечных волокнах (80%). В этих расчетах не было сделано поправки на Na^+, связанный с соединительной тканью. Чуть позднее, на основе имевшихся тогда данных, я определил, что значение q (для распределения в системе внутриклеточная вода мышечных клеток лягушки/омывающий раствор) для ионов Na^+ (в виде хлорида) находится оценочно между 0,14 и 0,18; наилучшим значением представляется величина 0,15. (По Лингу [173]).

1. Накопление клетками ионов K^+, Na^+ и Mg^{2+}

В разделе 10.2 я уделил много внимания доказательствам адсорбированного состояния клеточного K^+. Обратимся теперь к ионам, остававшимся до сих пор в тени, — к Na^+ и Mg^{2+}.

На рис. 54 показана зависимость содержания Na^+ в мышце лягушки от концентрации этого иона в среде при разных концентрациях K^+ в омывающем растворе в условиях диффузионного равновесия (такими зависимостями характеризуют распределение веществ между клеткой и средой). Результаты в целом соответствуют уравнению Трошина (уравнение А1 в приложении), с помощью которого можно определить размеры внутриклеточных фракций свободного и адсорбированного Na^+.

Возникает вопрос: почему зависимости на рис. 54 становятся *линейными* при более высоком содержании K^+ в среде? Дело в том, что в таких концентрациях ионы K^+ полностью вытесняют ионы Na^+ из мест связывания. В результате, в клетке вместо двух фракций этого катиона остается только одна — фракция свободных ионов Na^+. Теперь распределение этого катиона определяется только *одним* фактором — различием в растворяющей способности внутриклеточной воды и объемной. Интересно, что величина q для сахарозы (рис. 27) составляет 0,13, то есть близка к q для Na^+. Это сходство свидетельствует о том, что распределение этих, столь непохожих, веществ обусловлено одной общей причиной — особенностями внутриклеточной воды.

В то время, как K^+ способен оказывать влияние на распределение Na^+, его влияние на распределение двухвалентного иона Mg^{2+} между мышечными клетками и яйцеклетками лягушки и средой показать не удалось [502]. В свою очередь, и Mg^{2+} не оказывает заметного влияния на распределение ионов K^+. Эти факты противоречат доннановской версии мембранной теории (раздел 4.3), в которой распределение всех ионов, способных проникать через мембрану, подчиняется одному и тому же уравнению [99, p. 216; 15, p. 28; 107, p. 17], а, значит, *должны* оказывать взаимное влияние на распределение друг друга. Этот же упрек справедлив и по отношению к уравнению Доннана для потенциала покоя (рис. 4В). С другой стороны, рассматриваемые факты полностью соответствуют теории АИ, согласно которой, прямой связи между распределением ионов и потенциалом покоя *не существует*, равно как не существует и предпосылок для влияния одновалентных ионов на распределение двухвалентных и наоборот, так как они сорбируются в клетке разными центрами.

Mg^{2+}-адсорбирующие центры мышцы лягушки (с сильным сродством) способны связать около 12 мкмолей этого катиона на грамм сырого веса и полностью насыщаются уже при 1 мМ Mg^{2+} в среде или еще меньше (просто 1 мМ — минимальная изученная нами концентрация). Значение q для Mg^{2+} в виде хлорида при 25 °С составляет 0,21. В первом приближении полученные данные подчиняются уравнению Трошина.

Уравнение Трошина — частный случай более общего уравнения Линга, описывающего распределение веществ между средой и клетками или модельными системами [156] (уравнение А3 в приложе-

нии). Допущения, на основе которых выведено уравнение Трошина, не учитывают *кооперативного* взаимодействия центров адсорбции между собой. Отличительная черта теории АИ, напротив, — учет *кооперативного* взаимодействия между β- и γ-карбоксильными и между ними и другими *не слишком удаленными (проксимальными) функциональными группами*. Но надо помнить о том, что при определенных условиях эта кооперативность может быть очень слабой или отсутствовать.

Автокооперативность становится заметной, когда *энергия взаимодействия ближайших центров* начинает существенно превышать

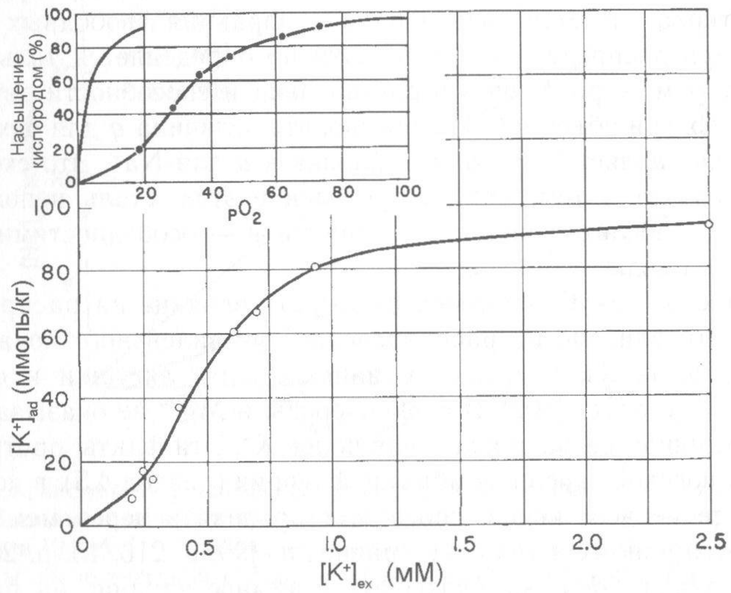


Рис. 55. Зависимость содержания K^+ в портняжных мышцах лягушки (при 25 °С) от концентрации K^+ в среде в условиях диффузионного равновесия. Концентрацию K^+ в среде варьировали в пределах физиологической нормы, в то время как концентрация Na^+ поддерживалась на постоянном уровне — 100 мМ. S-образная форма кривой напоминает кривую поглощения кислорода эритроцитами человека, приведенную во врезке (кривая справа); левая кривая — поглощение кислорода изолированным миоглобином [440]. (По Лингу [439]).

ноль ($-\gamma/2 >> 0$), а это происходит при достаточно больших различиях в энергии адсорбции конкурирующих адсорбатов (подробности см. в работе [107, pp. 139–140]), как в случае, когда мышечные волокна лягушки находятся в среде с высоким уровнем Na^+ и *очень низким* уровнем K^+. На рис. 55 изображен выраженный автокооперативный процесс — поглощение K^+ мышечными клетками, так как соответствующий график имеет S-образную форму, подобно кривой поглощения кислорода эритроцитами человека, приведенной на врезке. При этом поглощение кислорода миоглобином (кривая

слева на врезке) не обладает признаками автокооперативности, то есть центры связывания не оказывают друг на друга существенного влияния, что характерно для адсорбции по Ленгмюру.

Замечу в скобках, что *линейный* характер распределения веществ между клеткой и средой с наклоном меньше единицы *принципиально несовместим с идеей насосов* (речь идет о данных, приведенных на рис. 26, 27 и 54). Если низкая концентрация какого-либо вещества в клетке (по сравнению со средой) поддерживается работой насоса, выкачивающего его, то распределение такого вещества не может быть линейным потому, что будет определяться весьма ограниченным числом насосов по сравнению с количеством перекачиваемых ионов или молекул [174], то есть мы всегда должны будем наблюдать кривую с *насыщением* по мере роста (в 4—9 раз) внутриклеточной концентрации «пассажира», которого необходимо вывезти из клетки в среду. При столь значительном росте «спроса» свободных «такси» на всех не хватит.

2. Влияние АТФ на растворяющую способность клеточной воды

После создания теории фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ) одним из лейтмотивов теории АИ стала количественная связь между уровнем АТФ и внутриклеточным равновесным содержанием K^+. Экспериментальные подтверждения реальности такой связи мы находим в литературе.

Связь между содержанием АТФ и K^+ была обнаружена в самых разных клетках и их моделях, в том числе: в замкнутых тенях эритроцитов, содержащих лишь остаточные количества гемоглобина и других белков [140] (рис. 33); в консервированных эритроцитах человека [94, pp. 253–254] и в эритроцитах ряда млекопитающих [191]; в бактериях E. coli [98, p. 255]. Во всех перечисленных случаях диффузионное равновесие достигалось быстро, так как проницаемость для K^+ и Na^+ у исследованных клеток высока. Однако *свежие* эритроциты человека, напротив, слабо проницаемы для K^+ и Na^+ [465], и достижение равновесия становится чрезвычайно продолжительным процессом. По этой причине на таких клетках становится весьма затруднительным исследование *in vitro* взаимосвязи АТФ–K^+, предсказываемой теорией АИ [370]. Чаще всего зависимость между уровнями АТФ и K^+ изучали на мышцах лягушки [107, pp. 192–193]. В частности, именно на этом объекте получены данные, показанные на рис. 17, 19 и 56. На последнем рисунке видно, кроме того, что с содержанием АТФ связано и содержание Na^+ в клетке.

Согласно теории МОПВ, чем больше размер молекулы растворенного вещества (таких, как сахароза, например) или ассоциата (гидратированный Na^+, например), тем меньше коэффициент их распределения (q) между клеткой и средой. С другой стороны, чем больше в клетке связанной воды (с ее многослойной организацией), тем меньше величина q для данного растворенного вещества (раздел 11.3, п. 4) и наоборот. Но количество связанной воды зависит в

определенных пределах от уровня АТФ: чем больше адсорбированной АТФ, тем больше в клетке связанной структурированной воды, тем меньше концентрация веществ в водной фазе клетки. В этом случае становится понятным, почему при снижении содержания в клетке АТФ концентрация Na^+ в ней возрастает (рис. 56).

На рис. 56 показано снижение уровня K^+ в мышечных клетках лягушки при действии метаболического яда — иодацетата натрия. Читатель помнит, что иодуксусная кислота ингибирует углеводный обмен, в результате чего уровень АТФ снижается, и клетки, в конеч-

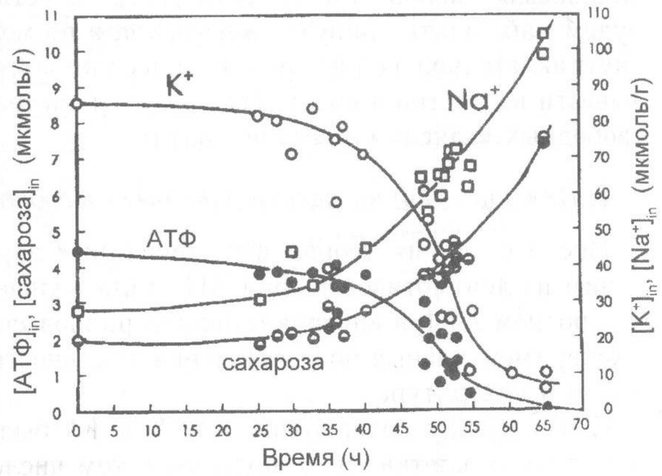


Рис. 56. Изменение содержания K^+, Na^+, сахарозы и АТФ в мышцах лягушки во времени при инкубации в растворе Рингера (0 °С), содержащем 0,1 мМ иодацетата натрия и 10 мМ меченой сахарозы. Светлые кружки — K^+; светлые квадратики — Na^+; темные кружки — АТФ; наполовину закрашенные кружки — сахароза. Внутриклеточное содержание исследованных веществ дано в мкмолях/г сырого веса ткани. (По Лингу и Оксенфельд, не публиковано).

ном итоге, погибают. По мере развития повреждения, содержание K^+ в клетках снижается вместе со снижением уровня АТФ, а концентрация Na^+, напротив, — возрастает.

Согласно теории АИ, уровень Na^+ в клетке может увеличиваться по двум причинам: в результате захвата β- и γ-карбоксильными группами, обычно занятых K^+, и вследствие уменьшения объема (доли) структурированной воды в клетке, сопровождающегося ростом величины q для ионов Na^+ в клеточной воде, которая становится все более свободной. Разграничить эти две причины можно введением молекулярного зонда — сахарозы, например, которая не взаимодействует с фиксированными зарядами.

На рис. 56 видно, что, несмотря на электронейтральность, уровень сахарозы в клетке растет в той же мере, что и уровень Na^+, хотя конкуренции между ними за фиксированные анионы быть не может. Это значит, что большая часть ионов Na^+, проникших в отравленную мышечную клетку, находится в свободном состоянии, в виде раствора в клеточной воде, а увеличение количества этих ионов в клетке объясняется уменьшением объема связанной воды по мере истощения АТФ.

Однако всегда следует помнить и о возможности наличия фракции связанного Na^+. Так, в неопубликованной работе мы показали, что рост уровня Na^+ в клетке при распространяющемся повреждении портняжной мышцы лягушки, исследованной по методике БНК (рис. 7) частично обусловлен адсорбцией ионов Na^+ клеточными структурами вблизи разреза. Эта возможность подтверждается тем фактом, что часть ионов Na^+ можно вытеснить из клетки, повысив в среде концентрацию таких конкурентоспособных ионов, как K^+ или Rb^+.

Поскольку последствия действия иодуксусной кислоты на мышцы лягушки нам достаточно хорошо известны, мы можем заключить, что *обратная* зависимость между уровнями АТФ и Na^+ (а также сахарозы) и *прямая* связь между уровнями АТФ и K^+ свидетельствуют об обоснованности *основополагающего постулата теории АИ: АТФ регулирует как избирательное накопление K^+, так и частичное вытеснение Na^+ из клетки в среду*, как это показано на рис. 44. Но это еще не все.

Теперь мы можем еще на шаг приблизиться к ответу на два других важнейших вопроса: *каким образом* АТФ обеспечивает избирательную адсорбцию K^+ в присутствии Na^+ всеми теми β- и γ-карбоксильными группами, содержание которых можно оценить в 100 ммоль/кг сырого веса мышц лягушки, и *каким образом* АТФ влияет на растворимость Na^+ во внутриклеточной воде, содержание которой составляет 44 моль/кг сырого веса мышц? Из предыдущей, 14-й, главы мы уже почерпнули важные сведения, необходимые для ответа на эти вопросы. Разделим их на четыре группы:

1) расчеты на основе физической модели показали, что когда величина c β- и γ-карбоксильных групп миозина и других белков принимает низкие значения, их сродство к K^+ выше, чем к Na^+ (раздел 14.1, п. 2);

2) мы узнали о том, что между электронодонорной силой боковых групп и способностью ближайших к ним функциональных групп пептидной связи включаться в α-спирали (и в другие структуры, стабилизируемые водородными связями с участием указанных групп) существует положительная корреляционная связь. С другой стороны, снижение электронной плотности на карбонильных группах полипептидного остова (снижение аналога величины c) приводит к разрушению вторичной структуры белка, к вступлению пептидных связей во взаимодействие с водой с образованием множественных слоев связанных и дополнительно поляризованных молекул растворителя (раздел 14.1, п. 3);

3) из экспериментов Чанга и Пенефского [509] с тушением флуоресценции (рис. 49) и других данных мы сделали вывод, что АТФ играет роль электроноакцепторного кардинального адсорбата, или ЭАКА (раздел 14.3, п. 4);

4) на основе данных о способности индуктивного эффекта распространяться за пределы коротких участков полипептидной цепи и небольшого числа метиленовых групп боковых цепей (рис. 46) была

создана физическая модель, согласно которой связывание ЭАКА (например, АТФ) с соответствующим кардинальным центром может повлечь за собой, по принципу домино, понижение электронной плотности (величины *c*) на всех β- и γ-карбоксильных группах молекулы белка и на всех карбонильных группах ее полипептидного остова (раздел 14.3, п. 6).

Связав все сказанное в единое целое, мы приходим к следующей последовательности событий: адсорбция АТФ влечет за собой снижение электронной плотности на β- и γ-карбоксильных группах миозина и других белков мышечной клетки; в результате перераспределения электронной плотности сродство карбоксильных групп к K^+ и Na^+ изменяется: к Na^+ — снижается, а к K^+ — возрастает, что приводит к избирательному связыванию ионов K^+ в присутствии Na^+. Связывание АТФ приводит также к разворачиванию белка и к значительному усилению взаимодействия его полипептидного остова с водой. Это происходит в результате снижения электронной плотности на кислороде карбонильных групп пептидных связей. Все или почти все 44 моля воды, содержащихся в килограмме сырого веса мышечной ткани, оказываются связанными и структурированными (в случае мышечной ткани основными белками являются миозин и актин). Снижение содержания АТФ (в случае ингибирования энергетического обмена или по иным причинам) влечет за собой уменьшение доли связанного K^+ и воды. С уменьшением доли связанной воды вытесняющая способность клеточной воды снижается (содержание Na^+, сахарозы и других свободных компонентов во внутриклеточной среде возрастает), то есть снижается *напряжение вытеснения* (U_{vp}) воды (раздел 11.3, п. 4), а коэффициенты распределения веществ между клеткой и средой (q) соответственно возрастают. Все принципиальные этапы этих изменений получили экспериментальное подтверждение.

Я назвал АТФ *главнейшим кардинальным адсорбатом*, так как она играет уникальную роль в поддержании клеток в состоянии покоя — состояния, являющегося началом начал для всех проявлений жизнедеятельности (рис. 44). Однако любое нарушение чуткого равновесия покоя может привести клетку в совершенно иное состояние, в одно из великого множества состояний, на которое только способна жизнь. Регуляторную, сигнальную роль в таком превращении могут сыграть различные кардинальные адсорбаты. Рассмотрим действие одного из них — гликозида уабаина.

3. Влияние уабаина на относительную селективность адсорбционных центров к ионам щелочных металлов

Экспериментальные данные, рассмотренные в разделе 10.2, свидетельствуют о том, что большая часть ионов щелочных металлов в мышечных волокнах лягушки адсорбированы β- и γ-карбоксильными группами белков, в основном миозина. Обработка мышечных волокон сердечным гликозидом уабаином, взятым в сравнительно невысокой концентрации ($3{,}26 \times 10^{-7}$ М), меняет порядок «предпочтений» связывающих центров с обычного ($Rb^+ > K^+ > Cs^+ > Li^+ > Na^+$) на следующий: $K^+ > Li^+ > Cs^+ > Rb^+ > Na^+$ [290]. Первый порядок соответствует расчетному значению величины c −4,20 Å; второй: −3,25 Å (рис. 42). Следовательно, уабаин представляет собой *электронодонорный кардинальный адсорбат* (ЭДКА), поскольку вызывает увеличение электронной плотности на β- и γ-карбоксильных группах. При всей очевидности высокой фармакологической активности уабаина его электронодонорная способность не так велика, если сравнивать его с другими кардинальными адсорбатами (раздел 15.6, п. 2.3).

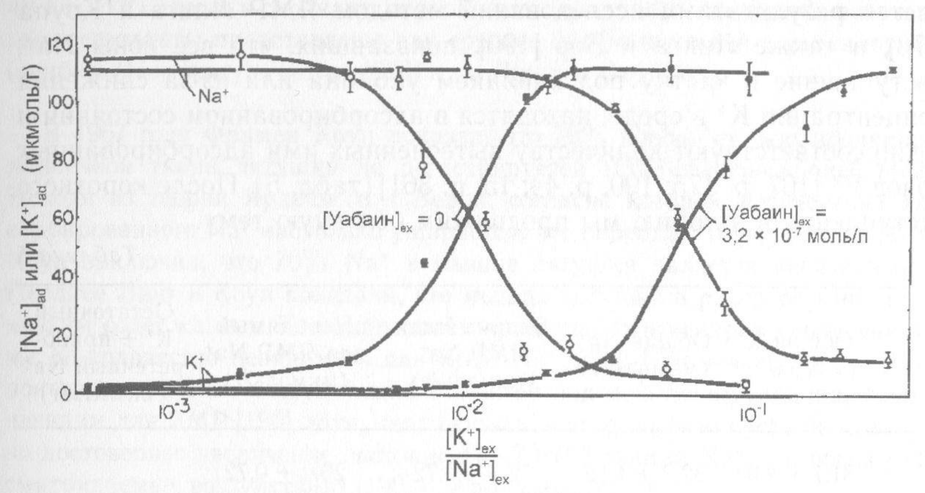


Рис. 57. Влияние уабаина ($3{,}26 \times 10^{-7}$ М) и относительного содержания K^+ и Na^+ в среде $[(K^+)_{ex}/(Na^+)_{ex}]$ (ось абсцисс) на количество *адсорбированного* K^+ и *адсорбированного* Na^+ в волокнах портняжных мышц лягушки при 25 °С в условиях диффузионного равновесия. Количество адсорбированного K^+ и Na^+ показано на оси ординат в мкмоль/г сырого веса мышцы. Экспериментальные значения аппроксимированы с помощью уравнения А4 (приложение). Каждая пара скрещивающихся кривых показывает процесс замещения натрия калием в местах связывания при увеличении доли K^+ в омывающем растворе. Видно, что для замещения Na^+ в мышцах, обработанных уабаином, требуется почти в 10 раз больше K^+, чем в контроле (кривые сдвигаются вправо), что свидетельствует об увеличении сродства центров связывания к Na^+ под влиянием кардинального адсорбата — уабаина (физическую модель процесса см. в [107, Ch. 8]). Расчеты показывают, что энергия взаимодействия соседних центров ($-\gamma/2$) при этом почти не изменяется, то есть уабаин не влияет на степень автокооперативности рассматриваемых сорбционных процессов (степень кривизны кривых почти не меняется). Важно отметить, что уабаин в концентрациях ниже 10^{-6} М не влияет на содержание АТФ в мышцах; при концентрациях выше указанного порога содержание АТФ заметно падает. (По Лингу и Бор [190]).

Тем не менее, обработка уабаином в указанной концентрации увеличивает отношение сродства связывающих центров к Na^+ относительно K^+ больше, чем на два порядка: с $0{,}0037 \pm 0{,}00017$ в контроле до $0{,}48 \pm 0{,}07$ [280; 107, Fig. 6.9, Fig. 8.12] (см. рис. 42,

отношение сродства — это отношение свободной энергии связывания данного иона к свободной энергии связывания K^+ при данном значении величины *c*). На рис. 57 показано как уабаин влияет на накопление K^+ и Na^+ в портняжной мышце лягушки [190].

Данные, представленные на рис. 57 позволяют также понять, что эффект действия уабаина можно воспроизвести не добавляя его в среду. Как показали эксперименты, для этого достаточно *снизить* концентрацию K^+ в растворе Рингера с 2,5 мМ (физиологическая норма) до 0,5 мМ. С другой стороны, *увеличение* концентрации K^+ в среде полностью снимает действие уабаина.

Уабаин в концентрации $3{,}26 \times 10^{-7}$ М не оказывает значимого влияния на структуру и свойства связанной воды, что подтверждается результатами исследований методом ЯМР Линга и Коупа [276], а также Линга и Бор [190], показавших, что все ионы Na^+, поступившие в клетку под влиянием уабаина или из-за снижения концентрации K^+ в среде, находятся в адсорбированном состоянии и точно соответствуют количеству вытесненных ими адсорбированных ионов K^+ [107, p. 175; 190, p. 44; 15, p. 361] (табл. 5). После короткого отступления в историю мы продолжим основную тему.

Таблица 5

	Общий K^+ (мкмоль/г)	Общий Na^+ (мкмоль/г)	Видимый для ЯМР Na^+ (мкмоль/г)	Невидимый для ЯМР Na^+ (мкмоль/г)	Остаточный K^+ + приобретенный Na^+ (мкмоль/г)
Контроль (3)	81,7 ± 2,04	32,2 ± 1,12	12,3 ± 0,72	20,0 ± 0,72	
В среде, обедненной K^+ (13)	37,5 ± 3,00	74,1 ± 5,00	26,2 ± 1,53	47,9 ± 3,57	
Изменение	−44,2	+41,9	+13,9	+27,9	79,4
Интенсивность центрального пика			0,33		
Обработанные уабаином (3)	43,6 ± 2,61	80,3 ± 0,93	25,8 ± 0,28	54,5 ± 0,93	
Изменение	−38,1	+48,1	+13,5	+34,5	91,7
Интенсивность центрального пика			0,28		

Содержание ионов калия и натрия в мышцах лягушки в контроле и после инкубации в растворе Рингера с низким содержанием K^+ (0,2–0,5 мМ) или с уабаином (10^{-7} М) при 25 °С. Основная часть экспериментов проведена на портняжных мышцах, а также на полусухожильных и передних большеберцовых. Контрольные мышцы инкубировали в стерильных условиях 3–4 дня в обычном растворе Рингера, содержавшем 100 мМ Na^+ и 2,5 мМ K^+. Общее количество K^+ и Na^+ в мышечной ткани определяли методом пламенной фотометрии в экстрактах, полученных обработкой 0,1 н раствором HCl. Уровень видимого для ЯМР Na^+ исследовали в образцах мышц весом 2 г при помощи широкополосного спектрометра фирмы Varian методом, описанным Коупом [472]. Количество Na^+, *невидимого* для ЯМР, определяли вычитанием *видимой* для ЯМР фракции из общего количества Na^+, полученного пламенной фотометрией (пример для уабаина: 80,3 − 25,8 = 54,5). Чтобы оценить только тот *видимый* для ЯМР Na^+, который *вытеснил* клеточный K^+, проводили вычитание из количества Na^+, поступившего в мышцы из среды, обедненной K^+, или обработанных уабаином, соответствующего количества Na^+ в контрольных мышцах (пример для уабаина: 25,8 − 12,3 = 13,5); аналогичный расчет проводили и для фракции Na^+, *невидимой* для ЯМР. При таком расчете исключался вклад *свободного* Na^+ в мышечных волокнах и в межклеточном пространстве в величину центрального пика (см. текст) для ЯМР-видимой фракции Na^+. Деление прироста ЯМР-видимой фракции Na^+ на приобретенный Na^+ (пример для уабаина: 13,5/48,1 = 0,28) дает относительную интенсивность центрального пика, обозначенную в таблице просто как «интенсивность центрального пика». В последней колонке представлена сумма оставшегося K^+ и приобретенного Na^+ (пример для уабаина: 43,6 + 48,1 = 91,7). Число в скобках в первой колонке — число измерений; полученные результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка. (По Лингу и Коупу [276] и по Лингу и Бор [190]).

В 1967 году Фримен Коуп показал, что 70% ионов Na^+ изолированной мышечной ткани лягушки не регистрируется ЯМР-спектроскопией [472]. Исходя из теории Ярдецкого и Верца, согласно которой ЯМР-сигнал адсорбированного Na^+ настолько уширяется, что перестает определяться [473], Коуп заключил, что 70% Na^+ в мышце лягушки является «связанным». Позднее Линг и Коуп показали, что мышца лягушки в растворе Рингера с низким содержанием K^+ накапливает примерно эквимолярное вытесняемому K^+ количество невидимого для ЯМР Na^+ [276]. Еще позже Линг и Бор показали, что Na^+, поступающий в мышцу под действием уабаина, также невидим для ЯМР [190], хотя, надо сказать, нас озадачило пусть небольшое, но достоверное увеличение *видимой для ЯМР* фракции Na^+ при обоих рассматриваемых воздействиях [190, p. 444] (табл. 5).

На симпозиуме, организованном Нью-Йоркской академией наук в январе 1972 года, Берендсен и Эдзес настойчиво привлекали наше внимание к иному объяснению исчезновения ЯМР-сигнала Na^+ [474], отличавшемуся от представлений, возникших в ходе проводившихся с 1950-х годов исследований ЯМР-спектров твердых кристаллов [475, pp. 233–248; 476; 477, pp. 115–119].

Их объяснение сводилось к следующему: Na^{23} обладает ядром с несферическим (асимметричным) распределением заряда. Если такое ядро попадает в неоднородное электрическое поле (например, электрическое поле фиксированного заряда), его резонансный пик ЯМР расщепляется таким образом, что к центральному пику добавляется еще два добавочных, широких, «размытых» пика, что ослабляет сигнал в целом (отсюда «невидимость» таких ядер). Этот феномен называется *уширением квадруполя первого порядка*. Относительная интенсивность центрального пика у ядер со спиновым квантовым числом 3/2, как у ^{23}Na, составляет 0,4 [475, p. 237].

Для понимания наших результатов важно отметить, что в твердых кристаллах к уширению квадруполя первого порядка могут привести несовершенства кристаллической решетки или примеси, создающие асимметрию градиента поля. Однако, если квадрупольные взаимодействия становятся очень сильными, это тоже может приводить к уширению центрального пика — это называется *уширением квадруполя второго порядка* [475, p. 246]. Так, в медном сплаве, содержащем цинк или серебро, интенсивность центрального пика спектра меди может снижаться с 0,4 вплоть до

0,01, если содержание цинка или серебра приближается к 20% [475, p. 248]. Таким образом, мы имеем, по крайней мере, две причины, объясняющие невидимость ^{23}Na, поэтому объяснение наших оппонентов не доказывает, что невидимый Na^+ может или должен быть обязательно свободным. Решение этой проблемы следует искать в сравнении данных ЯМР с данными, полученными другими методами.

Теперь вернемся к табл. 5. Вычтя видимую и невидимую для ЯМР фракцию Na^+ в *контрольных* мышцах из соответствующих фракций мышц в обедненной K^+ среде, или обработанных уабаином, можно получить то количество видимого и невидимого для ЯМР Na^+, которое вытеснили в обработанных мышцах ионы K^+. Это вычитание исключает сигналы от свободного Na^+ как в клетке, так и во внеклеточном пространстве, и в результате остается учтенным именно тот видимый для ЯМР Na^+, который соответствует центральному пику расщепленного сигнала. Обратите внимание, что интенсивность центрального пика составляет не 0,4, как ожидается при уширении квадруполя первого порядка, а соответственно 0,33 и 0,28. Это может быть результатом более сильного квадрупольного взаимодействия, которое неизбежно влечет за собой уширение квадруполя второго порядка.

Берендсен и Эдзес усомнились в нашем выводе, что внутриклеточный Na^+ в нормальных мышцах и в мышцах, инкубированных в обедненной K^+ среде, может быть частью адсорбирован, а частью свободен. В поддержку своей точки зрения они привели данные, согласно которым ЯМР-сигналы Na^+ в трех разных объектах — в сульфонатной ионообменной смоле (Dowex 50), в мертвых мышцах крысы и в свежеизолированных мышцах лягушки — мало чем отличаются друг от друга, в том числе и по характеристикам квадрупольного взаимодействия. Они утверждали, что при наличии некоторого количества фиксированных анионов и некоего гипотетического (постулированного оппонентами) градиента электростатического поля, распространяющего свое действие на значительное, не менее 100 Å, расстояние от фиксированных зарядов, свободные ионы Na^+ дадут точно такие же результаты, что представлены мной в табл. 5. С этим я не согласен (опровержение их доводов, основанных на интерпретации времен релаксации T_1 и T_2 ионов Na^+, см. в работе [15, pp. 257–269]).

1. Берендсен и Эдзес решили, что мертвые мышцы не адсорбируют Na^+. Между тем они не привели в пользу такого заключения никаких дополнительных данных, полученных другими методами. А вот у меня такие данные есть. Так, в препарате БНК (рис. 7) в месте рассечения мышцы, там, где клетки сильно повреждены, сутками сохранялось значительное количество адсорбированного Na^+ (рис. 8 и 17), который можно было вытеснить из связи с центрами адсорбции конкурирующими ионами — K^+ или Rb^+, взятыми в достаточно больших концентрациях (см. также обсуждение рис. 56 и 57).

2. Судя по всему, Берендсен и Эдзес не знали о том, что *фиксация* одного из противоионов *усиливает* их ассоциацию (см. раздел 10.1, п. 1). Вместо этого они по старой привычке решили, что весь Na^+ в сульфонатной ионообменной смоле свободен по определению, то есть представлен одной фракцией. Это было допущением опрометчивым, зато полностью соответствующим постулатам теории мембранных насосов и теории ионообменных смол Гарри Грегора [127]. Тем не менее, существующие данные указывают на обратное.

Ионообменная смола Dowex 50 — это разветвленный полистиролсульфонат, 40–50% которого представляет собой твердый полимер. Упрощенной моделью Dowex 50 может служить водный раствор неразветвленного линейного полимера полистиролсульфоната. В таком растворе Na^+ специфичным стеклянным электродом можно легко измерить уровень свободного Na^+. Вычитанием же полученной концентрации свободного Na^+ из общего содержания Na^+ в растворе можно получить количество адсорбированного Na^+. Результаты такого исследования опубликовали Линг и Чжан в 1983 году [478]. Доля адсорбированного Na^+ резко возрастает от почти 30%, когда содержание полимера в растворе составляет всего 1%, до 80%, когда содержание полимера достигает 5%. Поскольку рост количества поперечных связей и плотности фиксированных ионных центров снижает энтропию диссоциации противоионов и тем самым усиливает ассоциацию с ними, данные о столь масштабной адсорбции Na^+ даже неветвящимся полистиролсульфонатом означают, что в Dowex 50 и прочих ионообменных смолах адсорбируется большая часть ионов Na^+.

3. Берендсен и Эдзес решили, что в Dowex 50 и внутри клеток должно существовать слабое анизотропное электростатическое поле, распространяющее свое действие на расстояние *не менее* 100 Å. Но и это утверждение они ничем не подкрепили. Существующие данные, между тем, исключают возможность существования поля с такими характеристиками в конденсированных средах, насыщенных фиксированными и свободными ионами да еще с таким полярным растворителем как вода. Помимо всего прочего, это предположение совершенно излишне, поскольку нет необходимости в электрических полях с радиусом действия в десятки ангстрем. Чтобы вызвать квадрупольное расщепление ЯМР-спектра, вполне достаточно короткодействующего электростатического поля с высокой анизотропией, которое возникает в непосредственной близости от фиксированных зарядов, находящихся в окружении других фиксированных зарядов и свободных ионов. Такой взгляд находит отклик в литературе. Представляя свою теорию уширения квадрупольных линий, физики Бранд и Спикман указывали на неоднородность электростатического поля даже вокруг отдельно взятого единичного заряда [477, p. 115]. К этому следует добавить, что электронная плотность на фиксированных зарядах в клетке может возмущаться еще и различными воздействиями, что также усиливает анизотропию поля. Линдблом выяснил, что анионный центр, связывающий ^{23}Na, создает вокруг его ядра неоднородное электростатическое поле, чем и объясняется квадрупольное расщепление его ЯМР-спектра в системе натрий–лецитин–холат–вода [479]. Таким образом, область существования высокоанизотропного электростатического поля вокруг фиксированного заряда можно оценить радиусом в 4,5 Å [15, p. 264–265], что полностью согласуется с представлениями о сорбционных процессах.

Dowex 50 содержит около 2 моль фиксированных сульфонатных групп на литр смолы, и среднее расстояние между ближайшими анионными зарядами в нем составляет около 7,4 Å [478, p. 257]. В мышце лягушки только миозин предоставляет около 150 ммоль β- и γ-карбоксильных групп на литр волокон, при этом среднее расстояние между ближайшими анионными зарядами можно оценить в 22 Å. Не вызывает сомнений, что неоднородное электростатическое поле вокруг каждого фиксированного аниона способно стать причиной наблюдаемого уширения квадруполя.

Чтобы изгнать последние сомнения в том, что Na^+, поступающий в мышечные волокна лягушки при снижении отношения K^+/Na^+ в среде (или под влиянием уабаина), адсорбируется, я привожу электронно-микроскопическую авторадиограмму распределения ^{22}Na в мышечном волокне лягушки

(панель *a* на рис. 58), в котором большая часть ионов K^+ замещена на Na^+ (меченный изотопом ^{22}Na) при инкубации в растворе с низким содержанием K^+ ($K^+/Na^+ = 5 \times 10^{-3}$; см. также рис. 57). Обратите внимание, как и в случае с мышечными волокнами, нагруженными Cs^+ и Rb^+ (панели *b* и *c* соответственно), и в экспериментах, иллюстрируемых рис. 15, 16 и 18, зерна серебра над местом локализации радиоактивного ^{22}Na выстроены в линии (над А-дисками), а не распределены диффузно по мышечному волокну. Это доказывает, что ^{22}Na, как и K^+, адсорбируется в А-дисках. Таким образом, еще одна независимая группа экспериментов демонстрирует ложность утверждения Берендсена и Эдзеса, что Na^+, поступающий в волокна при обеднении среды K^+, находится в свободном состоянии.

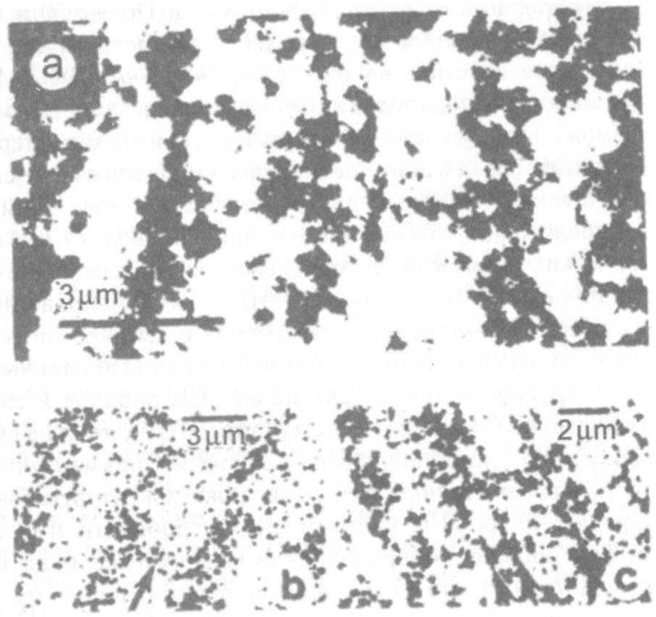


Рис. 58. Электронно-микроскопическая ^{22}Na-авторадиограмма поперечнополосатого мышечного волокна портняжной мышцы лягушки, инкубированного в растворе Рингера с низким содержанием K^+ (отношение $[K^+]/[Na^+]$ было равно 5×10^{-3}; см. также рис. 57); прединкубацию проводили вплоть до установления диффузионного равновесия. Большая часть K^+ в мышечных волокнах замещается в таких условиях на Na^+ (панель *a*). Электронно-микроскопические авторадиограммы тех же волокон, нагруженных соответственно ^{134}Cs (панель *b*) и ^{86}Rb (панель *c*). Стрелкой на панели *b* указана линия из зерен серебра, образовавшаяся над Z-линией под действием радиоактивного Cs^+, локализованного в этой структуре в результате адсорбции. (По Эдельману [126, 1980a и 1986].

Как помнит читатель, адсорбция АТФ кардинальными центрами белка приводит к снижению электронной плотности на всех его β- и γ-карбоксильных группах и карбонильных атомах кислорода полипептидного остова белка. Следовательно, истощение АТФ приводит к обратному изменению электронной плотности и, соответственно, к снижению количества адсорбированного K^+ и связанной белком воды. Сейчас мы увидим, что уабаин вызывает утрату адсорбированного K^+, причем K^+ замещается в местах связывания ионами Na^+, то есть поступивший в клетку Na^+ находится в связанном состоянии. Особенность действия уабаина состоит в том, что при этой замене физическое состояние клеточной воды, а, следовательно, и ее растворяющая способность, не изменяется, поэтому не происходит существенных изменений и в содержании свободного Na^+ в таких клетках по сравнению с интактными.

События такого рода необычны, если вспомнить модель автокооперативных изменений, показанную на рис. 50 и 51. Там мы видели, что изменения электронной плотности на упомянутых группах сопряжены друг с другом. Однако действие уабаина сопровождалось изменением электронной плотности только на β- и γ-карбоксильных группах, карбонильные группы полипептидного остова при этом не затрагивались и они по-прежнему оставались доступными для воды. И не только уабаину свойственно такое своеобразное действие. Другие кардинальные адсорбаты — например, инсулин (см. следующий раздел) и Ca^{2+} — действуют точно так же [107, pp. 172, 177]. В самом деле, мне случалось наблюдать одновременное изменение адсорбции ионов и десорбцию воды лишь при вспышках физиологической активности (например, при рождении потенциала действия, раздел 15.6, п. 2) или при истощении АТФ (раздел 15.1, п. 2). Но мы еще слишком мало знаем, чтобы давать окончательную классификацию эффектов кардинальных адсорбатов.

Однако обратим внимание на различия между этими примерами. Так, при истощении АТФ десорбция связанной воды охватывает всю клетку, а при потенциале действия — лишь тонкий поверхностный слой. Как я покажу ниже, причина, по которой уабаин не вызывает явных изменений в состоянии клеточной воды (как в случае истощения АТФ), может крыться в различии размеров молекул этих веществ.

Чтобы жить, клетка нуждается в поддержании своей воды в связанном структурированном состоянии [107, pp. 177–178], для чего она должна быть заполнена всепроникающей системой белков, выполняющих, как я считаю, роль структурообразователя для клеточной воды. В случае уабаина, из-за больших размеров его молекулы разрушение связанной воды происходит лишь в месте его непосредственного контакта с белком. В мышце это, прежде всего, миозин, который несет, как уже говорилось, около 80% карбоксильных групп, способных связывать K^+ или Na^+ [122]. Но случай с уабаином ставит вопрос о том, что функции связывания ионов и воды могут быть до некоторой степени разделены. Кроме того, уабаин может по-разному взаимодействовать с разными белками. В этой связи упомяну еще два важных момента.

1. Актин, имеющийся в любой клетке и обнаруживаемый практически во всех ее частях и органеллах [544; 545], может служить тем белковым матриксом, который связывает воду. Раз в мышечных волокнах не существует, с одной стороны, свободной воды (раздел 11.2), а на I-диски (состоящие в основном из актина) приходится, с другой стороны, от 30 до 50% объема волокна [180 (1990), Fig. 2.21CA, 11.17A, 1118A], то у нас есть основание возложить ответственность за связанное состояние воды на актин в том его состоянии, в котором он находится I-дисках в покоящейся мышце.

2. Для поддержания белков матрикса в полноразвернутом состоянии, способном связывать большое количество воды, необходима АТФ. Легко представить, что при небольших скоростях процессов,

длящихся часами, как например, на рис. 56, в любой отдельно взятый момент времени концентрация АТФ в любой точке мышечного волокна будет находиться в состоянии диффузионного равновесия. Это может объяснить, почему снижение общего содержания K^+ в мышце лягушки сопряжено на рис. 56 с десорбцией воды, хотя субстратами этих процессов могут быть совсем разные белки — соответственно миозин и актин.

4. Влияние инсулина на распределение D-глюкозы и глицина

При 0 °С метаболизм D-глюкозы в скелетных мышцах североамериканских леопардовых лягушек снижается до неопределяемых значений [427]. Прекращение метаболизма D-глюкозы позволило изучить ее *равновесное распределение* без искажений, которые внесли бы биохимические процессы ее утилизации.

Равновесная концентрация D-глюкозы в мышцах, освобожденных от эндогенного инсулина промыванием при 25 °С, находится в линейной зависимости от ее наружной концентрации (нижняя прямая на рис. 59А) [428]. Это свидетельствует о том, что D-глюкоза в промытых мышцах практически целиком находится в клеточной воде (см. также рис. 26 и 27).

Добавление инсулина при 0 °С повышает поглощение D-глюкозы лишь в том случае, если мышцы *предварительно инкубировали* в растворе Рингера при более высокой температуре (например, 25 °С), содержащем и инсулин (например, 0,1 ед/мл), и *затравку* (праймер) (например, 24 мМ D-глюкозы или D-ксилозы). Только после этого инкубация с инсулином при 0 °С в растворах с различным содержанием меченой D-глюкозы (в ряде случаев содержавших также и немеченую D-глюкозу) ведет к накоплению *дополнительного* количества меченой D-глюкозы (три верхние кривые на рис. 59А). На рис. 59В представлена зависимость количества адсорбированной в мышечных волокнах меченой D-глюкозы (после вычитания свободной фракции) от концентрации глюкозы в среде (в обратных величинах). Полученные сходящиеся прямые характерны для изотермы адсорбции Ленгмюра и схожи с приведенными ранее зависимостями для адсорбированного K^+ и Cs^+ (рис. 12 и 13). Зависимости такого рода указывают на то, что дополнительное количество D-глюкозы, которое поступило в волокна под влиянием инсулина, находится в них в адсорбированном состоянии. Сравнивая состояние D-глюкозы в волокнах, свободных от инсулина, с волокнами, обработанными инсулином с затравкой, видим, что инсулин индуцирует связывание сахара.

Мы исходим из того, что инсулин играет роль *кардинального адсорбата*, вызывающего *автокооперативное* изменение конформации какого-то белка (белков) в клетке [423]. Однако такая перестройка проходит легко лишь при высоких температурах и в присутствии достаточной концентрации соответствующего *праймера. После связывания инсулина с регуляторным кардинальным цен-*

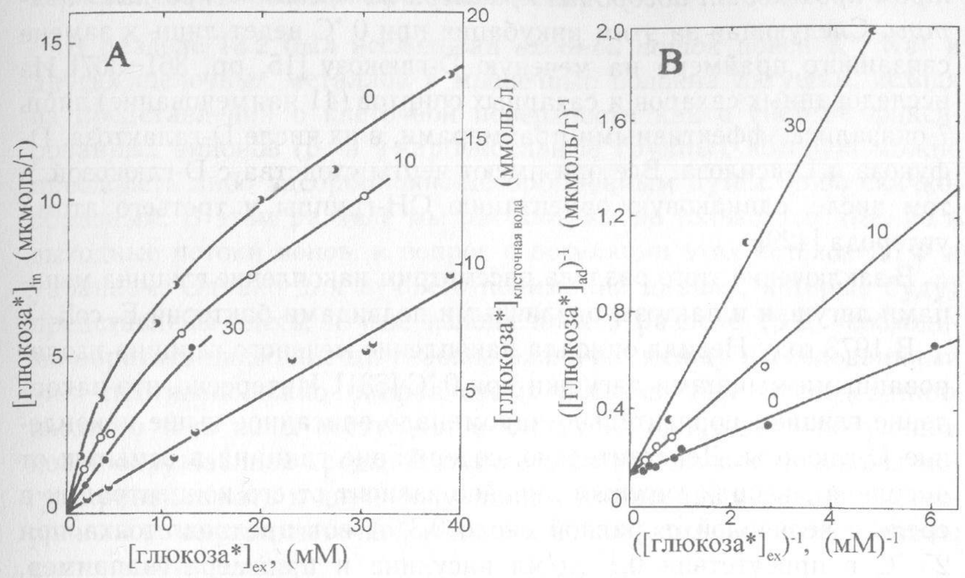


Рис. 59. Влияние инсулина на равновесное распределение меченой D-глюкозы при 0 °С между мышцами лягушки и средой. Во всех опытах использованы мышцы, предварительно отмытые от инсулина. А. Различные изолированные мелкие мышцы лягушки инкубировали при постоянном помешивании в растворе Рингера, содержавшем D-глюкозу в различных концентрациях без инсулина (нижняя группа точек) либо с инсулином (0,1 ед/мл) — три верхние кривые. В последних трех случаях мышцы проходили предподготовку — инкубацию при 25 °С в течение 6 ч. в растворе Рингера, содержавшем 24 мМ D-глюкозы (в качестве затравки или праймера) и инсулин (0,1 ед/мл). После предподготовки мышцы в течение ночи инкубировали при 0 °С в растворе Рингера с различным содержанием меченой D-глюкозы и фиксированным количеством немеченой D-глюкозы: верхняя кривая — только меченая D-глюкоза; следующая кривая — вариация меченой D-глюкозы на фоне 10 мМ немеченой D-глюкозы; третья сверху кривая — вариация меченой D-глюкозы на фоне 30 мМ немеченой D-глюкозы. После инкубации с меткой мышцы переносили в 0,1 н раствор HCl и прогревали на кипящей водяной бане в течение 20 минут. Затем измеряли радиоактивность полученных мышечных экстрактов в β-сцинтилляционном счетчике. В. Данные, полученные на основе трех верхних кривых на панели А, из которых была вычтена свободная (не связанная) фракция D-глюкозы, представленная нижней линейной зависимостью. Таким образом, был определен размер связанной фракции D-глюкозы для каждой мышцы. Далее были вычислены обратные величины для связанной фракции D-глюкозы и для соответствующей концентрации D-глюкозы в среде (обратные величины нужны для использования уравнения А11 приложения). Схождение всех трех прямых в одной точке при нулевом значении на оси абсцисс и различия в их наклоне, обусловленные конкуренцией немеченой D-глюкозы с меченой, свидетельствуют о том, что адсорбция D-глюкозы проходит по законам Ленгмюра. Линейный характер нижней зависимости на панели А означает, что в отсутствие инсулина вся или почти вся D-глюкоза остается свободной в виде раствора в клеточной воде с величиной q, равной 0,25 ± 0,01 (среднее значение и стандартная ошибка из 11 групп данных). Данные этих опытов позволяют рассчитать общее количество адсорбирующих D-глюкозу центров в мышечных клетках, обработанных инсулином. Оно колеблется от 7,7 до 12,5 мкмоль/г сырого веса. Среднее значение и стандартная ошибка констант адсорбции D-глюкозы на основе анализа восьми групп данных составляет 124 ± 6,6 (моль/кг)$^{-1}$. Звездочка — напоминание о том, что приведенные данные относятся только к меченой глюкозе. (По Лингу и Уилл [428]).

тром происходит адсорбция праймера на прежде «скрытые» центры. Следующая за этим инкубация при 0 °С ведет лишь к замене связанного праймера на меченую D-глюкозу [15, pp. 361–367]. Из исследованных сахаров и сахарных спиртов (41 наименование) лишь 7 оказались эффективными праймерами, в их числе D-галактоза, D-фукоза и D-ксилоза. Все они имеют черты сходства с D-глюкозой, в том числе, одинаковую ориентацию ОН-группы у третьего атома углерода [429].

В заключение этого раздела рассмотрим накопление глицина мышцами лягушки и лактозы различными подвидами бактерий E. coli.

В 1973 году Невилл описала накопление меченого глицина изолированными мышцами лягушки при 0 °С [331]. Интересно, что накопление глицина поразительно напоминало описанное выше накопление D-глюкозы. Действительно, содержание глицина в отмытых от инсулина мышцах лягушки линейно зависит от его концентрации в среде с величиной q, равной около 0,3. А вот предподготовка при 25 °С в присутствии 0,1 ед/мл инсулина и праймера (например, немеченого глицина [542, p. 555]) влечет за собой дополнительное поглощение меченого глицина при инкубации при 0 °С, причем это дополнительное количество глицина, поступившее в клетку, находится в ней в связанном состоянии.

Если инкубировать E. coli дикого типа в безглюкозной среде, содержащей лактозу, микроб приобретает способность аккумулировать и расщеплять лактозу. Это объясняется тем, что лактоза действует как *индуктор трех генов*, образующих вместе так называемый *lac-оперон* [456]. Входящий в их число у-ген отвечает за выработку белка, называемого *лактозной пермеазой*, который рассматривается в настоящее время как *лактозный насос*, закачивающий лактозу в бактерию с затратой энергии. Однако серьезные противоречия, с которыми столкнулась теория мембранных насосов (глава 12), заставляют искать другое объяснение работе пермеаз.

Согласно нашему объяснению, лактозная пермеаза — это инсулиноподобный *кардинальный адсорбат* или гормон [480; 15, p. 371]. Так же, как и инсулин, пермеаза может вызывать изменение конформации определенного клеточного белка или белков, открывая тем самым «скрытые» центры для адсорбции лактозы и других галактозидов. Эта модель подкреплена рядом фактов.

Кроме того, если лактозная *пермеаза* действительно является *насосом*, то ее место — в клеточной мембране, на границе между клеткой и средой. По логике мембранной теории, такому насосу нечего делать внутри клетки. С другой стороны, если лактозная пермеаза — инсулиноподобный гормон, она может выполнять свою работу в любом месте клетки. Так вот, Колбер и Стейн не смогли найти лактозную пермеазу в мембранной фракции гомогената E. Coli. Ее удалось обнаружить только в цитоплазматической фракции [430, p. 694; 15, p. 374].

15.2. Регуляция ионной проницаемости

В разделе 13.2 был исследован *входной поток* ионов K^+, Na^+ и других щелочных металлов в мышечные волокна лягушки, исходя из представлений о клеточной поверхности как о системе фиксированных анионов (β- и γ-карбоксильные группы), которую можно преодолеть либо адсорбционно-десорбционным путем, либо скачкообразным. В этом разделе мы рассмотрим не только входные, но и выходные потоки ионов, и вопрос о регуляции этих потоков АТФ и уабаином. Однако для лучшего понимания данных, которые будут представлены здесь, и уже изложенных в разделе 13.2, необходимо обратить внимание на главное различие между исследованиями этих противоположно направленных потоков. При исследованиях входного тока ионы поступают в клетку из однородной популяции ионов окружающей среды. В случае с выходным потоком ионы могут принадлежать к двум популяциям: к свободным ионам, растворенным во внутриклеточной воде, и к ионам, которые были связаны клеточными белками.

1. Выход ионов Na^+ из интактных мышечных волокон и волокон, обработанных иодуксусной кислотой

Вскоре после появления в исследовательских лабораториях радиоактивных изотопов натрия Леви и Уссинг провели прямые измерения выхода Na^+ из изолированных портняжных мышц лягушки [268]. Мышцы, нагруженные радиоактивным ^{24}Na они помещали в поток раствора Рингера и регистрировали изменение радиоактивности мышц по мере вымывания радиоактивной метки. Построив график зависимости уровня меченого Na^+ в мышце (в логарифмической шкале) от длительности промывания (t), они обнаружили, что полученная кривая представлена двумя линейными участками, один из которых соответствовал быстрому, другой — медленному выходу катиона (аналогичные кривые приведены на рис. 60).

В этой же работе Леви и Уссинг сделали весьма логичное, на первый взгляд, предположение: они приписали быструю часть кривой выходу меченого Na^+ из внеклеточного пространства, а медленную часть — выходу меченого Na^+ из волокон. Однако они обратили внимание на то, что для объяснения размера быстрой фракции Na^+ необходимо было приписать межклеточному пространству гораздо больший объем (около 30%), чем принятые тогда 13% от объема мышцы [44] (по современным оценкам, он еще меньше — всего 9,2%, см. главу 9). Неопределенность, связанную с наличием межклеточного пространства, можно исключить, если исследовать выход Na^+ не из ткани, а из *одиночных* мышечных волокон (тонкий слой поверхностной жидкости, смачивающий волокно и содержащий внеклеточную радиоактивную метку, быстро смывается).

Первыми такое исследование предприняли Ходжкин и Горович [489]. В 1959 году при помощи счетчика Гейгера они показали, что

динамика выхода Na^+ из одиночного мышечного волокна обнаруживает только одну фракцию внутриклеточного Na^+ — медленную, как на рис. 60. Это явно свидетельствовало в пользу выдвинутого одинадцатью годами раньше предположения Леви и Уссинга о том, что внутриклеточный Na^+ представлен медленной фракцией. Однако Ходжкин и Горович не могли не отметить то важное обстоятельство, что их метод позволял начинать достоверное измерение радиоактивности волокна лишь через 10 (!) минут после начала промывания, а интервалы между измерениями в последующем не могли быть меньше 5 мин.

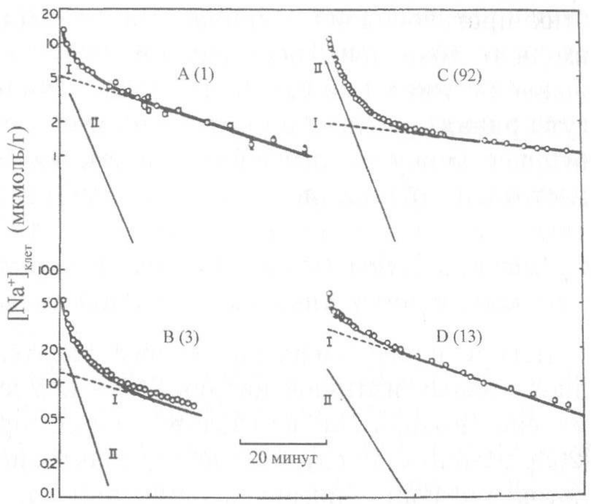


Рис. 60. Скорость выхода меченого Na^+ из одиночного мышечного волокна и из небольших пучков мышечных волокон (количество волокон в каждом препарате указано в скобках). Метку вымывали обычным раствором Рингера при 25 °С, а в случае образца В — при 0 °С. Полученные данные приведены в мкмолях/г сырого веса мышц. Сделана поправка: вычтен 5%-ный вклад соединительнотканных элементов, рассчитанный на основе данных о выходе ^{22}Na из 4 образцов соединительной ткани, взятых у 4 лягушек и нагруженных меткой в тех же условиях, что и мышцы. (По Лингу [517]).

Но технология измерения радиоактивности развивалась стремительно. Еще за три года до выхода статьи Ходжкина и Горовича Линг и Шмолинске сообщили, что α-сцинтилляционный счетчик колодезного типа гораздо совершеннее других методов и позволяет снимать временные развертки со значительно большим разрешением [490] (схему прибора см. в работах [49, p. 174] и [222, p. 785]). С его помощью я исследовал выход Na^+ из отдельных мышечных волокон (и небольших пучков) и имел возможность начинать измерения уже в первые секунды (!) после начала промывания, а интервалы между отдельными замерами могли составлять меньше минуты [517], как это видно на рис. 60.

Применение этого, более совершенного метода, показало, что выход Na^+ из одиночных волокон, пучков волокон и целых портняжных мышц (данные Леви и Уссинга) подчиняется одному и тому же закону. Как показано на рис. 60, в кривых выхода Na^+ из одиночных волокон и пучков также можно выделить быструю фракцию ионов (II) и медленную (I), несмотря на то, что в этом случае уже не приходится говорить о вкладе межклеточного пространства. Если убрать из кривых на рис. 60 все точки, полученные до десятой минуты опыта, а оставшиеся разрядить так, чтобы остались только

пятиминутные интервалы, то мы получим идеальное совпадение с результатами опытов Ходжкина и Горовича и, соответственно, еще раз убедимся в неправомерности рассуждений Леви и Уссинга. Таким образом, заключение Ходжкина и Горовича и вывод Леви и Уссинга о том, что внутриклеточное происхождение имеет только медленная фракция Na^+, является неверным [517; 131, p. 18].

Кстати, мои опыты с выходом Na^+ из одиночных мышечных волокон и пучков волокон объясняют происхождение того избыточного количества быстрого Na^+, обнаруженного Леви и Уссингом, которое «не вмещалось» в межклеточное пространство портняжных мышц.

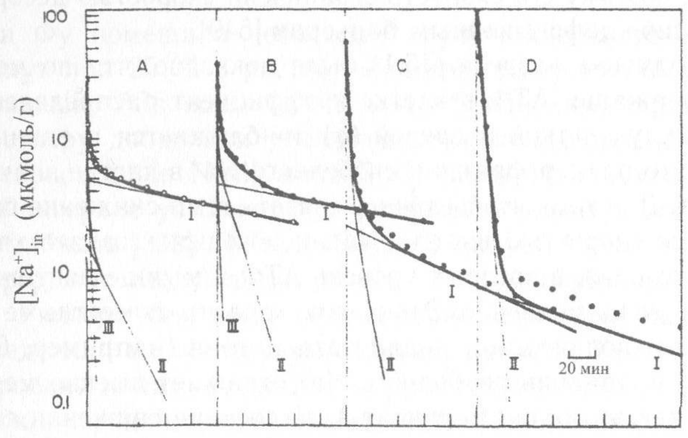


Рис. 61. Выход меченого Na^+ из портняжной мышцы лягушки, гибнущей под действием иодацетата натрия (0,05 мМ), метаболического яда, снижающего содержание АТФ в клетке (последовательность кривых отражает возрастающую степень отравления). Одна и та же мышца несколько раз проходила следующие циклы обработки: нагрузка меченым Na^+ — выход метки в раствор Рингера, содержащим иодацетат натрия. Кривая А — результат первого вымывания метки, В — второго и т. д. Жирными линиями показан закон выхода метки во времени, рассчитанный на основе экспериментальных данных (внесена поправка на вклад *соединительнотканных элементов*; образцы соединительной ткани подвергались таким же экспериментальным процедурам, что и мышцы). В выходных потоках Na^+ были выделены медленная (I) и быстрая (II) фракции (в некоторых случаях из быстрой фракции выделялась третья, сверхбыстрая фракция — III). Обратите внимание, что экспериментальные точки медленной фракции сначала не меняют своего положения (А, В), а затем уходят вниз (С, D). Видно, что по мере отравления увеличивается размер именно быстрой фракции, обозначенной цифрой II или II+III (быстрая + сверхбыстрая). (По Лингу и сотр. [307]).

Ответ простой: быстрая фракция, вымываемая из мышцы, является *суммой двух потоков* — из межклеточного пространства и из самих клеток. И еще один важный вывод: *истинную проницаемость клетки для ионов Na^+ характеризует именно быстрая фракция выходного потока внутриклеточного Na^+, а не медленная.* Увы, этот вывод, один из ключевых для физиологии клетки, не был сделан и не мог быть сделан моими оппонентами из-за несовершенства

методов, которыми они пользовались, и в силу своей теоретической предвзятости.

Истинная скорость выхода Na^+ на целый порядок выше принятой в литературе, потому что для ее определения все ошибочно опираются на измерения скорости выхода только медленной фракции. Фактическое *время полуобмена* Na^+ ($t_{1/2}$) при 25 °С, по данным 21 независимого измерения скорости выхода быстрой фракции, составляет 3,3 ± 0,21 мин. в противоположность 34 мин., полученным Леви и Уссингом при исследовании медленной фракции при 20 °С [268]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что медленная фракция представляет собой поток Na^+, находившегося в клетке в связанном состоянии, поэтому его скорость ограничена скоростью десорбции, а не каким-либо диффузионным барьером [549].

В предыдущем разделе (15.1) было показано, что по мере снижения содержания АТФ в клетке коэффициент распределения Na^+ (и Cl^-) между клеткой и средой (q) приближается к единице. Это означает, что размер фракции свободного Na^+ в клетке значительно возрастает. Для того, чтобы точнее связать темп снижения содержаний АТФ со скоростью выхода Na^+, необходимо создать квазиравновесные условия, в которых уровень АТФ в мышце лягушки будет снижаться очень медленно. Это можно сделать, поместив ее в среду с небольшим количеством иодацетата натрия (например, 0,2 мМ). Если размер фракции свободного Na^+ отражает именно медленная фракция (как это принято считать), то по мере снижения содержания АТФ размер этой фракции должен возрастать вплоть до самой гибели клетки, когда количество вышедшего меченого Na^+ станет равным количеству вошедшей в клетку метки во время процедуры нагрузки. Если верно обратное, и количество свободного Na^+ в клетке отражает только быстрая фракция, то тогда, по мере истощения АТФ, должен возрастать размер (протяженность на графике) только этой фракции.

На рис. 61 видно, что по мере отравляющего действия иодацетата натрия (0,2 мМ) растет размер быстрой фракции меченого Na^+. Ход процесса отражает разбавление метки в системе клетка/омывающий раствор [49; 307]. Данные экспериментов, представленных на рис. 60 и 61, в совокупности свидетельствуют о том, что именно быстрая фракция характеризует истинную скорость обмена свободного внутриклеточного Na^+ на Na^+ внеклеточной среды и, соответственно, проницаемость клетки для этого катиона.

Как было показано выше, обработка иодацетатом натрия (0,2 мМ) влечет за собой постепенное падение уровня АТФ в мышцах (рис. 56). Если вода на поверхности клетки и в толще цитоплазмы десорбируется при падении уровня АТФ (см. раздел 15.1, п. 2), то скорость выхода Na^+ должна возрастать и становиться все больше по мере развития ингибирующего действия токсина (о максимальной скорости выхода судят по углу наклона участка кривой в самом начале выхода быстрой фракции — фракции II, и с увеличением скорости выхода угол наклона должен возрастать). Это предсказание теории АИ оправдывается в эксперименте — скорость выхода Na^+ при отравлении в самом деле постепенно растет (см. рис. 61). Это наблюдение также согласуется с выводом, сделанным из опытов с входным потоком Na^+: вход в клетку примерно половины ионов происходит через поляризованную воду, являющуюся диффузионным барьером (рис. 35 и 37), и этот барьер по мере истощения АТФ постепенно ослабевает и в клетке, и на ее поверхности (рис. 56).

2. Влияние уабаина на силу связывания ионов щелочных металлов с фиксированными анионными центрами на поверхности клетки

Линг и Фу помещали небольшие группы яйцеклеток лягушки на 13 минут при 25 °С в раствор Рингера, содержащий меченные радиоактивным ^{134}Cs ионы Cs^+ (2 мМ). В одних экспериментах к этому раствору добавляли дополнительное количество конкурирующих катионов: либо NaCl, либо RbCl (20 мМ); в других — либо раствор Рингера с уабаином (до конечной концентрации 10^{-6} М), либо без уабаина [398]. По истечении 13 минут яйцеклетки промывали непрерывно следующими друг за другом порциями обычного раствора Рингера без метки и в определенные промежутки времени определяли их остаточную радиоактивность. Таким образом, регистрировали динамику снижения уровня меченого Cs^+ в группах яйцеклеток и строили соответствующий график зависимости от длительности промывания (см. рис. 62). Чтобы не увязнуть в цифрах, сосредоточимся на исходной концентрации меченого Cs^+ в клетках (при длительности промывания 0 мин.), которая достигается как раз к концу 13-й минуты процедуры нагрузки яйцеклеток меткой; количество вошедшего к этой минуте в клетку Cs^+ (с меткой) определяется скоростью входного потока Cs^+.

Теперь рассмотрим рис. 62 внимательней. При нагрузке контрольных яйцеклеток мечеными ионами Cs^+ были использованы два конкурирующих с цезием катиона — Na^+ (панель А) и Rb^+ (панель В). Хорошо видно, что стартовое содержание Cs^+ в яйцеклетках в 4–5 раз выше в том опыте, где в качестве конкурента выступали ионы Na^+. Значит, ионы Rb^+ сильнее, чем Na^+, препятствуют поглощению Cs^+ по механизму адсорбционно-десорбционной диффузии, что соответствует приведенному выше ряду $Rb^+ > K^+ > Cs^+ > Li^+ > Na^+$, выстроенному в порядке убывания коэффициента равновесного распределения катиона между мышцами лягушки в состоянии покоя и средой. Этот ряд свидетельствует о том, что поверхностные β- и γ-карбоксильные группы нормальных мышечных волокон и яйцеклеток в состоянии покоя обладают низкой величиной c, равной приблизительно −4,20 Å (то есть низкой плотностью электронов), при которой связывается преимущественно K^+, а не Na^+.

После обработки уабаином картина резко меняется. При нагрузке меченым Cs^+ яйцеклеток, обработанных уабаином, его вошло

больше при конкуренции со стороны Rb^+ (панель B), чем со стороны Na^+ (см. стартовое содержание метки). Это означает, что конкуренция со стороны Na^+ значительно усилилась после обработки яйцеклеток уабаином: экспериментальная кривая на панели A лежит под контрольной. На панели B, где конкурирующим ионом был Rb^+, произошло прямо противоположное: обработка уабаином резко *усилила* поглощение меченого Cs^+, указывая на значительное ослабление некогда мощного блокирующего действия Rb^+.

Влияние уабаина на конкурентоспособность Na^+ (возрастает) и Rb^+ (снижается) по отношению к Cs^+ согласуется с изменением по-

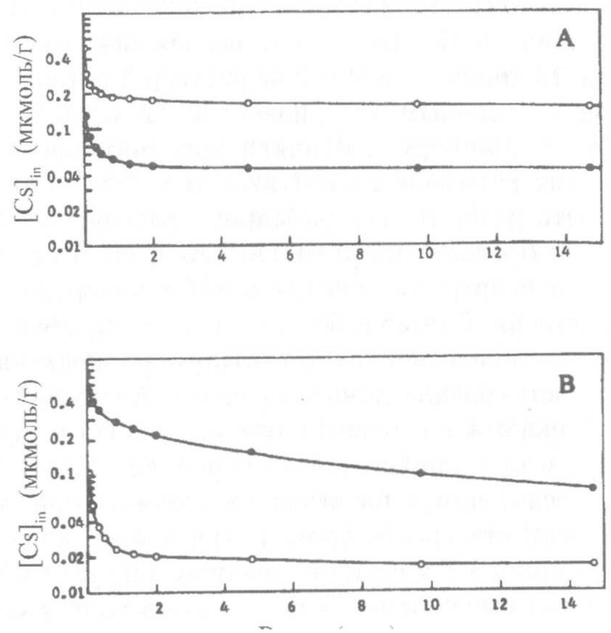


Рис. 62. Выходные потоки меченого Cs^+ из небольших групп яйцеклеток лягушки и влияние на них уабаина и конкурирующих катионов. Яйцеклетки лягушки инкубировали в течение 4,5 ч. при 25 °C в растворе Рингера в присутствии 10^{-6} M уабаина или без него. После осторожного удаления избытка раствора яйцеклетки переносили в раствор Рингера с 2,0 мМ меченого Cs^+ и 20 мМ конкурирующих немеченых ионов щелочных металлов для инкубации при 25 °C в течение 13 мин. После удаления избытка раствора яйцеклетки непрерывно промывали последовательными порциями нормального раствора Рингера для вымывания меченого Cs^+. Определяли остаточную радиоактивность яйцеклеток и радиоактивность в порциях промывочного раствора (для контроля за размером радиоактивной фракции). Контрольные яйцеклетки — светлые кружки (единственное отличие от опытных в том, что они не обрабатывались уабаином); обработанные уабаином — темные кружки. A — выходной поток метки из клеток, нагружавшихся меченым Cs^+ в присутствии Na^+ (20 мМ). B — выходной поток метки из клеток, нагружавшихся меченым Cs^+ в присутствии Rb^+ (20 мМ). (По Лингу и Фу [398]).

рядка следования катионов в ряду $K^+ > Li^+ > Cs^+ > Rb^+ > Na^+$, выстроенном по мере убывания энергии адсорбции (или селективности) этих катионов β- и γ-карбоксильными группами цитоплазмы мышечных волокон лягушки, свойства которых изменились под действием уабаина (ср. с приведенным выше рядом). Несмотря на то, что положение Na^+ в этих рядах осталось тем же, изменилась под действием уабаина *относительная селективность* связывающих центров к Cs^+, с одной стороны, и к Na^+ и Rb^+, с другой: сродство к Na^+ значительно возросло, а к Rb^+ — сильно снизилось; сродство к Cs^+ возросло, но незначительно. В целом, уабаин привел к выраженному *сближению* селективностей связывающих центров по отношению к рассматриваемым катионам [107, Fig. 8.12], и именно в

этом следует искать причину наблюдаемых эффектов. Полученные данные подтверждают, что величина *c* β- и γ-карбоксильных групп, локализованных как в цитоплазме рассматриваемых клеток, так и на их поверхности, под влиянием уабаина как электронодонорного кардинального адсорбата возрастает с −4,20 Å до приблизительно −3,25 Å, то есть плотность электронов на указанных карбоксильных группах повышается.

15.3. Набухание интактных и поврежденных клеток под влиянием солей

1. Набухание клеток в изотоническом растворе KCl

Говоря о явлении плазмолиза в разделе 4.1, п. 2, я обратил ваше внимание на необычное явление: несмотря на то, что центральная вакуоль зрелых растительных клеток при высоких концентрациях электролитов в окружающей среде сжимается, окружающая эту вакуоль протоплазма может, наоборот, набухать [32].

В изотоническом (для холоднокровных) растворе NaCl концентрацией 0,7% (или 0,120 М) мышечные волокна лягушки способны неопределенно долго поддерживать свой нормальный объем (разделы 4.1, п. 2 и 3). Интересно, что влияние изотонического раствора KCl совершенно другое. Мартин Фишер [78] и фон Корози [196] около 100 лет тому назад сообщали о выраженном набухании мышц лягушки в растворе KCl концентрацией 0,118 М. При этом и осмотическое давление, и давление пара над растворами 0,118 М KCl и 0,120 М NaCl практически одинаковы. Если оба эти катиона в клетке свободны, то почему они так по-разному влияют на ее объем?

Чтобы доказать, что набухание мышечных волокон в изотоническом растворе KCl обусловлено свойствами протоплазмы, а не клеточной мембраны (ее проницаемостью или непроницаемостью к разным катионам), Мартин Фишер продемонстрировал набухание в растворе KCl таких моделей как фибрин и желатин, когда и речи не могло идти о каких-либо мембранах [78; 546]. Линг и Уолтон [296], а также Линг и Райт [107, p. 263] подтвердили данные Фишера и наблюдали, в свою очередь, набухание в растворе KCl сегментов длиной 2–4 мм, иссеченных из мышц лягушки, мембрана на срезах которых, как мы помним, не восстанавливается (раздел 4.1, п. 4).

В 1962 году Линг предложил объяснение набухания клеток в растворе KCl [98, p. 249; 107, p. 262]:

$$\underset{\text{сжатие}}{f^-f^+ + X^+ + Y^-} \Leftrightarrow \underset{\text{набухание}}{f^-X^+ + f^+Y^-}, \qquad (4)$$

где f^- и f^+ — соответственно фиксированный анион (например, β- или γ-карбоксильная группа) и фиксированный катион (например, ε-аминогруппа или гуанидиновая группа), а X^+ и Y^- — соответственно свободный катион (например, K^+) и свободный анион (на-

пример, Cl^-). В основе этого объяснения лежит одно из основных положений теории АИ о способности белков в развернутой конформации связывать воду в многослойные организованные структуры, причем набухание рассматривается как результат наращивания количества слоев воды вокруг белков. Этот процесс сдерживают солевые связи ($f^- f^+$), как внутри-, так и межмолекулярные, о чем мы говорили в разделе 11.3, п. 7.2. Если добавить нужную соль в достаточной концентрации, часть солевых связей диссоциирует, что и иллюстрирует уравнение (4). При этом длина доступного воде полипептидного остова увеличивается, возрастает и количество адсорбированной воды; с увеличением объема такой кооперативной структуры, как связанная вода, увеличивается и количество слоев из молекул воды вокруг белка, водные «шубы» соседних белков сливаются. Эти изменения продолжаются до установления нового равновесного объема. С добавлением еще одной порции такой соли вновь инициируются данные изменения, и клетка набухает еще больше.

Кроме того, согласно теории АИ, в мышечных волокнах в состоянии покоя, когда АТФ и ее «помощники» находятся в достаточном количестве и в связанном состоянии (рис. 44), электронная плотность на β- и γ-карбоксильных группах поддерживается на постоянном, относительно низком уровне (значение величины *c* около −4,20 Å), и в том числе тех, которые участвуют в образовании солевых связей. Это как раз та область значений электронной плотности, когда предпочтительнее адсорбируются ионы K^+ и некоторые фиксированные катионы (сходные по свойствам с NH_4^+, рис. 42, раздел 15.1, п. 3). В условиях высокого уровня KCl солевые связи в мышечных волокнах разрываются, что и влечет за собой набухание клеток. При указанной величине *c* ионы Na^+ адсорбируются этими же β- и γ-карбоксильными группами гораздо слабее. Поэтому раствор NaCl той же концентрации не вызывает значимого набухания клеток. Сказанное справедливо, повторюсь, для покоящихся интактных мышц.

(Уравнение для расчета клеточного объема в концентрированных растворах солей было выведено Лингом и Питерсоном в 1973 году [198], но здесь не приводится. Оно основано на фундаментальном уравнении Фримена Коупа [141]).

2. Набухание клеток в изотоническом растворе NaCl при их повреждении

Каждому ребенку известно, что повреждение вызывает отек тканей. Теория АИ предлагает возможное объяснение этого патофизиологического явления.

По моему убеждению, механизм набухания при повреждении схож с набуханием в растворе KCl и раскрывается уже знакомым нам уравнением (4) с тем отличием, что в этом случае роль омывающего раствора играет тканевая жидкость, а под символами $X^+ Y^-$ скрывается NaCl тканевой жидкости. Тут вы можете спросить: как

этот безобидный, даже жизненно необходимый NaCl, имеющийся во всех жидкостях организма, может вызывать набухание поврежденной ткани, если со здоровой тканью этого не происходит?

Ответ кроется в том, что за поддержание в здоровых клетках *низкой* электронной плотности (низкой величины *c*) на β- и γ-карбоксильных группах ответственна АТФ (рис. 44). Поскольку АТФ — *электроноакцепторный кардинальный адсорбат* (ЭАКА) (см. разделы 14.3, п. 4 и 15.1, п. 2), ее утрата при повреждении клетки влечет за собой *увеличение* электронной плотности на всех β- и γ-карбоксильных группах всех (в конечном счете) белков клетки, что приводит к изменению их свойств. В результате их сродство к Na^+ возрастает (рис. 42) и он начинает разрывать солевые связи между фиксированными зарядами. Потому NaCl, в обычных условиях безобидный, приобретает свойство изотонического раствора KCl — вызывает набухание клеток.

Дальнейшее падение уровня АТФ ведет к дальнейшему росту электронной плотности на β- и γ-карбоксильных группах, и если первоначальное увеличение электронной плотности привело к инверсии сродства от фиксированного катиона к Na^+, то теперь сродство β- и γ-карбоксильных групп к фиксированным катионам становится больше, чем к Na^+; солевые связи между фиксированными зарядами снова начинают образовываться, а их количество — расти [107, pp. 127–128]. С другой стороны, снижение уровня АТФ ведет ко все более масштабной десорбции связанной воды, к разрушению многослойной водной оболочки вокруг белковых молекул (см. также раздел 10.1, п. 2). Увеличение в клетке доли свободной воды также способствует образованию солевых связей между фиксированными зарядами. Это объясняется тем, что свободная вода лучше растворяет ионы K^+ к Na^+, то есть коэффициент распределения K^+ и Na^+ между клеткой и средой растет, соответственно растет концентрация этих катионов в клетке. В таких условиях период времени, в течение которого данный ион Na^+ находится в связанном состоянии, уменьшается (конкурирующих катионов стало больше), а вероятность образования солевых связей между β- и γ-карбоксильными группами и фиксированными катионами соответственно возрастает. Когда я говорю: «падение уровня АТФ ведет к дальнейшему росту электронной плотности на β- и γ-карбоксильных группах», то рост электронной плотности выглядит как постепенный (градуальный) процесс, а не как автокооперативный, развивающийся по закону «все или ничего» (рис. 44). Это говорится для простоты изложения. В действительности, реакция целой клетки — это статистический итог множества превращений на молекулярном уровне. Кроме того, взаимодействие нескольких кардинальных адсорбатов и взаимовлияние элементов белкового матрикса могут сглаживать автокооперативный переход.

В поддержку приведенного объяснения, Линг и Квон показали, что для появления отека необходимо, чтобы в омывающем растворе присутствовали ионы и Na^+, и Cl^- [199]. Если же в растворе Рингера весь NaCl заменить изоосмотическим количеством сахарозы или даже $MgSO_4$, набухания не происходит [107, pp. 266–271] (рис. 63).

При прочих равных условиях степень набухания клеток в присутствии NaCl в физиологических концентрациях обратно пропор-

циональна уровню АТФ. Чем ниже уровень АТФ, тем сильнее набухание [199; 107, p. 267] (рис. 64). Это еще раз подтверждает, что толчком к набуханию поврежденной клетки служит снижение уровня АТФ.

В 1969 году Саладино с сотр. наблюдали аналогичное Na^+-зависимое набухание в клетках мочевого пузыря жабы, обработанных амфотерицином В [457]. Если же NaCl в растворе Рингера заменяли соответствующим количеством сахарозы, эти клетки не набухали. Позднее сходные наблюдения были сделаны Накао и его сотрудниками на эритроцитах человека в физиологическом растворе с высо-

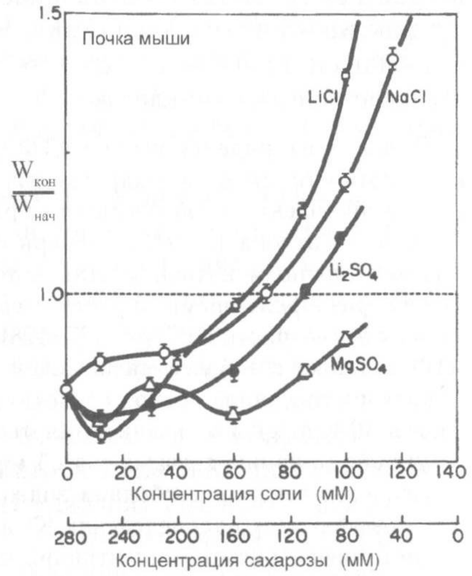


Рис. 63. Изменение массы почек мыши в долях от их массы в физиологических условиях (ось ординат) в ответ на охлаждение до 4 °С в зависимости от концентрации солей в физиологическом растворе (ось абсцисс). Для поддержания изоосмотичности в раствор Рингера для теплокровных добавляли сахарозу (например, 60 мМ NaCl + 160 мМ сахарозы; см. дополнительную шкалу для сахарозы). Результаты показывают, что в присутствии ионов Na^+ и Cl^- набухание наиболее выражено, однако LiCl еще более эффективен в этом отношении. (По Лингу и Квон [199]).

ким уровнем Na^+ и с добавлением метаболического яда NaF [525]. Когда уровень АТФ в эритроцитах падал до 0,1 мМ и ниже, их форма из обычного двояковогнутого диска становилась сферической.

Приведенные данные независимых исследований дополняют друг друга и взятые вместе свидетельствуют в пользу механизма набухания поврежденных клеток, предлагаемого теорией АИ. Кроме того, обсуждение этих данных показывает, что одно из основных положений теории АИ о том, что главный кардинальный адсорбат (АТФ) — это ЭАКА, служит удобным инструментом для интерпретации наблюдаемых явлений: снижение уровня АТФ влечет за собой рост электронной плотности на фиксированных анионах клеточных белков с переключением их селективности с K^+ на Na^+ и далее — на фиксированные катионы.

15.4. Истинный активный транспорт через бифациальные эпителиальные слои и другие бифациальные системы

Морфологически клетки можно разделить на две группы. К одной из них, наиболее многочисленной, можно отнести клетки мышечные

и нервные, эритроциты, а также бактерии, например E. coli. Их отличительной особенностью является одинаковое строение поверхности, или мембраны, с какой бы стороны клетки она ни находилась. Поэтому такие клетки названы *унифациальными* [15, pp. 585–586].

Ко второй группе относятся в основном клетки, образующие прочные пласты (эпителии), которые отделяют внутреннюю среду многоклеточного организма или органа от внешней среды. Примерами могут служить кожа лягушки, эпителий кишечника или почечных

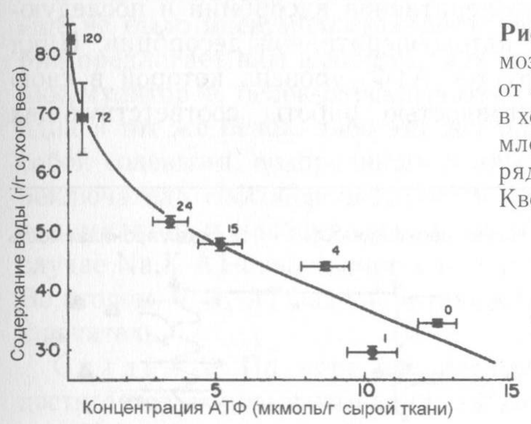


Рис. 64. Зависимость содержания воды в набухающе мозге мыши (среднее значение и стандартное отклонени от среднего) от уровня АТФ в ткани. Время инкубаци в холодном (4 °С) бескислородном растворе Рингера дл млекопитающих варьировали (время в часах указан рядом с экспериментальными точками). (По Лингу Квону [199]).

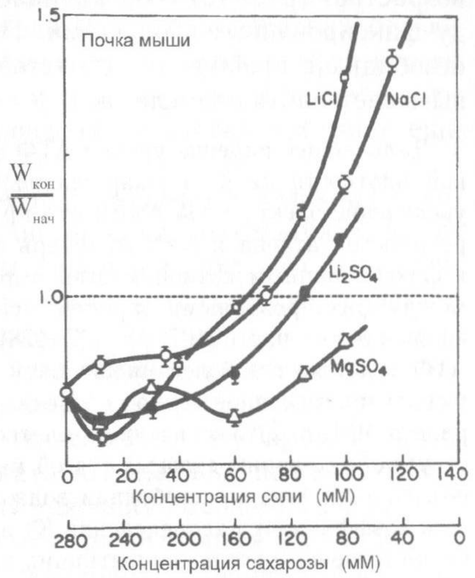
канальцев. Как правило, у таких клеток мембрана, обращенная во внешнюю среду, отличается от обращенной внутрь. Поэтому такие клетки названы *бифациальными* [15, pp. 585–586].

Кроме эпителиальных, существует и другой вид бифациальных клеток, к которому относятся клетки *Nitella* и других гигантских водорослей. Из опытов Хоттера (глава 4, раздел 4.1) мы знаем, что наружная клеточная мембрана, обращенная к водной среде, проницаема для сахарозы, тогда как вакуолярная или внутренняя мембрана (тонопласт), граничащая с содержимым центральной вакуоли, почти для нее не проницаема. Таким образом, эти клетки также имеют два вида клеточных мембран и потому могут быть отнесены к бифациальным.

Согласно теории АИ, клеточные мембраны унифациальных клеток не содержат каких-либо насосов, требующих для своей работы затрат энергии. Это подтверждено обширной экспериментальной работой (глава 12). А вот бифациальная клетка в целом, с мембранами и цитоплазмой, способна осуществлять *истинный активный транспорт* через бифациальный клеточный слой. Насонов также считал, что железистые и эпителиальные клетки вовлечены в процесс избирательного перекачивания веществ не отдельными своими частями (мембранами, например), а как *целое*, но не предложил этому явлению молекулярного объяснения.

циональна уровню АТФ. Чем ниже уровень АТФ, тем сильнее набухание [199; 107, p. 267] (рис. 64). Это еще раз подтверждает, что толчком к набуханию поврежденной клетки служит снижение уровня АТФ.

В 1969 году Саладино с сотр. наблюдали аналогичное Na^+-зависимое набухание в клетках мочевого пузыря жабы, обработанных амфотерицином В [457]. Если же NaCl в растворе Рингера заменяли соответствующим количеством сахарозы, эти клетки не набухали. Позднее сходные наблюдения были сделаны Накао и его сотрудниками на эритроцитах человека в физиологическом растворе с высо-



:. 63. Изменение массы почек мыши в долях от их :сы в физиологических условиях (ось ординат) в :ет на охлаждение до 4 °С в зависимости от кон-трации солей в физиологическом растворе (ось цисс). Для поддержания изоосмотичности в рас-р Рингера для теплокровных добавляли сахаро-например, 60 мМ NaCl + 160 мМ сахарозы; см. олнительную шкалу для сахарозы). Результаты азывают, что в присутствии ионов Na^+ и Cl^- на-ание наиболее выражено, однако LiCl еще более ективен в этом отношении. (По Лингу и Квон]).

ким уровнем Na^+ и с добавлением метаболического яда NaF [525]. Когда уровень АТФ в эритроцитах падал до 0,1 мМ и ниже, их форма из обычного двояковогнутого диска становилась сферической.

Приведенные данные независимых исследований дополняют друг друга и взятые вместе свидетельствуют в пользу механизма набухания поврежденных клеток, предлагаемого теорией АИ. Кроме того, обсуждение этих данных показывает, что одно из основных положений теории АИ о том, что главный кардинальный адсорбат (АТФ) — это ЭАКА, служит удобным инструментом для интерпретации наблюдаемых явлений: снижение уровня АТФ влечет за собой рост электронной плотности на фиксированных анионах клеточных белков с переключением их селективности с K^+ на Na^+ и далее — на фиксированные катионы.

15.4. Истинный активный транспорт через бифациальные эпителиальные слои и другие бифациальные системы

Морфологически клетки можно разделить на две группы. К одной из них, наиболее многочисленной, можно отнести клетки мышечные и нервные, эритроциты, а также бактерии, например E. coli. Их отличительной особенностью является одинаковое строение поверхности, или мембраны, с какой бы стороны клетки она ни находилась. Поэтому такие клетки названы *унифациальными* [15, pp. 585–586].

Ко второй группе относятся в основном клетки, образующие прочные пласты (эпителии), которые отделяют внутреннюю среду многоклеточного организма или органа от внешней среды. Примерами могут служить кожа лягушки, эпителий кишечника или почечных

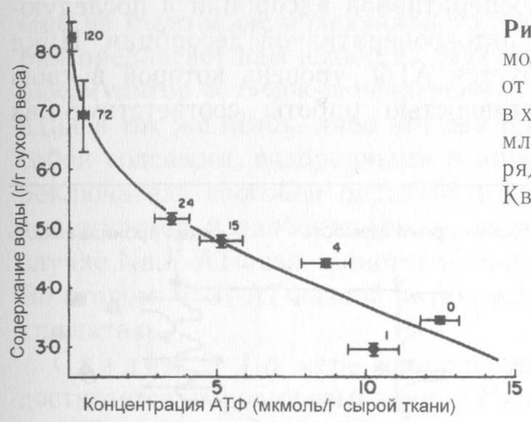


Рис. 64. Зависимость содержания воды в набухающем мозге мыши (среднее значение и стандартное отклонение от среднего) от уровня АТФ в ткани. Время инкубации в холодном (4 °С) бескислородном растворе Рингера для млекопитающих варьировали (время в часах указано рядом с экспериментальными точками). (По Лингу и Квону [199]).

канальцев. Как правило, у таких клеток мембрана, обращенная во внешнюю среду, отличается от обращенной внутрь. Поэтому такие клетки названы *бифациальными* [15, pp. 585–586].

Кроме эпителиальных, существует и другой вид бифациальных клеток, к которому относятся клетки *Nitella* и других гигантских водорослей. Из опытов Хоттера (глава 4, раздел 4.1) мы знаем, что наружная клеточная мембрана, обращенная к водной среде, проницаема для сахарозы, тогда как вакуолярная или внутренняя мембрана (тонопласт), граничащая с содержимым центральной вакуоли, почти для нее не проницаема. Таким образом, эти клетки также имеют два вида клеточных мембран и потому могут быть отнесены к бифациальным.

Согласно теории АИ, клеточные мембраны унифациальных клеток не содержат каких-либо насосов, требующих для своей работы затрат энергии. Это подтверждено обширной экспериментальной работой (глава 12). А вот бифациальная клетка в целом, с мембранами и цитоплазмой, способна осуществлять *истинный активный транспорт* через бифациальный клеточный слой. Насонов также считал, что железистые и эпителиальные клетки вовлечены в процесс избирательного перекачивания веществ не отдельными своими частями (мембранами, например), а как *целое*, но не предложил этому явлению молекулярного объяснения.

1. Активный транспорт ионов Na^+ через кожу лягушки

Именно на примере транспорта ионов Na^+ через кожу лягушки я впервые предложил механизм активного транспорта, основанный на принципах теории АИ — «кооперативный адсорбционно-десорбционный насос» (в кратком изложении — в 1956 г. [136], и позднее — в более развернутом виде [225; 15, pp. 508–599]).

Механизм включает в себя три элемента: две мембраны, — наружную (обращенную к внешней среде) и внутреннюю (обращенную к тканевой жидкости), действующие как клапаны (первая лишь впускает вещества, а вторая только выпускает), — и расположенный между ними белковый матрикс, настроенный на аккумулирование Na^+ посредством автокооперативной адсорбции и последующее его освобождение путем автокооперативной десорбции. Цикл адсорбции-десорбции регулируется АТФ, уровень которой в свою очередь определяется эффективностью работы соответствующих систем метаболизма (рис. 65).

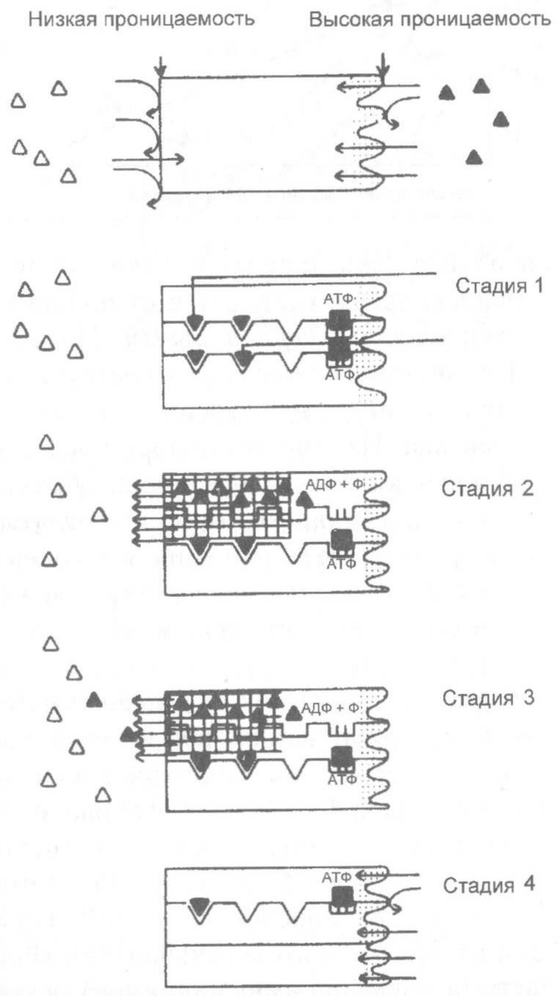


Рис. 65. Схематическое изображение механизма активного транспорта через бифациальный эпителиальный слой. Вещество (▲), например, Na^+, из внешней среды (справа) активно переносится во внутреннюю среду организма (слева); △ — то же вещество после переноса. Прямые и изогнутые стрелки — соответственно успешные и неудачные попытки входа вещества ▲ в клетку. Мелкими точками справа показана система фиксированных зарядов на поверхности клетки и в непосредственной близости от нее. ▼ — вещество, адсорбированное белковым цитоплазматическим матриксом клеток эпителия. Пространство между молекулами белка заполнено связанной водой, организованной в многослойные структуры. Заштрихованное пространство — область, в которой вода находится в свободном состоянии после ее десорбции; незаштрихованная область — связанная вода, представляющая собой диффузионный барьер. ■ — АТФ, большая часть которой адсорбирована белком (белками), являющимся Na,K-зависимой АТФазой. Процесс активного транспорта можно разбить на стадии. Стадия 1. Вход вещества через слизистую поверхность эпителия в клетку. Кооперативная адсорбция на центрах, свойства которых определяются кардинальным адсорбатом — АТФ. Стадия 2. Последний адсорбированный ион Na^+ активирует Na,K-АТФазу, запуская расщепление АТФ. Связанные ионы Na^+ и вода кооперативно десорбируются на серозной стороне эпителиальной клетки. Стадия 3. Диффузия вещества из клетки через деполяризованную воду на серозной стороне эпителия. Стадия 4. Регенерация АТФ и ее адсорбция кардинальными центрами белкового матрикса, чем и завершается цикл. (По Лингу [225]).

Стадия 1. Внешняя поверхность эпителия более проницаема для Na^+ ввиду высокой плотности расположенных на ней β- и γ-карбоксильных групп и высокой электронной плотности на них (рис. 42). В результате Na^+ наружной среды эффективно и избирательно адсорбируется, и его содержание на стороне эпителиальной клетки, обращенной наружу, становится высоким. Проникновение Na^+ внутрь клетки происходит по адсорбционно-десорбционному механизму диффузии (см. рис. 35). Внутри клетки Na^+ аккумулируется цитоплазматическим белковым матриксом с участием тех же β- и γ-карбоксильных групп, управление свойствами которых осуществляется кардинальным адсорбатом — АТФ.

В первой версии этого механизма, представленной в 1981 году, еще не было идеи молекулярного переключателя [225]. Теперь теория предлагает нам выбор из двух возможных моделей: либо белок-аккумулятор и белок-переключатель (см. раздел 14.3, п. 4) — это один и тот же белок, либо это два разных белка, связанные между собой солевыми, водородными и иными связями так, что белок-переключатель способен передавать индуктивный эффект на белок-аккумулятор и наоборот (см. раздел 14.3, п. 4, рис. 49). В первом случае Na,K-АТФаза является и аккумулятором, и переключателем. Во втором Na,K-АТФазной активностью обладает лишь белок-переключатель.

Стадия 2. По мере накопления Na^+ на белке-аккумуляторе достигается порог связывания, за которым следующий связанный ион Na^+ запускает Na,K-зависимую АТФазу. АТФ расщепляется на АДФ и неорганический фосфат. В условиях, когда ключевой ЭАКА (АТФ) утрачен, а вместо него появляется АДФ, способная лишь слабо связываться с АТФазой, да к тому же действует, возможно, как ЭДКА (свидетельства этому см. в разделе 14.3, п. 4 и в работе [289, pp. 86–87]), ионы Na^+ и вода автокооперативно десорбируются с белка-аккумулятора.

Стадия 3. Свободная диффузия ионов Na^+ во внутреннюю среду после десорбции с белка-аккумулятора организма (по концентрационному градиенту); такая диффузия становится возможной после десорбции воды с этого же белка потому, что свободная вода уже не является эффективным диффузионным барьером по сравнению со связанной.

Стадия 4. Восстановление нормального уровня АТФ в клетке, после чего система возвращается в стадию 1 цикла активного транспорта.

Изложенная модель опирается, среди прочих данных, и на важное наблюдение, сделанное в 1958 году Кофэд-Йонсеном и Уссингом [226]. Они обнаружили, что электрический потенциал между наружной и внутренней поверхностью кожи лягушки зависит от концентрации Na^+ в растворе, омывающем наружную сторону кожи, и от концентрации K^+ с внутренней стороны кожного покрова. Они объяснили эту закономерность тем, что наружная сторона кожи более проницаема для Na^+, а внутренняя — для K^+.

Согласно теории АИ, потенциал покоя клетки — не трансмембранный потенциал, а *потенциал поверхностной локализованной адсорбции*. Он образуется благодаря наличию на поверхности клетки фиксированных анионных β- и γ-карбоксильных групп (см. ниже раздел 15.4, п. 2), которыми опосредовано, кроме того, и проникновение катионов в клетку (раздел 13.2). Плотность электронов (величина *c*) на β- и γ-карбоксильных группах, расположенных на внешней поверхности, велика, отсюда и большая их избирательность к ионам Na^+, чем к K^+; у этих же групп, расположенных на внутренней поверхности, обращенной в среду организма, плотность электронов ниже, поэтому их избирательность к K^+ выше, чем к Na^+ (рис. 42).

Ранее я говорил о том, что предполагаемый белок-аккумулятор (или белки-аккумуляторы) с Na,K-АТФазной активностью должен располагаться лишь в непосредственной близости к серозной (внутренней) мембране клеток эпителия. Однако ряд независимо полученных данных показал, что белки-аккумуляторы могут заполнять весь объем эпителиальной клетки.

1. Мадрел [227] показал, что скорость транспорта K^+ и Na^+ через эпителий мальпигиевых сосудов клопов Rhodnius существенно зависит от *общего* внутриклеточного содержания этих ионов (чем больше содержание, тем больше скорость). Это явление легко объяснить, если принять, что большая часть этих ионов адсорбирована *цитоплазматическими* структурами.

2. Скорость транспорта ионов Na^+ через эпителиальные клетки почек протея (Necturus) также прямо пропорциональна *общему* внутриклеточному содержанию ионов Na^+ [228], большая часть которых находится в связанном состоянии.

3. После введения кролику радиоактивно меченного K^+ содержание метки в моче остается на более низком уровне по сравнению с плазмой крови и в то же время быстро выравнивается с его содержанием в почечной ткани. Это явление легче всего объясняется связыванием K^+ в клетках эпителия [229].

В свете этих фактов возникает вопрос: раз почки, солевые железы и прочие бифациальные эпителиальные ткани особенно богаты Na,K-АТФазой, может ли данный фермент быть сосредоточенным не только в мембранах, но и в цитоплазме этих клеток, причем в гораздо большем количестве? Скоу, рассматривая этот вопрос, не исключал возможности присутствия Na,K-АТФазы вне клеточных мембран [281, p. 604].

2. Активный транспорт ионов Rb^+ через цитоплазму клеток Nitella

Принципиальной особенностью описанной модели активного транспорта является циклическая адсорбция-десорбция ионов соответствующим белком-аккумулятором (или белками), имеющимся в каждой эпителиальной клетке. Увы, проверить эту идею на небольших клетках эпителия непросто и, насколько я знаю, никто пока не брался за это. Однако давно известна способность клеток гигантских водорослей, морских (к примеру, *Valonia macrophysa*) и пресноводных (например, *Nitella clavata*), накапливать в вакуолярном соке ионы K^+ в концентрациях, многократно превышающих таковую в окружающей морской или пресной воде [491, p. 125; 15, p. 64]. Начиная разговор о «кооперативном адсорбционно-десорбционном насосе», как я позднее его назвал, представленном схематически на рис. 65 и подробнее описанном ниже, я сразу подчеркнул, что в основе активного транспорта и через многоклеточный эпителий, и через цитоплазму одной единственной бифациальной клетки, лежит один и тот же механизм. В доказательство я привожу работу Брукса [492].

Но прежде чем я расскажу о его работе, мне хотелось бы показать на примере митохондрий принципиальную возможность синхронного участия клеток эпителия в активном транспорте. Давайте посмотрим, как большая популяция выделенных клеточных органелл может синхронно циклически поглощать и высвобождать ионы щелочных металлов.

В 1965 году Ларди с Гравеном [494] и независимо от них Прессманом [495] было открыто циклическое поглощение и высвобождение ионов K^+ и H^+ взвесью митохондрий (из сердечной мышцы голубя или печени крысы). Иллюстрацией служит рис. 66, позаимствованный из работы Чанса и Ёшиока [493]. Обратите внимание, что эти данные подтверждают существование *циклического поглощения и высвобождения* ионов внутренним матриксом каждой митохондрии. Поразительная *синхронность* процессов поглощения и высвобождения в масштабе огромной популяции обособленных митохондрий позволяет по-новому взглянуть на степень координации как между органеллами отдельной клетки, так и между самими клетками. Такой характер процесса поглощения и освобождения веществ и столь совершенная синхронизация работы соответствующих белковых структур теоретически необходимы для объяснения механизма активного транспорта в эпителиальных клетках и в гигантских клетках водорослей.

Чтобы циклические процессы, показанные на рис. 66, стали возможны, необходимо было обеспечить определенное соотношение концентраций K^+ и H^+ (а также вспомогательный, конгруэнтный, анион), АТФ или условия, необходимые для ее образования (например, кислород [15, pp. 534–535]), а также валиномицин. Одно время валиномицин считался универсальным переносчиком K^+ (или ионофором) через фосфолипидные мембраны. Позднее Малофф с сотр. [213] показали, что валиномицин не облегчает поступление K^+ в митохондрии печени, а другие ученые подвергают серьезным сомнениям существование непрерывной фосфолипидной бислойной мембраны, окружающей митохондрии, да и клетки вообще [214; 215] (см. гл. 13).

В 1981 году я предположил, что валиномицин, действуя как электроноакцепторный кардинальный адсорбат (ЭАКА), сдвигает величину *c* митохондриальных β- и γ-карбоксильных групп на «острие бритвы», заставляя их автокооперативно колебаться между адсорбцией K^+ (при низкой величине *c*, при низкой плотности электронов) и адсорбцией H^+ (при высокой величине *c*, высокой плотности электронов) [15, pp. 535–536]. Это предположение подтверждает тот факт, что валиномицин может быть заменен в этом случае на ЭДТА [497] или стронций (Sr^{2+}) [498]. Электроноакцепторные свойства валиномицина следуют также из его сходства с адреналином, являющимся

ЭАКА: валиномицин вызывает гиперполяризацию гигантских митохондрий, а адреналин — мышц лягушки (см. следующий раздел 15.5, п. 2.5.2, а также мою книгу [15, Fig. 15.7]).

Динамика поглощения радиоактивно меченного Rb^+ цитоплазмой и клеточным соком *Nitella* в опыте Брукса [492] показана на рис. 67. Обратите внимание, что циклический рост и падение уровня Rb^+ в клеточном соке центральной вакуоли следует за циклическим ростом и падением уровня Rb^+ в протоплазме, при этом уровень Rb^+ в клеточном соке выше его содержания в окружающей среде, но никогда не превышает уровня Rb^+ в протоплазме.

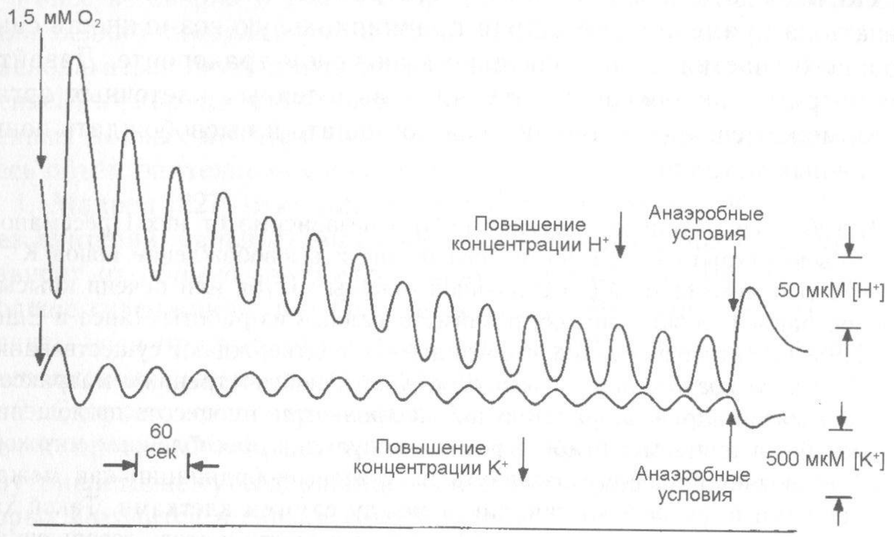


Рис. 66. Колебательное поглощение и высвобождение ионов H^+ и K^+ во взвеси митохондрий из сердечной мышцы голубя. Для запуска колебательного процесса митохондрии инкубировали вначале в анаэробных условиях, а затем вводили в суспензию 1,5 мМ кислорода (в виде H_2O_2) и 17 мг/мл каталазы. Раствор изначально содержал 83 нг/мл валиномицина и 6,7 мМ KCl, pH перед запуском колебательного процесса был равен 0,25. (По Чансу и Ёшиоке [493]).

15.5 Потенциал покоя

1. История вопроса

1.1. Мембранные теории потенциала покоя

В разделе 4.2 четвертой главы говорилось о рождении мембранной теории (1902 г.), у истоков которой стоял Ю. Бернштейн, и о ее крушении через несколько десятилетий, когда стало очевидно, что Na^+ легко проникает через клеточную мембрану. После обнаружения проницаемости мембраны к Na^+ теория была уже неспособна объяснить происхождение потенциала покоя, равного –90 мВ. Фиаско теории Бернштейна побудило Алана Ходжкина дать новое объяснение свойствам клеточной мембраны (1949 г.).

1.1.1. Ионная теория

Согласно ионной теории, внешняя концентрация ионов Na^+ слабо влияет на потенциал покоя потому, что мембрана не *абсолютно* непроницаема для этих ионов (по Бернштейну), а плохо проницаема к ним *относительно* других ионов. Но эта революционная поправка не устранила принципиального сходства между старой и обновленной теорией: как в основе представлений Бернштейна, так и в основе модернизированной ионной теории лежит спорный постулат о свободном состоянии воды и ионов K^+ в клетке. Открытия Арчибальда Хилла, а также Ходжкина и Кейнса, описанные в гл. 5,

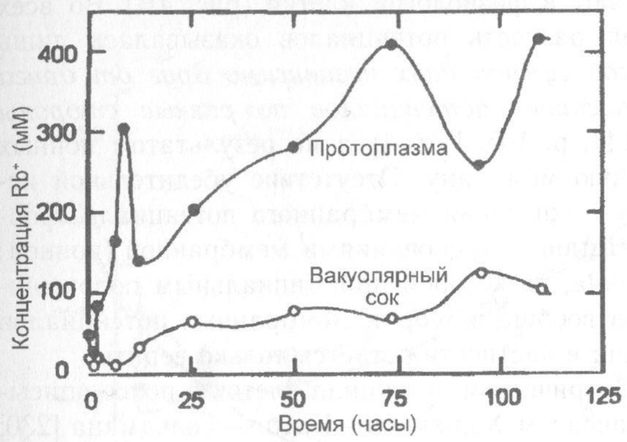


Рис. 67. Колебательное поглощение радиоактивно меченного Rb^+ протоплазмой клеток *Nitella*, взятых не с поверхности ткани растения, а из несколько более глубоких слоев (верхняя кривая), и его последующее появление в клеточном соке центральной вакуоли (нижняя кривая). Опыт длился 120 ч, в окружающей среде содержалось 5 мМ меченого RbCl. Каждая точка — среднее значение из 5 измерений, каждое из которых получено в отдельной серии опытов (всего 5 серий). Опыт проводили при pH 7,3 и постоянном освещении. (По Бруксу [492]).

долгое время казались (и до сих пор кажутся) неопровержимым доказательством истинности такого взгляда.

Однако позднее работы, о которых я рассказывал в разделе 10.2, п. 3, неопровержимо продемонстрировали, что большая часть K^+ в мышечных волокнах адсорбирована β- и γ-карбоксильными группами остатков аминокислот. Связанный K^+ обладает совершенно иными свойствами и не может играть роль, необходимую для возникновения мембранного потенциала ни по сценарию Бернштейна, ни по сценарию Ходжкина.

Адсорбированное состояние клеточного K^+ объясняет также, почему в 10-ти из 14 независимых исследований [419] не смогли обнаружить предсказываемой мембранной теорией логарифмической зависимости между внутриклеточной концентрацией K^+ и величиной потенциала покоя (рис. 4В). Все четыре исключения из правила, как и само правило, объясняет альтернативная теория электрического потенциала клеток — теория *поверхностного потенциала, возникающего в результате локализованной поверхностной адсорбции* [15, p. 476; 48, p. 58; 107, p. 315, п. 5], которая будет подробно рассмотрена в разделе 15.5, п. 2.

Неотъемлемым элементом ионной теории является постулат о наличии в мембране натриевого насоса, постоянно поддерживающего

низкий уровень ионов Na^+ в клетке. Данные, изложенные в главе 12, показывают, что такой мембранный насос, существуй он на самом деле, потреблял бы больше энергии, чем клетка в состоянии произвести. Это обстоятельство также ставит ионную теорию потенциала покоя под серьезное сомнение. Но и это еще не все.

История науки знает многократные попытки найти искусственную модель, способную генерировать *мембранный потенциал* (рис. 4В). Среди прочего, в этом качестве исследовали мембраны из тонкого стекла [147; 551], коллодия [147; 554], масла [242; 243], фосфолипидов [499]. Однако электрический потенциал между сторонами этих искусственных мембран не был истинным *мембранным потенциалом*, как его сейчас понимают в физиологии клетки (рис. 4В). Во всех случаях обнаруженная разность потенциалов оказывалась лишь *обычной алгебраической суммой двух независимо друг от друга возникающих поверхностных потенциалов по разные стороны мембраны* [241; 243; 147, p. 165, Fig. 4], а не результатом ионных потоков через модельную мембрану. Отсутствие убедительной искусственной модели возникновения мембранного потенциала, формирующегося в соответствии с требованиями мембранной (ионной) теории — третья причина, по которой принципиальным положениям мембранной теории вообще и теории мембранных потенциалов Бернштейна—Ходжкина в частности остается только верить.

В ионной теории электрический потенциал клеток в покое описывается известным уравнением Ходжкина—Катца—Гольдмана [230; 231]:

$$\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{ex}}{P_K[K^+]_{ex} + P_{Na}[Na^+]_{ex} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}, \quad (5)$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, а F — постоянная Фарадея, P — константа проницаемости соответствующего иона (например, P_K — константа проницаемости ионов K^+).

К моменту публикации этого уравнения Ходжкин и Катц уже сделали открытие, согласно которому потенциал действия сопровождается временным местным повышением избирательной проницаемости только для ионов Na^+ [233], а не для всех веществ, как полагал Бернштейн [232]. Затем Ходжкин и Катц показали, что и потенциал покоя, и потенциал действия можно описать одним уравнением (5), варьируя лишь три константы проницаемости. Тогда еще не было известно, что потенциал покоя в условиях диффузионного равновесия *безразличен* к уровню основного внеклеточного аниона — Cl^- [234; 235].

Открытие того неожиданного факта, что потенциал покоя не зависит от уровня Cl^- в среде, стало еще одной угрозой для ионной теории. Поскольку проницаемость для ионов Cl^- (P_{Cl}) такая же высокая, как и для ионов K^+ (P_K) [45; 46], то изменение концентрации Cl^- в среде должно влиять на потенциал покоя не меньше, чем изменение в среде концентрации ионов K^+. Однако этот вывод не получил экспериментального подтверждения. К сожалению, те немногие ученые, которые занимались этим, либо не осознали важности своих результатов, либо по каким-то другим причинам не сделали надлежащих выводов. Вместо этого они просто выбросили ионы Cl^- из уравнения (5), придав ему следующий вид [236; 237]:

$$\psi = (RT/F) \ln \{(P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in}) / (P_K[K^+]_{ex} + P_{Na}[Na^+]_{ex})\}. \quad (6)$$

Конечно, это уже не то *строго выведенное* уравнение, каким было уравнение (5), а неуклюжая уступка фактам.

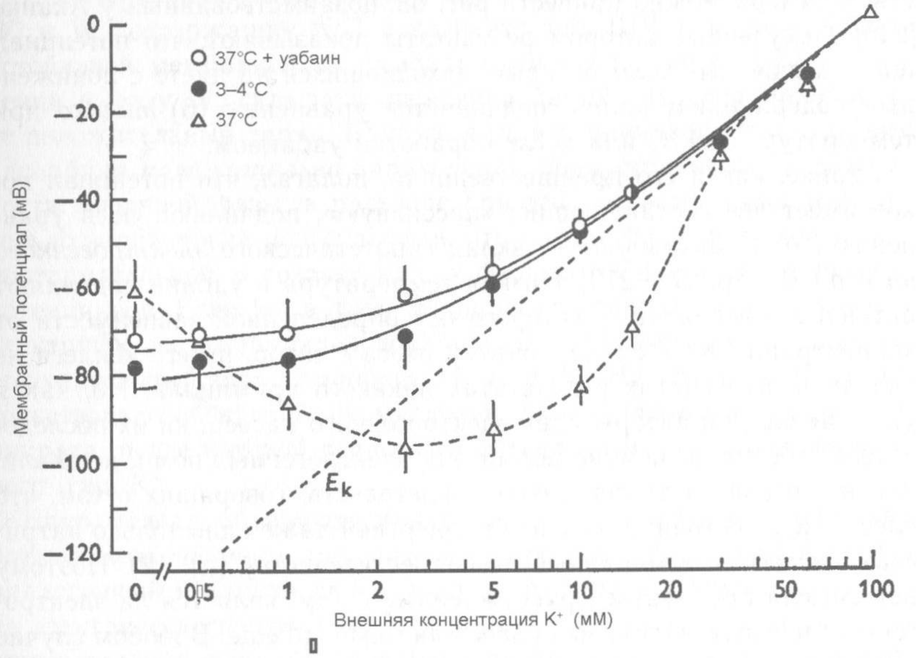


Рис. 68. Влияние охлаждения и уабаина на зависимость потенциала покоя камбаловидной мышцы крыс с повышенным содержанием Na^+ от концентрации K^+ в среде. Увеличение содержания Na^+ достигалось низкокалиевой диетой на протяжении 40–49 дней. *Светлые кружки* — мышцы, обработанные уабаином, при физиологической температуре (37 °С). *Темные кружки* — те же мышцы, охлажденные до 3–4 °С. *Треугольники* — мышцы, не обрабатывавшиеся уабаином, при физиологической температуре (37 °С), т.е. интактные мышцы. Сплошные линии — аналитическое выражение экспериментальных данных, полученное с помощью уравнения (6). Однако с помощью этого уравнения невозможно получить кривую, показанную пунктирной линией. (По Акаике [240]).

Однако противоречия с действительностью на этом не закончились. Большинство исследователей не смогли подтвердить предсказываемой уравнением (5) зависимости между ψ и *внутриклеточным* содержанием K^+ и Na^+ [419] (см. также раздел 4.2), что стало уже пятым аргументом против ионной теории. Все, что удалось подтвердить экспериментально, — это предсказываемые уравнением (5)

зависимости ψ от абсолютной температуры (T) и от логарифма внешних концентраций K^+ и Na^+. Приводя уравнение (5) в соответствие с экспериментальными данными, получим следующее выражение:

$$\psi = \text{constant} - (RT/F) \ln \{P_K [K^+]_{ex} + P_{Na} [Na^+]_{ex}\}. \quad (7)$$

Я скоро вернусь к этому «уравнению».

1.1.2. Теория электрогенного насоса

После публикации уравнения (5) оказалось, что в ряде клеток потенциалы покоя не подчиняются ни ему, ни уравнению (6). В качестве примера можно привести рис. 68, позаимствованный у Акаике [240]. Полученные автором результаты показывают, что потенциал покоя мышечных волокон крыс, находившихся на диете с пониженным содержанием калия, подчиняется уравнению (6) *только* при температуре 3–4 °C или после обработки уабаином.

Акаике, как и его предшественники, полагал, что потенциал покоя имеет две составляющие: «пассивную», подчиняющуюся уравнению (6), и «активную» — вклад гипотетического *электрогенного насоса* [107, pp. 277–279]. Низкая температура и уабаин подавляют активный компонент, у которого нет определенной зависимости от концентрации K^+ в среде, поэтому ни сам автор, ни его коллеги не видели в полученных результатах никакого криминала. Но, как я уже говорил, ни авторы идеи электрогенного насоса, ни их последователи, постулировавшие целый ряд электрогенных помп, не знали, или не хотели знать серьезных свидетельств, говорящих о том, что клетка не в состоянии обеспечить энергией даже одни только натриевые насосы, электрогенные по совместительству (гл. 12). Поэтому нет смысла предаваться рассуждениям о том, является ли электрогенным насосом натриевый насос или какой-то еще. В любом случае эта идея малоубедительна. Она станет еще менее убедительной, если экспериментальные данные Акаике получат другое объяснение.

1.2. Теории межфазных потенциалов

В 1892 году Вальтер Нернст в работе «О растворимости смешанных кристаллов» (Über die Löslichkeit von Mischkrystallen) рассмотрел происхождение разности электростатических потенциалов у поверхности кристалла соли в растворе этой же соли [360]. Прежде всего, он констатировал, что каждая фаза в отдельности не обладает избыточным электрическим зарядом, утверждая этим, правда другими словами, закон макроскопической электронейтральности [97, p. 330]. Затем он указал, что двойной электрический слой формируется лишь в зоне соприкосновения поверхности твердого кристалла с раствором. Тот ион, который имеет больший *коэффициент распределения* между твердой и жидкой фазами (то есть лучше растворяется в твердой фазе, чем в жидкой), наделяет твердую фазу своим

электрическим зарядом — положительным или отрицательным. В результате на границе фаз появляется разность электрических потенциалов, откуда и название — *межфазный потенциал*.

1.2.1. Теория ионного адсорбционного потенциала Баура

В 1917 году Э. Баур и С. Кронман [241] изобразили цепь Вольта так:

НЭ / 0,01 н. KCl / **масло** / 0,01 н. KCl + добавка / НЭ
W_1 W_2

Неполяризуемые электроды (НЭ) погружены в две водные фазы W_1 и W_2, содержащие KCl в концентрации 0,01 н и разделенные устойчивой мембраной из «масла» (амиловый спирт). При добавлении в фазу W_2 сульфата стрихнина левый электрод приобретает положительный заряд. Баур считал, что причиной этому служит адсорбция *положительно* заряженного иона стрихнина на поверхности масляной фазы: в растворе при этом остается лишь отрицательно заряженный ион сульфата, что делает фазу W_2 более электроотрицательной, и создает между фазами разность электрических потенциалов. Если же в фазу W_2 добавить пикрат калия, разность электрических потенциалов приобретает противоположный знак — положительный заряд приобретает фаза W_2. На этот раз это свидетельствовало об адсорбции масляной фазой *отрицательного* иона пикрата, после которой в растворе оставался избыток положительного иона K^+.

Баур назвал образующуюся при этом разность электрических потенциалов *потенциалом ионной адсорбции*. Он предположил, что аналогичный механизм лежит в основе работы электрического органа электрического угря [514]. Наблюдения Баура, касающиеся «масляных потенциалов», были подтверждены и расширены Эренсвардом и Силленом [242], а также Колачикко [243]. Колачикко вместо сульфата стрихнина и пикрата калия использовал соответственно додецилсульфат натрия (ДСН) и цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) с аналогичным результатом. Компартменты W_1 и W_2 он заполнял водой, а не раствором KCl. При добавлении в один из них ДСН, а в другой — ЦТАБ между поверхностями масляного слоя возникала разность потенциалов, равная 370 мВ.

Баур впервые опубликовал *теорию ионного адсорбционного потенциала* в 1913 году [239]. Принятое тогда определение адсорбции отличалось от той локализованной адсорбции на молекулярном уровне, о которой я говорил выше (раздел 10.2, п. 4 и др.) и буду говорить ниже в разделе 15.5, п. 2. Оно звучало так: *«вещества, снижающие межфазную энергию, склонны концентрироваться на границе между жидкой и твердой или между двумя жидкими фазами. Этот феномен концентрирования на поверхности раздела называется адсорбцией»* [64, p. 211]. В 1918 году Ирвинг Ленгмюр (1881–1957) предложил, как он ее назвал, *локализованную адсорбцию* [117].

Концепция адсорбции Баура отличается от представлений Ленгмюра, что видно из характера изучавшейся им мембраны. Амиловый спирт, будучи однородной жидкостью, не содержит фиксированных центров локализованной адсорбции, имеющихся, как правило, на твердых телах и макромолекулах. (Краткий рассказ об эволюции термина «адсорбция» см. в работе [107, p. 57, п. 5]).

Теории межфазных потенциалов как Баура, так и Бютнера (см. ниже) хорошо, казалось бы, согласуются с теорией липоидных мембран Овертона, сыгравшей столь важную роль в развитии представлений о клетке. Однако теория Овертона выглядит неубедительной в свете противоречий, с которыми она столкнулась (см. раздел 13.1). Не были, например, найдены в клетке или вне ее вещества, специально созданные природой для генерации биоэлектрических потенциалов, подобных сульфату стрихнина или пикрату калия, как не были найдены в ней и переносчики ионов — ионофоры (раздел 13.2).

Однако работы Нернста, Баура, Кронмана, Эренсварда, Силлена и Колачикко очень важны: они убедительно показали, что электрические заряды именно на границе раздела фаз ответственны за образование постоянной разности электрических потенциалов. В то же время межфазная граница, образующаяся, к примеру, между маслом и водой, еще не может сама по себе создать постоянную разность электрических потенциалов.

1.2.2. Теория межфазных потенциалов Бютнера

Рихард Бютнер предложил иной механизм возникновения межфазного потенциала [515], причиной которого, как он считал, является асимметричное распределение соли между масляной и водной фазой и различия в константах диссоциации этой соли по обе стороны межфазной границы. Резкую критику этой теории см. в работах [241, pp. 93–97] и [15, p. 24].

1.2.3. Теории потенциала стеклянного электрода Горовитца и Никольского

В 1923 году Горовитц (известный также как Lark-Horovitz) продемонстрировал ко всеобщему изумлению, что стеклянный электрод становится Ag^+-чувствительным электродом после погружения в раствор нитрата серебра ($AgNO_3$) [374]. Горовитц считал, что при этом катионы, изначально присутствующие на поверхности стекла, обмениваются на ионы Ag^+ из раствора. Именно этот обмен, полагал он, и наделяет стеклянный электрод чувствительностью к Ag^+ в растворе.

В первой публикации Горовитц назвал потенциал стеклянного электрода *потенциалом ионной адсорбции* [374], а двумя годами позже, в 1925 году, — *потенциалом ионного обмена* (ионообменный потенциал) [375]. Еще более поздняя версия природы потенциала была представлена в 1931 году и получила математическое выражение [362]:

$$\psi = \text{constant} - (RT/F) \ln (C_1 + AC_2), \qquad (8)$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, а F — постоянная Фарадея. C_1 и C_2 — концентрации двух видов ионов в омывающем растворе. Обратите внимание: A — не обычная константа адсорбции, а *константа обмена*, равная $\mu_2 K_1/\mu_1 K_2$, где μ_1 и μ_2 — *подвижность* двух видов ионов в твердой фазе. K_1 и K_2 — по определению Горовитца, «интегральные константы, выражающие термодинамический потенциал ионов в условиях действия сил поверхностного натяжения между твердой фазой и раствором».

В 1937 году Б. П. Никольский также вывел уравнение электрического потенциала стеклянного электрода, находящегося в контакте с двумя видами свободных ионов [373]:

$$\psi = \psi^\circ + (RT/F) \ln (a_1 + Ka_2), \qquad (9)$$

где a_1 и a_2 — *активность* двух видов ионов 1 и 2 в омывающей среде, ψ° — константа, K — *константа обмена* двух видов ионов между электродом и раствором. Никольский делал особый акцент именно на этой *константе обмена*, что ясно из следующих слов:

«Очевидно, что нельзя также считать удовлетворительной концепцию обменной адсорбции катионов, предложенную Горовитцем». Процитировав статью Горовитца [374], Никольский продолжал: «...Горовитц в своих поздних публикациях (имеются в виду работы [375; 362], — ГЛ) полагал, что между стеклом и раствором происходит обмен катионов, а не адсорбция (*слова «адсорбция» в первоисточнике нет; это интерпретация самого Никольского* — мое примеч., ГЛ). Такая оценка кажется автору настоящей статьи (т. е. Никольскому, — ГЛ) наиболее верной...» [373, p. 600].

Горовитц не первым начал изучать потенциалы стеклянных электродов. Насколько мне известно, и идею о принципиальном сходстве механизмов возникновения электропотенциала на стеклянном электроде и биопотенциала тоже предложил не он. Еще в 1906 году Кремер первым назвал стеклянную мембрану моделью клеточной мембраны, а потенциал диффузии через стеклянную мембрану ионов H^+ (или мембранный потенциал, см. рис. 4В) — моделью электрического потенциала клеток [466] (историю вопроса см. в работах [468; 15, p. 123]).

Леонор Михаэлис, основываясь на своих исследованиях трансмембранной разности потенциалов коллодиевых мембран [401], поддержал диффузионную теорию Кремера как в отношении к своим коллодиевым мембранам, так и к биомембранам. Михаэлис и Перлцвейг отвергли теорию ионного обмена Горовитца, объяснявшую потенциал стеклянного электрода наличием электрических зарядов на его поверхности, как неприменимую к коллодиевой модели, поскольку считали коллодий электрически нейтральным, не имеющим электрических зарядов [518]. Они не предполагали, какой неприятный сюрприз ждет их в их же собственной лаборатории в результате изменения некоторых обстоятельств.

Вторая мировая война положила конец поставкам коллодия компанией Schering, которым пользовались в лаборатории Михаэлиса. Его ученику Соллнеру и другим сотрудникам пришлось самим готовить коллодий из исходных ингредиентов. Но, вопреки их стараниям, чем чище получался коллодий, тем хуже были электроды из него. В конце концов, они выяснили, что высокую разность потенциалов, которую они получали на коллодии фирмы Schering, обеспечивали содержащиеся в нем *примеси* [330], и этими «примесями» были отрицательно заряженные *карбоксильные группы*, которые легко возникали при контакте коллодия с кислородом воздуха или другими окислителями, особенно в кислой (HBr) или щелочной (NaOH) среде [541]. Иными словами, потенциал коллодиевого электрода по механизму своего возникновения мало чем отличается от потенциала стеклянного электрода: обоим электродам для возникновения ионочувствительной разности электрических потенциалов требуются электрические заряды на поверхности.

Но ни Михаэлис, ни его ученики, ни кто-либо еще, насколько мне известно, не осознал значение этого открытия, не попытался критически переосмыслить правомерность выбранной ими прежде модели биоэлектрических потенциалов. Лишь в 1955 году была опубликована моя короткая заметка, мимоходом упомянутая в разделе 14.1, п. 1 (гл. 14).

2. Теория биопотенциалов, возникающих в результате локализованной поверхностной адсорбции (ЛПА)

Версия происхождения электрических потенциалов клеток с точки зрения теории АИ впервые была кратко представлена в 1955 году [145] (раздел 14.1, п. 1), хотя сама идея родилась раньше — это видно на рис. 4С, взятом из публикации 1952 года [96].

Согласно этой теории, *потенциал покоя создают* β- *и* γ-*карбоксильные группы в микроскопически тонком поверхностном слое клетки* [377] *в результате локального устойчивого связывания (адсорбции) ионов* K^+ *(и/или* Na^+*) в соотношении один фиксированный заряд — один ион.*

До сих пор эта теория была известна как теория *поверхностной адсорбции* (ПА) [107, p. 280]. Однако во избежание терминологической путаницы с другими теориями — например, с *теорией ионной адсорбции* Баура (потенциала масляного слоя), ранней (и впоследствии отброшенной) *теорией ионной адсорбции* Горовитца и его более поздней *теорией ионного обмена* (потенциалов стеклянного электрода), а также теорией Никольского, я решил изменить название теории ПА на *теорию локализованной поверхностной адсорбции* (ЛПА), благодаря которой возникает электрический потенциал клетки.

2.1. Еще раз о важности локального устойчивого взаимодействия

Теория локализованной поверхностной адсорбции (ЛПА) в корне отличается от всех остальных теорий межфазных потенциалов и потенциалов стеклянного электрода. Только она дает ясное представление о природе высокой избирательности взаимодействия макромолекул с одними ионами в присутствии других, близких по свойствам (например, K^+ и Na^+), и способна описать эти взаимодействия *количественно*. Это тем более важно, что такие взаимодействия действительно имеют место и в живых клетках, и в модельных системах — в стеклянном электроде, к примеру. Особенность ЛПА состоит в том, что в ней в полной мере учтена роль двух физических явлений: усиление ассоциации противоионов при фиксации в пространстве одного из них, и тесное локальное взаимодействие противоионов, достаточное для того, чтобы фактором селекции являлись уже не различия в размере гидратированных свободных ионов, а индуктивные эффекты (см. разделы 10.1, п. 1 и 10.2, п. 4.1). Таким образом, различие в размерах гидратированных K^+ и Na^+, столь популярное в соответствующей литературе, не является *единственным* физиологически значимым различием между ними.

Явление *усиления ассоциации* при фиксации одного из противоионов помогает по-новому понять удивительную способность живой клетки упорядочивать и регулировать ее бесконечные взаимодействия с ионами и водой. Без эффекта фиксации нет других причин считать, что внутриклеточные ионы могут находиться в связанном состоянии. Отсутствие знаний об этом эффекте объясняет, почему утверждение о том, что K^+ и Na^+ в клетке свободны, принимается как нечто очевидное, тем более что это находится в полном соответствии с доминирующими в настоящее время теориями Аррениуса и Дебая—Хюккеля о структуре и свойствах разбавленных растворов электролитов, и теориями Линдерстрёма—Ланга о растворах белков [467], и Грегора — об ионообменных смолах [127].

Представление о тесной ассоциации противоионов является весьма важным еще и потому, что позволяет включить в теоретический анализ такую важную характеристику *центров адсорбции,* как плотность электронов на β- и γ-карбоксильных группах (величина *c*) и на карбонильных группах полипептидного остова белка (аналог величины *c*). Без тесного контакта противоионов и, соответственно, без достаточно сильного взаимодействия между ними изменения электронной плотности на указанных группах были бы физиологически бессмысленными, так как не оказывали бы никакого влияния на их взаимодействия с другими функциональными группами белка, с органическими и неорганическими ионами.

2.2. Супермодель локализованной поверхностной адсорбции (ЛПА) является закономерным результатом фундаментальных ошибок мембранной теории потенциала

В 1955 году я впервые высказал идею о том, что в основе потенциала покоя клетки и электрического потенциала стеклянного элек-

трода лежит сходный механизм. Это предположение подтверждается рядом исследований, включая сравнительные исследования потенциалов покоя клеток и искусственных моделей. Например, электрод из стекла Corning 015 высокочувствителен к H^+ и нечувствителен к K^+, но если покрыть этот электрод микроскопически тонким слоем окисленного коллодия, он приобретает чувствительность к K^+, совсем как электрод, целиком изготовленный из окисленного коллодия [107, p. 284; 376]. Это означает, что именно природа поверхностных заряженных групп, а не проницаемость мембраны для ионов, определяет знак и величину электрического потенциала. Аналогичный вывод был сделан в ходе параллельных исследований потенциала покоя мышц лягушки: потенциал определяет именно природа поверхностных анионных центров, а не проницаемость мембран [106, p. 166; 314, Figs. 5–6; 377, Fig. 2]. Эти факты находятся в полном соответствии с теорией ЛПА.

Исторически стеклянные и коллодиевые мембраны как модели мембранного потенциала предлагались соответственно Кремером и Михаэлисом [401; 466]. Оба потерпели неудачу (раздел 15.5, п. 1.1.1). Но при объединении этих моделей родилась супермодель потенциала локализованной поверхностной адсорбции, что подтверждается следующими данными.

2.2.1. Чувствительность клеток и модельных систем к ионам щелочных металлов носит сходный характер

По способности деполяризовать поверхностный потенциал стеклянного электрода (С-электрода), покрытого окисленным коллодием (КС-электрод), ионы щелочных металлов располагаются в следующем порядке: $Rb^+ > K^+$, $Cs^+ > Na^+ > Li^+$ [376]; по величине констант адсорбции на поверхностных β- и γ-карбоксильных группах мышечного волокна лягушки этот порядок таков: $Rb^+ > Cs^+ > K^+ > Na^+$ [222]; по способности деполяризовать сердечную мышцу морской свинки порядок следующий: $Rb^+ > K^+ > Cs^+$ [246]. Нетрудно видеть, что между этими рядами много общего. Все эти три ряда возможны лишь при низкой плотности электронов (низкой величине *c*) на соответствующих карбоксильных группах.

У читателя может возникнуть вопрос: согласно теории АИ, причиной понижения электронной плотности на β- и γ-карбоксильных группах служит связывание белка с ЭАКА (например, АТФ) и его помощниками. Но карбоксильные группы окисленного коллодия не испытывают влияния АТФ. В слое коллодия вообще нет низкомолекулярных веществ, которые могли бы сыграть роль регулятора электронной плотности. Почему же порядок их чувствительности к катионам также указывает на низкую величину *c*? Хотя карбоксильные группы нитроцеллюлозы и не испытывают влияния АТФ, они испытывают влияние других электроноакцепторных групп, входящих в состав окисленной нитроцеллюлозы. В их числе ОН-группы (см. рис. 45) остатков D-глюкозы (см. текст мелким шрифтом в разделе 14.1, п. 2), а также нитрогруппы. И те, и другие относятся к электроноакцепторным функциональным группам (см. рис. 45 и 47).

2.2.2. Электропотенциалы модельных систем и живых клеток нечувствительны к изменению концентрации Cl^- в омывающем растворе

С позиций теории АИ это явление легко объяснимо: фиксированные анионы, такие как β- и γ-карбоксильные группы, в силу электростатического отталкивания не могут связывать анионы Cl^- и другие анионы — следовательно, отрицательно заряженные ионы не могут оказывать влияния на потенциал (покоя), вызванный локализованной поверхностной адсорбцией (ЛПА-потенциал покоя) мышечных и нервных волокон (см. выше п. 1.1.1). По этой же причине и КС-электрод нечувствителен к уровню Cl^-. Однако обработка КС-электрода (покрытого на этот раз неокисленным коллодием) раствором положительно заряженного полилизина с последующим высушиванием при влажности 40% наделяет его чувствительностью к анионам, в том числе к Cl^- [15, Fig. 14–23]. Приобретение *стеклянными электродами, покрытыми коллодием, а затем полилизином* (ПКС-электродами), чувствительности к анионам еще раз показывает, что именно заряженные поверхностные центры определяют природу и знак электрического потенциала.

2.2.3. Модельная система и клетка примерно в 150 раз чувствительнее к H^+, чем к K^+

Потенциал покоя мышцы лягушки в 170 раз чувствительнее к H^+, чем к K^+ [107, pp. 288–289]. Адсорбционный потенциал КС-электрода в 130 раз более чувствителен к H^+, чем к K^+ [107, p. 287].

2.2.4. Электропотенциалы модели и клетки нечувствительны к внешней концентрации Mg^{2+}

Потенциал покоя мышцы лягушки не зависит от внешней концентрации Mg^{2+} [503], хотя мембрана мышечного волокна высоко проницаема для него [503] и, согласно мембранной теории (включая гипотезу о насосах), он должен оказывать мощное деполяризующее действие на потенциал покоя. КС-электрод также нечувствителен к уровню Mg^{2+} в растворе [376]. Это свидетельствует о том, что этот катион не связывается ни поверхностью клетки, ни поверхностью электрода. Почему? Вспомним о том, что пары расположенных близко друг к другу карбоксильных групп в хелатирующих веществах, таких как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), а также в плотных скоплениях карбоксильных групп в карбоксильных ионообменных смолах обладают сильным сродством к Mg^{2+} и другим двухвалентным ионам [501]. Нечувствительность рассматриваемых потенциалов к Mg^{2+} объясняется тем, что поверхностные β- и γ-карбоксильные группы расположены недостаточно близко друг к другу для того, чтобы одновременно две группы могли взаимодействовать с одним катионом.

2.3. Первое уравнение потенциала покоя как потенциала локализованной поверхностной адсорбции

В 1959 году было впервые представлено уравнение потенциала покоя [245], каким оно должно быть согласно принципам теории АИ. В упрощенном виде оно выглядит так:

$$\psi = \text{constant} - (RT/F) \ln \{K_K [K^+]_{ex} + K_{Na} [Na^+]_{ex}\}, \qquad (10)$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, F — постоянная Фарадея. K_K и K_{Na} — *константы локализованной адсорбции* ионов K^+ и Na^+ β- и γ-карбоксильными группами поверхности клетки.

В этом уравнении имеется три независимых переменных: абсолютная температура (T), внеклеточная концентрация K^+ ($[K^+]_{ex}$) и внеклеточная концентрация Na^+ ($[Na^+]_{ex}$). К настоящему времени подтверждена зависимость потенциала покоя от каждой из этих переменных [290–294].

Заявив в 1955 году, что в основе потенциала покоя клеток и потенциала стеклянного электрода лежит сходный механизм (см. также раздел 14.1), я пришел к заключению, что уравнение (10) точнее описывает потенциал стеклянного электрода, чем уравнение Горовитца (8) и Никольского (9), по причинам, изложенным выше. Уравнение (10) отличается от уравнений (8) и (9) физическим смыслом коэффициентов. В уравнении (10) коэффициентами являются *константы локализованной адсорбции*, а в уравнениях (8) и (9) это — *константы обмена*; то есть к адсорбции, тем более к локализованной адсорбции рассматриваемые константы отношения, как подчеркивал Никольский, не имеют. Но без локализованной адсорбции невозможно объяснить высокую избирательность некоторых стеклянных электродов к K^+, например, в присутствии Na^+. Ведь различия в свойствах между этими катионами реализуются только в *ближних* взаимодействиях с фиксированными анионами.

Хотел бы обратить особое внимание читателя на то, что уравнение (10) не эмпирическое, а выведено на основе соответствующих законов физики [219, pp. 160–161] и сохранило при этом внешнее сходство с искаженным и потому неполным уравнением (6). Отличия между уравнениями (6) и (10) касаются и физического смысла коэффициентов. В уравнении (6) коэффициенты являются *константами ионной проницаемости* (P_K, P_{Na}), а в уравнении (10) — *константами локализованной адсорбции* (K_K и K_{Na}).

Заявление А. С. Трошина [92, p. 396] о том, что предложенная мной теория локализованной поверхностной адсорбции (ЛПА) не отличается от *фазовой теории биопотенциалов* Насонова и Александрова, неожиданно и ошибочно. В основе теории ЛПА лежит представление о *наличии* потенциала покоя на клеточной поверхности, а Насонов с сотрудниками, как и за 70 лет до этого Л. Герман в своей знаменитой теории альтерации [87], *отрицали* наличие разности потенциалов на поверхности *неповрежденной*

клетки в состоянии покоя (см. формулировку Насонова в разделе 8.2). Особенно трудно понять отрицание реальности потенциала покоя сейчас, в свете огромного количества данных на этот счет (см. примеры на рис. 68, 69 и 70). Очевидно, что это отрицание объясняется тем, что такие методики, как микроэлектроды Джерарда—Грэхем—Линга [88] и опыты на гигантских аксонах кальмара [47], совершившие революцию в измерениях электрических потенциалов клеток [441–443], стали достоянием науки сравнительно недавно. С другой стороны, можно найти некоторое сходство на качественном уровне между фазовой теорией потенциала действия Насонова и теорией потенциала действия на основе ЛПА, которая будет рассмотрена в разделе 15.6.

2.4. Решающий эксперимент Эдельмана

Людвиг Эдельман, тогда еще молодой немецкий биофизик, сумел осознать принципиальное значение различий в *физическом смысле* коэффициентов в двух внешне сходных уравнениях (6) и (10) и решил выяснить, какой из смыслов ближе к истине [246]. Сначала он измерил то, что принято называть константами проницаемости (P) ионов K^+, Rb^+ и Cs^+ в папиллярной мышце морской свинки, а затем — соответствующие константы локализованной поверхностной адсорбции (K). Далее он определил характер влияния каждого из этих катионов на потенциал покоя папиллярной мышцы [88]. Следующий шаг: он сравнил результаты, полученные с использованием уравнения (6) (подставив в него константы проницаемости) с результатами, полученными из уравнения (10) (подставив в него константы локализованной адсорбции). Вывод был однозначным: физический смысл коэффициентов — *константы локализованной адсорбции* катионов на поверхностных анионных центрах.

За столь важное открытие, а также за принципиальность в его отстаивании, Людвиг Эдельман потерял работу и был вынужден переквалифицироваться в специалиста по электронной микроскопии [547]. О подробностях этой постыдной для чиновников науки истории и о том, как он и в новой для себя области науки стал столь же блестящим и преданным профессии специалистом, можно узнать в работе [348], см. также раздел 10.2, п. 5.

2.5. Управление потенциалом покоя

Согласно теории АИ, β- и γ-карбоксильные группы, связывающие K^+ и Na^+, обладают одинаковыми свойствами независимо от их локализации в клетке — на поверхности или в толще протоплазмы. Поэтому логично было бы, как я это и сделал в 1979 году [248], использовать для характеристики электрического потенциала клеток ту же самую изотерму кооперативной адсорбции Янга—Линга (уравнение А4 в приложении), которая уже была успешно применена для количественного описания распределения ионов между клеткой и средой (раздел 14.1) [279; 190; 15, pp. 208–224, 345–361]. Я был полон надежд, что полученное уравнение (уравнение А19 в приложении) поможет глубже, чем уравнение (10), понять природу электрических потенциалов клеток и влияние на них биологически активных соединений. И мои надежды оправдались.

2.5.1. Увеличение электронной плотности (величины c) на поверхностных β- и γ-карбоксильных группах под влиянием уабаина и других ЭДКА

Чтобы объяснить происхождение потенциала покоя, Акаике [240] и другие ученые [238] постулировали еще один насос — электрогенный, не подозревая, что клетка неспособна обеспечить энергией насос уже имеющейся версии — натриевый насос (глава 12). В поисках альтернативного объяснения я проанализировал данные Акаике, приведенные на рис. 68, используя уравнение А19.

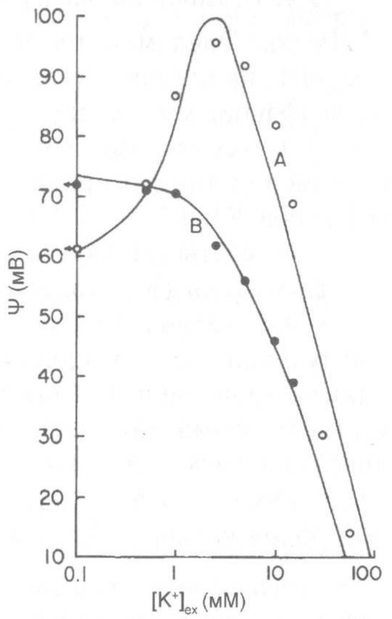


Рис. 69. Влияние уабаина (10^{-4} М) на потенциал покоя камбаловидных мышц крысы с повышенным содержанием Na^+. А — контрольные мышцы; В — мышцы, обработанные уабаином. Повышенное содержание Na^+ в мышцах достигнуто в результате диеты с низким содержанием калия. Экспериментальные данные (точки) те же, что на рис. 68. Потенциал покоя измеряли при различном содержании K^+ в среде после обработки уабаином или без нее. Кривые — аналитическое выражение экспериментальной зависимости, полученное с помощью уравнения А19 (см. приложение). Для кривой А: $-\gamma/2 = 0{,}67$ ккал/моль; $K^{\infty}_{Na\to K} = 96{,}3$; Constant = 116 мВ. Для кривой В: $-\gamma/2 = 0$ ккал/моль; $K^{\infty}_{Na\to K} = 35$; Constant = 76,4 мВ. (По Лингу и др. [314]).

На рис. 69 приведены результаты опытов Акаике [240] по влиянию уабаина на потенциал покоя мышцы крысы (точки), обсчитанные с помощью уравнения А19 (линии). Соответствие аналитического выражения рассматриваемой зависимости результатам эксперимента подтверждает теорию ЛПА-потенциалов и говорит о том, что уабаин в концентрации 10^{-4} М снижает *константу локализованного адсорбционного обмена* $K^{\infty}_{Na\to K}$ β- и γ-карбоксильных групп на поверхности мышечных волокон с 96 до 35 (иначе говоря, сродство карбоксильных групп сдвигается в пользу Na^+), а *энергию взаимодействия соседних центров связывания* $(-\gamma/2)$ — с 0,67 ккал/моль до 0. Анализ теоретических кривых на рис. 42 показывает, что падение параметра $K^{\infty}_{Na\to K}$ может произойти, лишь если уабаин повышает величину *c* (плотность электронов) рассматриваемых функциональных групп. То, что уабаин является электронодонорным кардинальным адсорбатом (ЭДКА), было показано нами [190] при исследовании его влияния на адсорбцию ионов щелочных металлов в мышцах лягушки (раздел 15.1, п. 3). Данные Акаике подтверждают этот вывод.

Интересно отметить, что уабаин в концентрации в 300 раз меньшей ($3{,}26 \times 10^{-7}$ М) снижал параметр $K^{\infty}_{Na\to K}$ β- и γ-карбоксильных групп в саркоплазме мышечных волокон со 100 до 21,7, но при этом никак не влиял на величину $-\gamma/2$ (рис. 57) [190]. Это обстоятельство дает основание полагать, что снижение до 0 параметра $-\gamma/2$ в опытах Акаике (согласно моим расчетам) является результатом снижения уровня АТФ в мышцах из-за слишком высокой концентрации уабаина в его опытах (10^{-4} М). Это предположение подтверждается данными о влиянии уабаина на содержание в мышцах АТФ [190, Fig. 9].

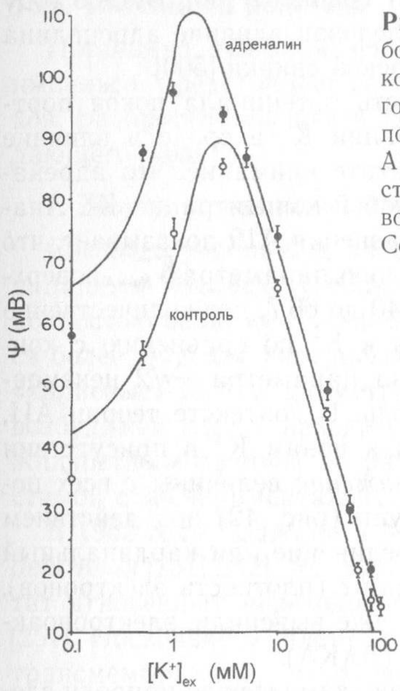


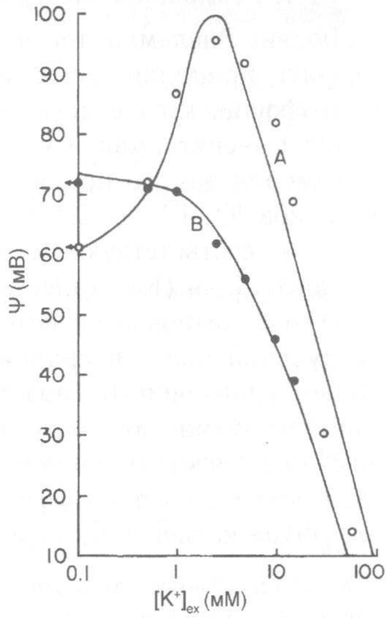
Рис. 70. Потенциалы покоя портняжных мышц лягушки, обработанных адреналином ($2{,}73 \times 10^{-5}$ М) при 25 °С, по сравнению с контролем (контролем служила парная мышца того же животного). Аналитическое выражение экспериментальных данных (точки) показано кривыми, полученными с использованием уравнения А19 (см. приложение). В контроле значение параметра $-\gamma/2$ составило 0,75 ккал/моль, $K^{\infty}_{Na\to K} = 40$, Constant = 105 мВ. После воздействия адреналином: $-\gamma/2 = 0{,}75$ ккал/моль, $K^{\infty}_{Na\to K} = 66{,}7$, Constant = 125 мВ. (По Лингу и др. [314]).

В 1949 году Линг и Джерард сообщили о быстром падении потенциала покоя мышцы лягушки под влиянием азида натрия (NaN_3) в концентрации 1 мМ [95, 1949 c]. За 5–10 мин. потенциал снижался с 80 мВ до 40–60 мВ. В 1961 году Абоод с сотр. сообщили об аналогичном деполяризующем действии 2,4-динитрофенола (ДНФ) [504].

Линг с сотр., анализировавшие действие NaN_3 в тех же координатах, что и на рис. 69, показали, что это соединение, как и уабаин, является ЭДКА. Поэтому и уабаин, и NaN_3 вызывают генерализованный эффект повышения электронной плотности (величины *c*) всех поверхностных β- и γ-карбоксильных групп. В результате возрастает их избирательность к Na^+ и снижается к K^+, что количественно выражается в снижении параметра $K^{\infty}_{Na\to K}$ (уравнение А19 приложения), а вместе с ним и потенциала покоя [15, Fig. 14, 18]. Данные Абоода с сотр. о действии ДНФ невозможно проанализировать с помощью уравнения А19 из-за слишком малого количества концентраций, в которых он был испытан. Однако опыты с митохондриями,

2.5.1. *Увеличение электронной плотности (величины c) на поверхностных β- и γ-карбоксильных группах под влиянием уабаина и других ЭДКА*

Чтобы объяснить происхождение потенциала покоя, Акаике [240] и другие ученые [238] постулировали еще один насос — электрогенный, не подозревая, что клетка неспособна обеспечить энергией насос уже имеющейся версии — натриевый насос (глава 12). В поисках альтернативного объяснения я проанализировал данные Акаике, приведенные на рис. 68, используя уравнение А19.



9. Влияние уабаина (10^{-4} М) на потенциал покоя камба-ных мышц крысы с повышенным содержанием Na^+. А — ольные мышцы; В — мышцы, обработанные уабаином. шенное содержание Na^+ в мышцах достигнуто в резуль-циеты с низким содержанием калия. Экспериментальные ле (точки) те же, что на рис. 68. Потенциал покоя измеряли азличном содержании K^+ в среде после обработки уабаи-ли без нее. Кривые — аналитическое выражение экспери-льной зависимости, полученное с помощью уравнения А19 риложение). Для кривой А: $-\gamma/2 = 0{,}67$ ккал/моль; $K^{\infty}_{Na\to K}$; Constant = 116 мВ. Для кривой В: $-\gamma/2 = 0$ ккал/моль; = 35; Constant = 76,4 мВ. (По Лингу и др. [314]).

На рис. 69 приведены результаты опытов Акаике [240] по влиянию уабаина на потенциал покоя мышцы крысы (точки), обсчитанные с помощью уравнения А19 (линии). Соответствие аналитического выражения рассматриваемой зависимости результатам эксперимента подтверждает теорию ЛПА-потенциалов и говорит о том, что уабаин в концентрации 10^{-4} М снижает *константу локализованного адсорбционного обмена* $K^{\infty}_{Na\to K}$ β- и γ-карбоксильных групп на поверхности мышечных волокон с 96 до 35 (иначе говоря, сродство карбоксильных групп сдвигается в пользу Na^+), а *энергию взаимодействия соседних центров связывания* ($-\gamma/2$) — с 0,67 ккал/моль до 0. Анализ теоретических кривых на рис. 42 показывает, что падение параметра $K^{\infty}_{Na\to K}$ может произойти, лишь если уабаин повышает величину *c* (плотность электронов) рассматриваемых функциональных групп. То, что уабаин является электронодонорным кардинальным адсорбатом (ЭДКА), было показано нами [190] при исследовании его влияния на адсорбцию ионов щелочных металлов в мышцах лягушки (раздел 15.1, п. 3). Данные Акаике подтверждают этот вывод.

Интересно отметить, что уабаин в концентрации в 300 раз меньшей ($3{,}26 \times 10^{-7}$ М) снижал параметр $K^{\infty}_{Na\to K}$ β- и γ-карбоксильных групп в саркоплазме мышечных волокон со 100 до 21,7, но при этом никак не влиял на величину $-\gamma/2$ (рис. 57) [190]. Это обстоятельство дает основание полагать, что снижение до 0 параметра $-\gamma/2$ в опытах Акаике (согласно моим расчетам) является результатом снижения уровня АТФ в мышцах из-за слишком высокой концентрации уабаина в его опытах (10^{-4} М). Это предположение подтверждается данными о влиянии уабаина на содержание в мышцах АТФ [190, Fig. 9].

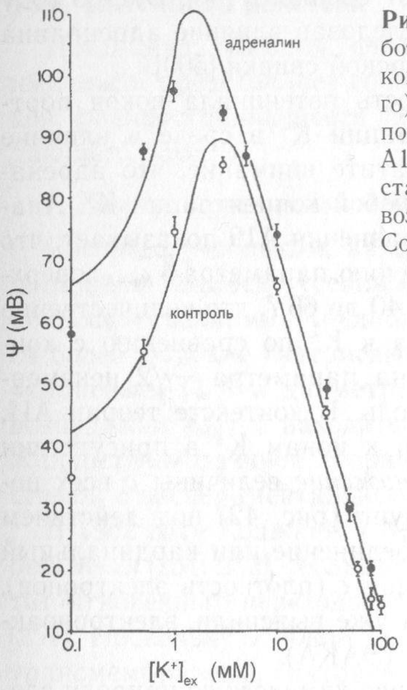


Рис. 70. Потенциалы покоя портняжных мышц лягушки, обработанных адреналином ($2{,}73 \times 10^{-5}$ М) при 25 °С, по сравнению с контролем (контролем служила парная мышца того же животного). Аналитическое выражение экспериментальных данных (точки) показано кривыми, полученными с использованием уравнения А19 (см. приложение). В контроле значение параметра $-\gamma/2$ составило 0,75 ккал/моль, $K^{\infty}_{Na\to K} = 40$, Constant = 105 мВ. После воздействия адреналином: $-\gamma/2 = 0{,}75$ ккал/моль, $K^{\infty}_{Na\to K} = 66{,}7$, Constant = 125 мВ. (По Лингу и др. [314]).

В 1949 году Линг и Джерард сообщили о быстром падении потенциала покоя мышцы лягушки под влиянием азида натрия (NaN_3) в концентрации 1 мМ [95, 1949 с]. За 5–10 мин. потенциал снижался с 80 мВ до 40–60 мВ. В 1961 году Абоод с сотр. сообщили об аналогичном деполяризующем действии 2,4-динитрофенола (ДНФ) [504].

Линг с сотр., анализировавшие действие NaN_3 в тех же координатах, что и на рис. 69, показали, что это соединение, как и уабаин, является ЭДКА. Поэтому и уабаин, и NaN_3 вызывают генерализованный эффект повышения электронной плотности (величины *c*) всех поверхностных β- и γ-карбоксильных групп. В результате возрастает их избирательность к Na^+ и снижается к K^+, что количественно выражается в снижении параметра $K^{\infty}_{Na\to K}$ (уравнение А19 приложения), а вместе с ним и потенциала покоя [15, Fig. 14, 18]. Данные Абоода с сотр. о действии ДНФ невозможно проанализировать с помощью уравнения А19 из-за слишком малого количества концентраций, в которых он был испытан. Однако опыты с митохондриями,

выделенными из печени крысы, показали, что ДНФ действительно является ЭДКА [496, p. 84], что объясняет его деполяризующее влияние на потенциал покоя.

2.5.2. Регуляторное влияние адреналина реализуется посредством снижения величины с поверхностных β- и γ-карбоксильных групп

В 1952 году я зарегистрировал рост потенциала покоя портняжных мышц лягушки после 3–5-часовой инкубации в растворе Рингера с адреналином ($2{,}73 \times 10^{-5}$ М) с $82{,}3 \pm 4{,}4$ до $92{,}9 \pm 3{,}8$ мВ (приведены стандартные отклонения от среднего) [96]. В 1958 году Бернсток подтвердил мои данные, исследовав влияние адреналина на потенциал покоя гладких мышц морской свинки [500].

На рис. 70 представлена зависимость потенциала покоя портняжной мышцы лягушки от концентрации K^+ в среде и влияние на эту зависимость адреналина. Обратите внимание, что адреналин повышает потенциал покоя при любой концентрации K^+. Анализ полученных данных с помощью уравнения A19 показывает, что эффект адреналина сводится к увеличению параметра $K^{\infty}_{Na \to K}$ поверхностных β- и γ-карбоксильных групп с 40 до 66,7, что количественно характеризует увеличение их сродства к K^+ по сравнению с контрольным уровнем. При этом величина параметра $-\gamma/2$ неизменно оставалась на уровне 0,75 ккал/моль. В контексте теории АИ, причиной повышения избирательности к ионам K^+ в присутствии Na^+ может быть только реактивное *снижение* величины *c* всех поверхностных β- и γ-карбоксильных групп (рис. 42) под действием адреналина. Биологически активное соединение или кардинальный адсорбат, способный понижать величину *c* (плотность электронов), подобно адреналину, является, как мы уже выяснили, электроноакцепторным кардинальным адсорбатом (ЭАКА).

Итак, уравнение A19 выражает физико-химическую природу следующих физиологических явлений: 1) зависимость потенциала покоя мышцы лягушки от концентрации K^+ в среде при фиксированной концентрации Na^+; 2) влияние электронодонорных кардинальных адсорбатов (ЭДКА, к примеру, уабаина или азида натрия) на зависимость потенциала покоя от концентрации K^+ в среде при фиксированной концентрации Na^+, вызывающих генерализованный *рост* величины *c* (плотности электронов) β- и γ-карбоксильных групп по всей поверхности клетки, что влечет за собой снижение их сродства к K^+ в пользу Na^+ и, соответственно, падение потенциала покоя; 3) влияние электроноакцепторных кардинальных адсорбатов (ЭАКА) на зависимость потенциала покоя от концентрации K^+ в среде при фиксированной концентрации Na^+ (к примеру, адреналина), вызывающих генерализованное *снижение* величины *c* (плотности электронов) β- и γ-карбоксильных групп по всей поверхности клетки, что влечет за собой увеличение их избирательности к K^+ в присутствии Na^+ и, соответственно, увеличение потенциала покоя. И, наконец, общий вывод состоит в том, что электропотенциал поверхности клетки в покое, или межфазных поверхностей внутри клетки, определяется степенью сродства фиксированных зарядов данной поверхности к тому или иному иону и/или плотностью этих фиксированных зарядов на ней; иначе говоря — сорбционными свойствами данной поверхности. Исходя именно из этого положения, следует трактовать влияние (или его отсутствие) вне- и внутриклеточных ионов на потенциал покоя клетки, в том числе и влияние состава раствора на потенциал покоя перфузируемых гигантских аксонов и других подобных клеточных моделей.

15.6. Потенциал действия

Потенциал действия, физическая основа мышечного и нервного импульса, представляет собой локальное изменение потенциала покоя, распространяющееся по поверхности клетки по принципу падающего домино.

1. Теория потенциала действия Ходжкина—Хаксли

Согласно учебникам, каждая клетка покрыта сплошным фосфолипидным бислоем, усеянным пронизывающими его частично или полностью белками. Предполагается, что в такой мембране имеются более широкие «натриевые каналы» (3×5 Å [249]) и более узкие «калиевые» (3 Å в диаметре [250]). И те, и другие закрыты, пока возбудимая клетка находится в покое. Это, как я уже говорил, суть жидкостно-мозаичной теории Зингера и Николсона [200], несовместимой с экспериментальными данными, приведенными в главе 13.

В 1952 году Ходжкин и Хаксли предложили теорию *потенциала действия* [251; 252], согласно которой его передний фронт — результат мгновенного перехода натриевых каналов в открытое состояние [251]. Поскольку в покое имеется постоянный (предсуществующий) трансмембранный «натриевый потенциал» ввиду гораздо большего уровня ионов Na^+ в среде, чем в клеточной воде (которую авторы считали свободной), ионы Na^+ стремительно входят в клетку, мгновенно обнуляя локальный мембранный потенциал покоя и, более того, меняя знак потенциала на внутренней стороне мембраны с минуса на плюс — так называемый «овершут» [252; 92, p. 378]. Сразу после этого натриевые каналы закрываются и открываются калиевые. Поскольку в покое имеется также постоянный (предсуществующий) калиевый потенциал ввиду гораздо более высокого уровня свободного (как считалось и считается) K^+ внутри нервного или мышечного волокна, чем в окружающей среде, открытие калиевых каналов освобождает путь клеточному K^+ наружу, что возвращает мембранный потенциал к исходному уровню, вызывая, в том числе, «следовые» колебания потенциала [251].

Как уже не раз подчеркивалось, и первая теория мембранных потенциалов Бернштейна, и более поздняя ионная теория Ходжкина столкнулись с целым рядом серьезных противоречий, среди которых: K^+ в клетке связан, а не свободен (раздел 10.2, п. 4); гипоте-

тический натриевый насос использует для своей работы гипотетическую энергию, потому что реальная клетка не способна выработать столько энергии, сколько этому насосу нужно (гл. 12); отсутствие модельных систем, работающих так, как того требуют постулаты мембранной теории (раздел 4.2, п. 3); нечувствительность потенциала покоя к ионам Cl^- и Mg^{2+}, несмотря на то, что и тот (раздел 12.9, п. 1.1), и другой [357; 503] (раздел 15.5, п. 2.2) легко проникают через мембрану; нечувствительность потенциала покоя к внутриклеточной концентрации K^+ (раздел 4.2, п. 1). Кроме того, существуют и веские свидетельства против конкретных утверждений теории *потенциала действия* Ходжкина—Хаксли [251; 252]. Рассмотрим два наиболее важные из них.

1.1. Постоянный натриевый потенциал в действительности существовать не может

Идея постоянно существующего натриевого потенциала казалась правдоподобной лишь до тех пор, пока не было доказано [36], что мембрана покоящейся клетки вполне проницаема для Na^+ (рис. 60, раздел 15.2, п. 1), и что клеточная вода отличается от обычной воды в том отношении, что является плохим растворителем для этого иона (раздел 11.3, п. 5). Поэтому, даже если на мгновение допустить существование такого потенциала, то уже в следующее мгновение от него не осталось бы и следа.

Чтобы изменить разность потенциалов в конденсаторе емкостью в одну микрофараду (что сопоставимо с емкостью мембраны клетки) на 120 мВ, требуется положительных зарядов в количестве $0{,}12 \times 10^{-6}$ кулон, что эквивалентно числу электрических зарядов, которое несут $1{,}2 \times 10^{-12}$ моль/см^2 одновалентных катионов, таких как Na^+ [237, p. 81]. По последним данным, скорость поступления Na^+ в покоящееся мышечное волокно лягушки при комнатной температуре составляет $6{,}87 \times 10^{-11}$ см$^2 \times$ с (см. работу [49, табл. IVB]). Разделив $1{,}2 \times 10^{-12}$ моль/см^2 на $6{,}87 \times 10^{-11}$ см$^2 \times$ с, мы обнаружим, что постоянный натриевый потенциал, если бы он существовал, исчезнет уже через *17 мс, при том* что гипотетические натриевые каналы, реагирующие на потенциал действия, будут все это время закрыты (см. обсуждение рис. 60 и 61). Имеющиеся экспериментальные данные и расчеты на их основе никак не вяжутся с представлением о том, что в покое эти (гипотетические) натриевые каналы закрыты. Возникновение потенциала действия происходит благодаря чему угодно, но только не открытию натриевых каналов, которые и без того всегда широко открыты (если в решете засорилось несколько отверстий, это никак не скажется на его пропускной способности).

1.2. Натриевые каналы в действительности не специфичны к Na^+

Для того чтобы служить заявленным целям, и натриевые, и калиевые каналы должны быть строго специфичными к своим ионам. Иначе при открытии натриевых каналов поступление в клетку Na^+ будет сведено к нулю *одновременным* выходом из нее K^+ через эти же каналы. Если так, то называть натриевые каналы натриевыми

станет бессмысленно. В результате не будет наблюдаемой в эксперименте *очередности* событий: сначала входит Na^+, а затем выходит K^+; не будет и соответствующих изменений мембранного потенциала; в итоге, не будет потенциала действия. В 1965 году Чандлер и Мевес [255] показали на аксоне кальмара, что структуры, называемые «натриевыми» каналами, пропускают в открытом состоянии и K^+. После таких фактов придерживаться ионной теории потенциала действия становится если не невозможным, то, по крайней мере, весьма затруднительным. А теперь обратимся к альтернативной теории.

2. Теория потенциала действия, основанная на механизме локализованной поверхностной адсорбции (ЛПА)

Согласно теории АИ, и у потенциала покоя, и у потенциала действия одна основа — *потенциал локализованной поверхностной адсорбции*. Это избавляет ее от необходимости бесконечно подправлять разваливающееся здание многочисленными перепланировками, пристройками и архитектурными излишествами, придавая ему все более эклектичный вид, как это приходится делать сторонникам мембранной теории и мембранных насосов, постоянно сталкивающихся с противоречиями [15, p. 462; 107, p. 273]. Кроме того, теорию ЛПА подкрепляют те искусственные модели, которые изначально были призваны подтвердить мембранную теорию, но при ближайшем рассмотрении эти надежды всякий раз не оправдывались.

Как читатель уже знает, высокий уровень K^+ в покоящейся клетке обусловлен его предпочтительной адсорбцией, а низкий уровень Na^+ — его слабой адсорбцией и плохой растворимостью в структурированной клеточной воде. Этот механизм работает повсюду — и на поверхности, и в толще цитоплазмы. Если так, то не существует никакого *постоянного* натриевого или калиевого потенциала (как их понимает мембранная теория), нет необходимости ни в каналах, ни во вратах, если их понимать как структуры, *изолирующие* внутреннюю среду клетки от внешней. Если бы можно было такие врата встроить и открыть, то это не вызвало бы потока Na^+ в покоящуюся клетку или выхода из нее K^+, так как состояние и движение этих катионов определяется совершенно другими факторами. С сорбционной точки зрения, потенциал действия — это последовательная смена *кратковременного локального натриевого потенциала (сорбционного и диффузионного) кратковременным локальным калиевым потенциалом (диффузионным)* с возвращением к потенциалу покоя.

Локальный *кратковременный* натриевый потенциал образуется, когда в ответ на какое-либо надпороговое воздействие на поверхности клетки распадается комплекс белок-кардинальный адсорбат в результате, например, ферментативного расщепления кардинального адсорбата, ответственного за поддержание поверхностных структур клетки в состоянии покоя (возможна также замена ЭАКА на ЭДКА, диссоциация такого ЭАКА как Ca^{2+} и т. п., в зависимости от

типа клетки или структуры). В результате одного из этих событий, каждое из которых протекает в соответствии с правилом «все или ничего», аналог величины *c* карбонильных групп полипептидного остова резко возрастает (возрастает плотность электронов на них), и дипольный момент связанных на этом участке поверхности клетки молекул воды снижается (ее молекулы деполяризуются), структура водных ассоциатов дестабилизируется и разрушается. Соответственно возрастает способность функциональных групп пептидных связей образовывать водородные связи с другими такими же группами, что приводит к появлению в белке вторичных структур (α-спиралей, например) или к увеличению их количества, к возникновению межбелковых водородных связей, и все это вместе способствует десорбции воды (рис. 44). В результате исчезает барьер, — структурированная вода, — удерживавший внешний Na^+ от вторжения в клетку, и «натриевые каналы» открываются.

С переходом полипептидной цепи из полноразвернутой, связывающей воду конформации, в свернутую происходит также повышение величины *c* (плотности электронов) на всех β- и γ-карбоксильных группах белков клеточной поверхности с соответствующим изменением их селективности: предпочтение к K^+ сменяется предпочтением к Na^+. С разрушением водного барьера Na^+ устремляется из среды в поверхностные слои клетки и легко вытесняет K^+, связь которого с фиксированными зарядами значительно ослабевает. Адсорбция Na^+ на карбоксильных группах приводит к появлению кратковременного натриевого адсорбционного потенциала (левая часть уравнения А24 приложения) и к дополнительному росту аналога величины *c* карбонильных атомов кислорода полипептидного остова по автокооперативному механизму (рис. 50, 51), что в еще большей степени ускоряет освобождение связанной воды в микроскопически тонком поверхностном слое клетки.

До сих пор мы рассматривали изменения сорбционных свойств β- и γ-карбоксильных групп белков клеточной поверхности при формировании потенциала действия. Теперь рассмотрим некоторые последствия, которые эти изменения неизбежно вызывают. При локальном разрушении водной преграды Na^+ среды устремляется в тонкий поверхностный слой клетки и в этот момент возникает временный, но значительный концентрационный градиент этого катиона. Появляется диффузионный натриевый потенциал (правая часть уравнения А24 приложения). Часть поступившего Na^+ связывается с фиксированными анионами и генерирует адсорбционный потенциал Na^+ (левая часть уравнения А24). В итоге, амплитуда потенциала действия (обнуление «мембранного» потенциала и овершут) является результирующей двух потенциалов: мощного диффузионного потенциала входного потока Na^+ и адсорбционного потенциала этого катиона. Для расчета величины диффузионного потенциала применимо уравнение Ходжкина—Катца—Гольдмана (см. выше уравнение (5)). После ударного вытеснения ионов K^+ ионами Na^+ в микроинтервале времени в микроскопически тонком поверхностном слое клетки возникает фракция свободного K^+ с высокой локальной концентрацией, превосходящей концентрацию K^+ в среде. Следовательно, взрывоподобно возникает концентрационный градиент этого катиона, по которому он устремляется из клетки в среду, генерируя, таким образом, диффузионный калиевый потенциал (правая часть уравнения А24 приложения), величину которого можно вычислить также с помощью уравнения (5). С появлением калиевого диффузионного потенциала амплитуда потенциала действия начинает спадать и быстро исчезает из-за того, что в микрообъемах поверхност-

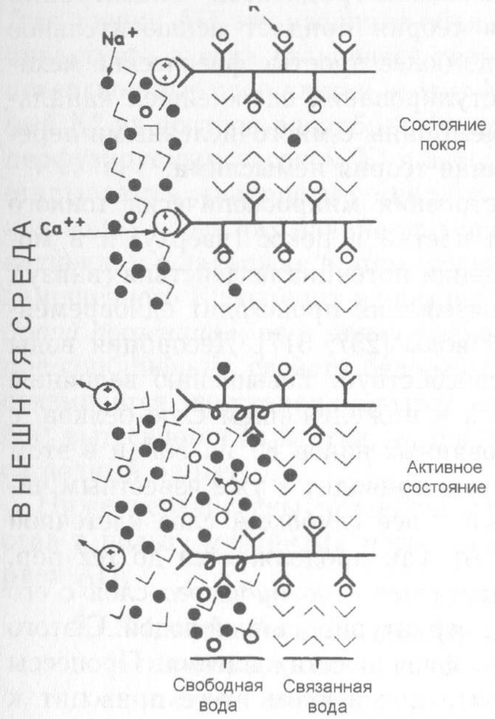


Рис. 71. Схематическое изображение участка поверхности возбудимой клетки в состоянии покоя (вверху) и в состоянии активности (внизу). На поверхности покоящейся клетки регуляторные кардинальные центры заняты кардинальным адсорбатом — Ca^{2+}. Поверхностные β- и γ-карбоксильные группы клетки избирательно адсорбируют K^+ (светлые кружки) в присутствии Na^+ (темные кружки), а NH- и CO-группы полипептидного остова полноразвернутых белковых цепей адсорбируют молекулы воды (∧), образующие многослойные регулярные структуры. Высвобождение Ca^{2+} из кардинальных центров влечет за собой автокооперативный переход системы в *активное состояние*, в котором повышается *величина c* β- и γ-карбоксильных групп, что переключает их ионную избирательность на Na^+. Одновременно повышается и *аналог величины c* карбонильных атомов кислорода полипептидного остова, что увеличивает склонность CO-групп пептидных связей образовывать α-спиральные водородные связи с соответствующими NH-группами пептидных связей (физический смысл роста величины *c* и его аналога состоит в увеличении плотности электронов на соответствующих группах). При увеличении электронной плотности на CO-группах полипептидного остова их поляризующее действие на связанные с ними молекулы воды ослабевает, и дипольный момент последних снижается. Это дестабилизирует многослойные водные ассоциаты, и они разрушаются, вода десорбируется. Десорбция воды открывает путь ионам Na^+ из среды в клетку. Поступая в нее, Na^+ выбивает ионы K^+ из связи с β- и γ-карбоксильными группами. О возникновении при этом адсорбционных и диффузионных потенциалов, а также о набухании верхних слоев клетки (на рис. не показано) см. текст. (По Лингу [317]).

ных слоев клетки диффузионное равновесие устанавливается очень быстро. Вслед за этими событиями поверхность клетки начинает возвращаться в состояние покоя: кардинальные адсорбаты (например, Ca^{2+}) вновь занимают свое место на белках и, как следствие, β- и γ-карбоксильные группы вновь начинают селективно связы-

вать K^+. Молекулы «возбудимых» белков распрямляются и вновь начинают связывать воду. Появившаяся структурированная вода вытесняет Na^+ из поверхностного слоя клетки в среду. Потенциал покоя клетки восстанавливается. Таким образом, в формировании потенциала действия принимают участие и свободные катионы, временно появляющиеся в весьма ограниченном пространстве поверхностного слоя клетки, и связанные (см. уравнение А24 приложения). Стремительность автокооперативных перестроек белков, высокая подвижность свободных K^+, Na^+ и воды, микроскопические объемы, в которых разыгрываются события, объясняют высокую скорость течения процессов и значительные диффузионные потенциалы. Таким образом, для объяснения возникновения градиентов концентраций ионов (которым конкурирующая теория придает исключительное значение) можно привлечь гораздо более простые физические механизмы вместо вынужденного постулирования сложнейшей канально-воротно-насосной структуры мембраны с многочисленными переносчиками, без которых мембранная теория немыслима.

На рис. 71 показана схема строения микроскопически тонкого поверхностного слоя возбудимой клетки в покое (вверху) и в момент возникновения или прохождения потенциала действия (внизу). Обмен K^+ на Na^+ на центрах связывания происходит одновременно с высвобождением связанной воды [257; 317]. Десорбция воды в верхнем молекулярном слое способствует повышению величины *с* β- или γ-карбоксильных групп и в нижележащем слое белков, с последующей заменой адсорбированных ионов K^+ на Na^+ и в этом слое. Опять десорбируется вода, что приводит к уже известным читателю последствиям в этом, уже более глубоком, слое клеточной поверхности (см. раздел 14.3, п. 6). Так продолжается до тех пор, пока волна свободного Na^+ не достигнет *невозбудимого* слоя с его непроницаемой для этого катиона структурированной водой. С этого переломного момента начинается фаза восстановления. Процессы приобретают обратное течение, что в конечном итоге приводит к возвращению поверхности клетки в исходное состояние покоя. Образно потенциал действия можно представить в виде кольца из свободной воды поверхностного слоя, опоясывающего нервное волокно, бегущего вдоль «замерзшего» аксона или мышечного волокна.

Как мы уже знаем, кратковременная деполяризация воды на поверхности клетки с одновременным ростом величины *с* β- и γ-карбоксильных групп сопровождается временным увеличением их сродства к Na^+ по сравнению с K^+. Однако необходимо обратить внимание на то, что эта избирательность к Na^+ не абсолютна, а *относительна*, точно так же, как и избирательность к ионам K^+ в покоящейся клетке. При удалении K^+ из окружающей среды те же самые β- и γ-карбоксильные группы, которые в покое заняты ионами K^+, станут связывать Na^+, о чем свидетельствует рис. 57. Косвенно это подтверждает и следующий эксперимент: если удалить из внутренней и внешней среды аксона кальмара ионы Na^+ и заменить их на K^+, то ионы K^+ возьмут на себя роль ионов Na^+ и, в соответствии с этой ролью, начнут проникать в аксон через классические «натриевые каналы», как показали Чандлер и Мевес [255] (раздел 5.6, п. 1.2).

Результаты опытов Чандлера и Мевеса резко расходятся с теорией потенциала действия Ходжкина—Хаксли и хорошо согласуются с теорией АИ. К сказанному об этом выше можно добавить, что Чандлер и Мевес не наблюдали на *перфузируемом* аксоне задержки выхода K^+ из аксона в среду при прохождении потенциала действия. Если на интактном аксоне K^+ начинал выходить в среду только *после* входа Na^+, то на перфузируемом препарате выход K^+ начинался *одновременно* с возникновением потенциала действия. Для теории АИ это различие объяснимо: K^+ в поверхностных слоях интактного аксона становится свободным только после того, как в поверхностные слои клетки входит Na^+, который и вытесняет *связанный* K^+ из центров адсорбции (раздел 10.2, п. 3) [256], а в опытах с перфузируемым аксоном K^+ в аксоне *свободен*. Поэтому, как только открываются «натриевые каналы» (разрушается структурированная вода), через них начинают движение в обоих направлениях оба катиона, и о задержке в этом случае говорить не приходится. Часть замещенного K^+ выходит из интактной клетки, чем объясняется *следовой потенциал*, но к этому времени начинается уже восстановление сорбционных свойств белкового матрикса: K^+ вновь селективно связывается, восстанавливаются многослойные водные ассоциаты, Na^+ вытесняется из клетки, на поверхности которой вновь появляется водный барьер.

Ниже перечислены независимые экспериментальные свидетельства в пользу механизма потенциала действия, предлагаемого теорией АИ.

2.1. Идентификация анионных групп, определяющих ионную проницаемость и потенциал покоя, как β- и γ-карбоксильных групп поверхностных белков клетки

Еще задолго до публикации теории АИ в 1962 году я наделил β- и γ-карбоксильные группы клеточной поверхности двумя функциями: они рассматривались в качестве фиксированных зарядов, обеспечивающих избирательную проницаемость клетки для ионов и потенциал покоя [217; 219; 244]. В 1965 году Линг и Оксенфельд доказали, рассчитав значение pK (равное 4,6–4,7), что именно β- и γ-карбоксильные группы являются теми анионными группами, которые ответственны за поступление K^+ в покоящиеся мышечные волокна лягушки [222]. Ранее, на основе предварительных данных, я также пришел к выводу, что анионные группы, обеспечивающие потенциал покоя мышцы лягушки, имеют pK, близкое к указанному выше (около 4) [107, pp. 288–289].

Эдельман, изучая мышечные волокна Пуркинье морской свинки, получил новые доказательства тому, что поверхностные группы, создающие потенциал покоя, и группы, контролирующие проницае-

мость ионов, — это одни и те же β- и γ-карбоксильные группы [246]. Этот вывод следовал из факта количественной связи между деполяризующим влиянием ионов Rb^+, K^+ и Cs^+ на потенциал покоя и их константами локализованной адсорбции; обе группы данных были получены в ходе экспериментов с проницаемостью (раздел 15.5, п. 2.4).

2.2. Ионная избирательность β- и γ-карбоксильных групп клеточной поверхности способна изменяться от одного иона к другому, а в ионной теории избирательность соответствующих структур неизменна

Ходоровым получены доказательства изменчивости ионной избирательности поверхности нервного волокна [261; 107, Fig. 11, 19]. Это нежелательно для мембранной теории, так как допущение способности натриевых каналов превращаться в калиевые или еще какие-нибудь создает для этой теории огромные трудности.

2.3. Анионные группы, опосредующие поступление Na^+ в аксон альмара при потенциале действия, — это те же самые β- и γ-карбоксильные группы, только с возросшей величиной c (возросшей плотностью электронов)

В теории АИ величину *c* анионной группы кислородсодержащей кислоты можно определить по ее pK, а также по тому порядку, в который выстраиваются ионы щелочных металлов по их сродству к данному фиксированному аниону. Значение pK β- и γ-карбоксильных групп, опосредующих поступление K^+ в *покоящуюся* мышцу лягушки, как уже было сказано, составляет 4,6–4,7 [222]. pK тех же кислотных групп в момент входного потока Na^+ при потенциале действия выше, как это и предсказывается теорией АИ. Так, по данным Хилле, для аксона кальмара эта величина составляет 5,2 [258; 259], а по данным Стиллмана с сотр. — 6,5 [260]. Все полученные значения pK (и 4,6–4,7, и 5,2, и 6,5) укладываются в диапазон известных значений pK β- и γ-карбоксильных групп, который простирается от 3,65 до 7,3 [120; 121]. Полученные значения pK и обратимость изменений этого параметра [258; 259] согласуются с теорией АИ в том, что именно изменение величины *c* одних и тех же β- и γ-карбоксильных групп определяет изменение их ионной избирательности. Простым и очевидным подтверждением этому служат изменения порядка ионов щелочных металлов в рядах селективности к ним β- и γ-карбоксильных групп в зависимости от величины их pK.

Так, катионы располагаются в следующем порядке по избирательности к ним поверхностных β- и γ-карбоксильных групп мышцы лягушки *в покое* при 25 °C: $Rb^+ > Cs^+ > K^+ > Na^+$ [222]; а в покоящейся сердечной мышце морской свинки: $Rb^+ > K^+ > Cs^+$ [246]. Оба порядка соответствуют относительно низкой величине *c* (около −4,0 Å, рис. 42). А вот как выглядит порядок селективности *активированной* поверхности гигантского аксона кальмара по данным

Хилле: $Li^+ = Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$ [259], который соответствует более высокой величине *c* (около −3,0 Å, рис. 42); и по данным Чандлера и Мевеса: $Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$, при этом проницаемость для ионов в сравнении с Na^+ (проницаемость для которого принята за 1) составила 1,1 (Li^+) > 1,0 (Na^+) > 0,083 (K^+) > 0,025 (Rb^+) > 0,016 (Cs^+) [255]. Такой порядок соответствует еще большему значению величины *c* — около −2,65 Å (напомню, что в принятой системе расчетов величина *c* является алгебраической величиной, и ее физический смысл — плотность электронов: чем больше величина *c*, тем больше плотность электронов).

Чтобы понять физиологический смысл относительной *проницаемости* в данных Чандлера—Мевеса, необходимо вспомнить, что соотношение констант адсорбции двух катионов на поверхностных центрах, лежащее в основе интересующего нас того или иного порядка селективности, может быть в первом приближении приравнено к соотношению их проницаемости. Убедиться в этом можно, сравнивая уравнения А16 и А10, учитывая при этом тот факт, что адсорбционно-десорбционная диффузия — предпочтительный путь проникновения в клетку большинства катионов (см. рис. 37).

2.4. Набухание нервного волокна во время потенциала действия

В разделе 15.3, п. 1 я показал, как изотонический раствор KCl, в противоположность изотоническому NaCl, вызывает набухание интактных мышечных волокон потому, что β- и γ-карбоксильные группы имеют большее сродство к K^+, чем к Na^+, в том числе и те из них, которые участвуют в солевых связях с фиксированными анионами, благодаря которым поддерживается нормальный объем клетки. Однако повреждение клетки влечет за собой утрату ее главного ЭАКА — АТФ. В результате происходит повышение величины *c* карбоксильных групп белков клетки, а значит, и сдвиг их селективности в пользу Na^+. В результате, в клетке резко возрастает количество свободного Na^+ и воды. Na^+ разрывает внутри- и межбелковые солевые связи, образованные фиксированными зарядами. Клетка набухает (рис. 63).

Как уже знает читатель, потенциал действия теория АИ объясняет временным увеличением селективности β- и γ-карбоксильных групп белков поверхности клетки к Na^+ с последующим увеличением его концентрации в ее поверхностных слоях. Это дает основание для предсказания: поскольку часть поверхностных β- и γ-карбоксильных групп участвует (как и повсюду в клетке) в образовании солевых связей, поддерживающих нормальный объем клетки, то увеличение концентрации Na^+ при потенциале действия должно приводить к разрыву части этих связей и, соответственно, к набуханию поверхностных слоев клетки, например, аксона.

И действительно, по результатам серии искуснейших экспериментов на изолированных нервных волокнах краба Тасаки и Исава с сотрудниками сообщили о кратковременном набухании аксонов при прохождении потенциала действия [523; 524].

2.5. Распространяющейся волне изменения селективности поверхностных β- и γ-карбоксильных групп сопутствует деполяризации молекул воды у поверхности клетки

Теория АИ утверждает, что если при развитии потенциала действия проницаемость поверхностных слоев клетки возрастает к Na^+, то она должна возрастать и к другим ионам и молекулам — в том числе и крупным молекулам, проницаемость для которых была невелика в состоянии покоя, когда на поверхности клетки имелась структурированная вода (раздел 13.7, рис. 41).

Виллегас, Блей и Виллегас в точности подтвердили этот прогноз теории АИ в 1965 году [262]. Они показали, что в зоне развития потенциала действия наблюдается кратковременное резкое увеличение проницаемости аксона кальмара для молекул таких веществ, как эритритол, маннит и сахароза (табл. 6). Более того, ими было

Таблица 6

Вещество	Проницаемость в 10^{-2} см/с [а]			
	Аксон в состоянии покоя (аксон *a*)	Аксон, стимулировавшийся электрическими импульсами с частотой 25/с (аксон *b*)	Увеличение проницаемости аксона при электростимуляции (парные данные) ($b - a$)	Проницаемость активированной поверхности аксона [б]
Эритритол	3,6 ± 0,4	6,1 ± 1,0	2,5 ± 0,8	110
Маннит	2,3 ± 0,4	4,0 ± 0,5	1,7 ± 0,3	75
Сахароза	0,9 ± 0,1	1,8 ±0,3	0,9 ± 0,3	40

Скорость поступления эритритола, маннита и сахарозы (меченых C^{14}) в аксоны кальмара в состоянии покоя и при электростимуляции.

[а] Значения представляют собой среднее из десяти пар (контроль/опыт) нервных волокон ± стандартная ошибка эксперимента.

[б] Проницаемость возбужденного участка аксона рассчитывали на основе данных об увеличении поступления исследуемого вещества в препарат при электростимуляции ($b - a$), исходя из общего количества вызванных потенциалов действия и из предположения, что изменение проницаемости длилось 1 мс при прохождении каждого из них. (По Виллегасу и др. [262]).

показано, что увеличение проницаемости к столь крупным молекулам происходит лишь в присутствии в среде ионов Na^+, которые, согласно теории АИ, играют важную роль: вытесняя адсорбированный K^+, они ускоряют разрушение барьера из адсорбированной воды. Трудно переоценить важность этой работы, с такой ясностью и очевидностью продемонстрировавшей ключевую роль структурных перестроек воды в механизме развития потенциала действия.

ГЛАВА 16.

ИТОГИ

Эта глава — больше, чем обычное резюме. В ней мы должны будем не только вспомнить сказанное, но и бросить взгляд на физиологию клетки с высоты нового понимания ее ключевых проблем. Это будет сведением мыслей и фактов в один фокус, в котором должно быть разрушено все непрочное, фальшивое и предвзятое.

16.1. Начало истории

16.2. Мембранная теория

16.3. Первые физиологи протоплазматического направления

16.4. Теория фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ)

16.5. Теория многослойной организации поляризованной воды (МОПВ) в клетке

16.6. Теория ассоциации-индукции

16.7. История поиска сущности жизни на клеточном и протоплазматическом уровне

16.1. Начало истории

В первой главе мы узнали о том, как была открыта живая клетка. Уже вскоре вслед за этим родилась физиология клетки. Однако вопрос о *сущности жизни* волновал людей задолго до этого.

Фалес (ок. 640—548 гг. до н. э.), известный как первый натурфилософ Запада, признавал *воду* первопричиной мироздания [309, p. 22; 526]. Гиппон из Самоса (450 г. до н. э.) представлял жизнь как воду [309, p. 19]. Гераклит (500 г. до н. э.) и Демокрит (420 г. до н. э.) считали, что человеческое тело состоит, кроме воды, из земли и огня [309, p. 56].

Однако, помимо идей о *жизни как воде* или *огне*, у древних греков были и другие философские соображения по поводу жизни. Анаксимен (ок. 550 до н. э.), и Аристотель (384—322 до н. э.), к примеру, приравнивали жизнь к *организации, или форме* [309]. Отголоском этого представления можно считать «*état de chose*» Ламарка, упомянутое в разделе 14.2, п. 1, а также *состояние жизни* Лепешкина.

Однако *движение*, наиболее яркое проявление жизни, не всеми принималось как ее непременный атрибут. Согласно историку Томасу Холлу, причиной такого пренебрежения было смешение понятий «жизнь» и «душа», последнему из которых и приписывались *все виды* движений [309, p. 267].

Лишь в XVII веке Декарт (1596—1650) отверг душу как первопричину движения животных и растений, и принялся искать его подлинный источник [309, p. 268]. Одно направление этого поиска слилось с путем, идущим от только что упомянутого представления о *жизни как огне*. В рамках несколько иного направления Дютроше (1776—1847), возможно, первый в истории физиолог-экспериментатор, приравнял жизнь к движению.

Парацельс (1493—1541) и Френсис Бэкон (1561—1626) полагали, что жизнь — это огонь. Парацельс впоследствии предположил, что некая составляющая воздуха необходима как обычному огню, так и Flama vitalis (*живому огню*). В 1774 году Джозеф Пристли (1733—

1804) поймал эту «некую составляющую», однако не сразу понял значение своего открытия. Сначала он решил, что это просто более чистый вид воздуха, или дефлогистированный воздух [529, p. 144], но после горячих споров со своим заклятым оппонентом — Антуаном Лавуазье (1743—1794) [527; 346] с восторгом принял его точку зрения.

Согласно Лавуазье, то, что Парацельс называл живым огнем — это *дыхание* [527]. При дыхании, как и горении, расходуется не *флогистон* сжигаемого вещества, представление, отстаивавшееся Георгом Шталем (1659—1734) [352, p. 122] и принятое в то время, а горючее вещество и вещество, открытое Пристли, которое Лавуазье переименовал в кислород. Теперь горение представляло собой химическую реакцию, и уже не было ничего удивительного в том, что и обычный, и «живой» огонь расходуют кислород, а производят двуокись углерода.

Луи Пастер (1822—1895) доказал, что жизнь может существовать и без кислорода [528]. В анаэробной среде дрожжевые клетки при ферментации образуют спирт, тогда как животные клетки при гликолизе — молочную кислоту [128]. В результате напряженной работы множества талантливых биохимиков Ломанн в 1929 году открыл АТФ [272] — конечный продукт любого энергетического обмена, как аэробного, так и анаэробного.

В 1941 году Липман предложил теорию *высокоэнергетических фосфатных связей*, которая завоевала большую популярность, однако имела незавидную судьбу [132]. Всего через 15 лет Подольский и Моралес, воспользовавшись более точными средствами измерения, доказали отсутствие исключительно высокого содержания энергии в фосфатных связях АТФ [133].

Таким образом, крах теории высокоэнергетических фосфатных связей замыкает собой целый ряд провалившихся попыток объяснить энергообеспечение физиологических функций. Теорию мышечного сокращения Энгельмана — теорию теплового двигателя [347] — опроверг Фик простым сопоставлением доводов теории и законов термодинамики [383; 530, p. 144]. Теория мышечного сокращения Хилла — теория молочной кислоты [357] — не устояла после опытов Лунсгора, показавшего, что мышца способна к нормальным сокращениям и после обработки иодуксусной кислотой, то есть без образования молочной кислоты [372; 530, p. 145]. Опровержение теории, что аккумулятором энергии является АТФ, поставило биологические науки в столь безвыходное положение, что им оставалось только одно — не замечать самого факта опровержения. Однако проблема энергетического кризиса решается, если отступить от привычных схем и попробовать разобраться в теории ассоциации-индукции (АИ).

Вначале новое объяснение роли АТФ как источника энергии для физиологических процессов было предложено теорией АИ, представлявшей тогда собой составную часть теории фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ). При этом АТФ не приписывалось свойств, противоречащих закону сохранения энергии или элементарным фактам. Напомню, что этот закон был открыт физиологом-физиком Германом фон Гельмгольцем в возрасте всего 26 лет [352, p. 213]. Позднее соотношение теорий АИ и фиксированных зарядов претерпело изменения.

16.2. Мембранная теория

Вполне возможно, что именно из-за низкой разрешающей способности первых микроскопов основатель клеточной теории Теодор Шванн пришел к ошибочному представлению о клетке как о водном растворе, заключенном в емкость из некой мембраны. Ошибка Шванна вскоре была исправлена гистологами. Однако физиологи продолжали заблуждаться на этот счет.

Первой всеохватывающей теорией в физиологии клетки стала мембранная теория, автором которой часто называют Вильгельма Пфеффера (сомнения по поводу правомерности такого вывода см. в главе 3). Сторонники этой теории, исходя из все того же предположения Шванна — что клетки представляют собой сосуды с разбавленным раствором электролитов и других соединений и что клеточная мембрана проницаема для воды, но *всегда* непроницаема для таких веществ, как сахароза и NaCl, — объясняли, казалось успешно, четыре фундаментальных свойства клетки: избирательную проницаемость, избирательное накопление и выведение веществ, регуляцию объема клетки и электрические потенциалы.

Но подкупающая простота мембранной теории оказала науке медвежью услугу (как кто-то верно подметил, не так благотворна истина, как зловредна ее видимость). Когда Насонов, Айзенберг и Камнев в своих обезоруживающе простых опытах показали, что клеточная мембрана на самом деле проницаема для сахарозы и галактозы, парадигме об уникальных свойствах мембраны был нанесен опасный удар.

В условиях тяжелого кризиса появилась идея о натриевом насосе. Однако только натриевого насоса оказалось недостаточно. Чтобы сохранить теорию на плаву, список насосов пришлось продолжить, и он регулярно пополняется по сей день. Но, как было установлено, и этот анализ остается неопровергнутым до сих пор, для работы одних только натриевых насосов необходимо в *15—30 раз* больше энергии, чем та, которую клетка в действительности может выработать. А как же другие насосы? А как другие энергетические потребности клетки? Опять мембранная теория оказалась в тупике, и выход из него остается неясным на протяжении вот уже нескольких десятков лет.

Однако нехватка энергии — далеко не единственное свидетельство против теории мембранных насосов и того строя мыслей, который их породил. Да, несоответствие закону сохранения энергии — самое вопиющее расхождение между теорией и фактами. Несмотря

на это, часть мембранной теории, а именно, положение о существовании наружной протоплазменной кожи, или клеточной мембраны, наделенной фантастическими свойствами, которое отстаивал еще Пфеффер, продолжает жить в сознании исследователей. Но и в этой части теория требует серьезной доработки по сравнению с общепринятыми представлениями на том простом основании, что клеточная мембрана не *полупроницаема* (согласно оригинальному определению Вант-Гоффа) и не является ключевым звеном в механизме осморегуляции. Список принципиальных недостатков мембранной теории будет приведен в разделе 16.6, п. 3.2.

16.3. Первые физиологи протоплазматического направления

В начале XX века, когда мембранная теория, казалось, безраздельно властвовала умами ученых, целый ряд независимо мыслящих исследователей имел смелость выдвинуть совершенно иные концепции структуры и функции клетки. Несмотря на некоторые различия, Фишер, Мур, Роуф, Лепешкин, Насонов, Эрнст и другие, вплоть до Трошина, сходились в одном: то, что сторонники мембранной теории считали исключительным свойством клеточной мембраны, на самом деле является свойством всей протоплазмы и любой ее части.

Если быть точным, внимание первых физиологов протоплазматического направления было сосредоточено на *двух* из четырех вышеупомянутых фундаментальных проблем физиологии клетки: *распределении веществ* между клеткой и средой и *регуляции объема*. При этом *проницаемость клеток* и *электрические потенциалы* остались, по большому счету, в тени. Насонов отвергал даже само существование клеточной мембраны (вместе с ее *избирательной проницаемостью*), а также *потенциала покоя* [86, p. 164; 178] (здесь — глава 8).

Эти первые физиологи в качестве искусственной модели протоплазмы часто выбирали желатин. Они считали, что и протоплазма, и желатин — коллоиды. Лепешкин и Трошин утверждали, что клетка представляет собой особый вид коллоида — *коацерват*. Еще Овертон приводил доказательства, что, по меньшей мере, часть клеточной воды представляет собой *имбибирующую* («Quellungswasser»), связанную воду.

Интересную идею, что именно внутриклеточная адсорбция является причиной накопления клетками таких веществ, как K^+, в концентрации *выше*, чем в окружающей среде, впервые предложили в 1908 году независимо друг от друга Бенджамин Мур с Гербертом Роуфом [77] и Мартин Фишер [78]. Фишер, кроме того, объяснял более *низкую* концентрацию ряда веществ в клетке по сравнению с окружающей средой «законом распределения» вещества между средой и клеткой. Это было для физиологии того времени прорывом, но Фишер не стал развивать эти представления, и они остались в истории науки только в виде краткого комментария, сделанного им в пространной работе, посвященной отеку [78].

Впоследствии Трошин объединил взаимосвязанные явления адсорбции веществ и их частичного вытеснения в двухчленном уравнении Трошина (уравнение А1 в приложении). Он показал, что этому уравнению подчиняется распределение разных неэлектролитов между средой и *комплексным коацерватом* (желатина и гуммиарабика) с одной стороны, и клеткой — с другой.

Физиологии протоплазматического направления был нанесен тяжелейший удар, как многие подумали, неопровержимыми опытами Хилла, и позднее — убедительной демонстрацией Ходжкиным и Кейнсом свободного состояния K^+ в клетке. Итог этого этапа истории состоял в признании, что клеточная вода не отличается от обычной, а клеточный K^+ свободен. Неспособность первых коллоидных химиков опровергнуть выводы Хилла и предложить более внятное определение коллоидов и коацерватов (то есть предложить более основательные критерии, чем только размер ассоциатов или частиц), а также объяснить отличие желатина от глобулярных белков, также ослабляла позиции физиологов коллоидного направления. Это видно из следующего, относительно недавнего, высказывания противников коллоидного подхода: «Помимо чисто технических сложностей, химия белков пострадала от пагубного воздействия безосновательной идеи, которую можно назвать *коллоидной концепцией*» [538, p. 4] (курсив оригинала).

16.4. Теория фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ)

Мембранная теория до своего крушения опиралась на великие теории Аррениуса, Дебая, Хюккеля, Вант-Гоффа, блестяще объяснившие свойства разбавленных растворов электролитов и других веществ. У первых физиологов протоплазматического направления не было такой мощной опоры. И Карл Людвиг, и Мартин Фишер открыто сетовали на скудость знаний в области физической химии. Однако к тому времени, когда я стал физиологом, ситуация существенно улучшилась. Статистическая механика, химия белков, коллоидная химия, химия полимеров уже либо вошли в стадию зрелости, либо вступали в нее. Именно прогресс науки дал мне возможность, которой были лишены мои предшественники, — возможность предложить разумные физико-химические механизмы, на которые должны опираться наши представления о физиологии клетки, и, в конце концов, выдвинуть всеохватывающую физико-химическую теорию самой жизни — *теорию ассоциации-индукции*.

Кроме того, как раз вовремя появились новые ценные экспериментальные методы. Например, метод меченых атомов и капиллярные микроэлектроды Джерарда—Грэхем—Линга. Так, опровергнуть теорию натриевого насоса ввиду ее энергетической несостоятельности (глава 12) удалось лишь благодаря двум этим методам.

После публикации в 1952 году ТФЗЛ еще десять лет мне потребовалось на разработку теории ассоциации-индукции (АИ). Для удобства я разделю эту последнюю теорию на две части: *ассоциацию* и *индукцию*. Начнем с ассоциации.

Самыми значительными по массе составляющими клетки являются вода и белки. Самыми многочисленными по количеству частиц — вода и K^+. *Ассоциация* K^+ с белками — лейтмотив ТФЗЛ, представленной в главе 10; *ассоциация воды* с белками — главный предмет теории МОПВ, изложенной в главе 11.

Первый вопрос, которым задалась ТФЗЛ, касается собственно процесса *ассоциации*. Почему K^+, к примеру, должен связываться с фиксированными анионными группами, когда нам известно, что при этой же ионной силе K^+ *не ассоциируется* с такими же анионными группами, если они принадлежат веществам в растворе? Насколько мне известно, ТФЗЛ первой дала ответ на этот вопрос.

Было предложено два механизма усиления ассоциации при взаимодействии ионов с *фиксированными центрами адсорбции*: *электростатический* и *кинетический*. Первый заключается в уменьшении энтропии диссоциации в результате усиления электростатического взаимодействия фиксированного заряда с ионом из-за перекрытия электрических полей в среде с высоким содержанием фиксированных зарядов (по сравнению с разбавленным раствором). Согласно второму механизму, фиксация центра адсорбции в пространстве, по крайней мере, вдвое снижает энергию столкновений ассоциата с молекулами растворителя и другими ионами и молекулами в растворе, резко увеличивая время жизни ассоциата. Эта закономерность распространяется на адсорбцию как ионов, так и незаряженных молекул. Ко времени публикации ТФЗЛ замечательному *эксперименту* Керна, показавшему усиление ассоциации противоионов при фиксации одного из зарядов, исполнилось уже четыре года [469].

ТФЗЛ также впервые предложила: 1) *количественный механизм* избирательной адсорбции ионов K^+ в присутствии Na^+; 2) гипотезу внутри- и межмолекулярных солевых связей (между фиксированными анионами и катионами), объясняющую неудачи предыдущих попыток показать избирательную адсорбцию K^+ *изолированными* белками; 3) ответ на вопрос, почему K^+ утрачивается клеткой при ее гибели, основанный на *еще не завершенной* теории функционирования АТФ как *главного кардинального адсорбата*.

Чтобы изложить принципиальные положения ТФЗЛ на симпозиуме в Балтиморе в 1952 году, потребовалось меньше часа. Для ее экспериментального обоснования потребовалось более 40 лет. Итог этой работы будет рассмотрен ниже.

При помощи только что созданного тогда препарата БНК (рис. 7) я показал, что субстратом, обеспечивающим избирательное накопление K^+ (*и вытеснение* Na^+) в мышечных волокнах лягушки, является цитоплазма, а не клеточная мембрана (с ее гипотетическими насосами). Указанием на адсорбированное состояние клеточного K^+ и на природу центров, связывающих его, является шесть групп экспериментальных данных, взаимодополняющих друг друга: низкая внутриклеточная электропроводность; резко сниженная подвижность клеточного K^+; изменение тонкой структуры полосы поглощения рентгеновского излучения клеточным K^+; слишком большие различия коэффициентов активности K^+, определяемых внутриклеточным K^+-специфичным микроэлектродом в разных клетках, если считать, что этот ион везде свободен; накопление K^+ в клетках протекает в соответствии с изотермой Ленгмюра, что означает его достаточно прочное связывание с центрами адсорбции в соотношении 1 : 1; идентификация большинства K^+-адсорбирующих центров как β- и γ-карбоксильных групп, содержащихся соответственно в остатках аспарагиновой и глутаминовой кислот в составе миозина мышечных волокон лягушки.

Начнем с теории и фактов, касающихся *ассоциации* внутриклеточной воды.

16.5. Теория многослойной организации поляризованной воды (МОПВ) в клетке

Согласно теории МОПВ, практически вся вода в клетке объединена в единую динамичную структуру, в отличие от разрозненных в своем большинстве молекул обычной воды. Такая структура является результатом ее взаимодействия с сетью полноразвернутых белковых цепей, пронизывающих всё тело клетки. Карбонильные (CO) и иминогруппы (NH), доступные воде, представляют собой закономерно чередующиеся отрицательно заряженные N-центры (отрицательные полюса диполей карбонильных групп) и положительно заряженные P-центры (положительные полюса диполей иминогрупп). Геометрически правильная последовательность этих N- и P-центров у всех белков, их стерическое соответствие (комплементарность) молекуле воды создают особые условия для ее адсорбции. Сначала образуется первый слой молекул воды, являющихся диполями. Их дипольный момент при взаимодействии с диполями пептидной связи возрастает (то есть они поляризуются), что является важнейшим следствием такого взаимодействия. Благодаря поляризации возрастает сила водородных связей, а с ними — прочность тех структур, в которых они участвуют. В данном случае возрастает стабильность ассоциатов белок-вода, а затем и вода-вода (в слоях, удаленных от белка). Первый слой воды, сформировавшийся на структурной матрице из N- и P-центров, обладает правильной структурой и «притягивает» к себе другие молекулы воды, формируя из них следующий упорядоченный слой молекул. В результате такой самосборки могут возникать многослойные прочные структуры из поляризованной воды, свойства которой существенно отличаются от свойств обычной, объемной, воды. В результате «кристаллизации» воды вокруг полипептидных остовов белков вся или почти вся вода клетки становится поляризованной и структурированной.

С позиций теории МОПВ, полноразвернутые белки клетки сходны по своим свойствам с белками, постоянно находящимися в развернутом состоянии (например, желатин), либо принимающим (частично или полностью) такую конформацию под действием де-

натурирующих агентов (например, мочевины, гуанидина гидрохлорида, NaOH). И, наоборот, свернутые, глобулярные, белки не имеют ничего общего или мало общего с полноразвернутыми белками [107, p. 37, п. 5]. Это предсказание позволило выделить два вида моделей, позволяющих воспроизводить те или иные свойства клетки. *Экстравертные* модели, подобные желатину, имитируют полноразвернутые белки клетки, постулируемые теорией МОПВ; *интровертные* модели, к которым относится большинство так называемых нативных (глобулярных) белков, ведут себя совсем иначе.

Еще одно следствие теории МОПВ: подвижность молекул воды в клетках и в экстравертных моделях *ограничена*, а в интровертных моделях не отличается от подвижности объемной воды. Это предположение подверглось проверке во многих лабораториях. Исследования методом ЯМР *времени вращательной корреляции* протонов воды, ультравысокочастотные диэлектрические исследования *времени переориентации Дебая* молекул воды, а также изучение методом квазиупругого рассеяния нейтронов *коэффициента вращательной диффузии* молекул воды привели *к одному и тому же* выводу: подвижность молекул воды (и протонов) в клетках и в экстравертных моделях ниже, чем в обычной воде.

Кроме того, более детальное изучение *сходства* клеток с экстравертными моделями и их *отличий* от интровертных показало, что к числу общих свойств клеток и моделей в отношении состояния воды в них следует отнести и следующие: *осмотическую активность макромолекул в полноразвернутой конформации*, *понижение температуры замерзания*, сходные характеристики *поглощения пара при его парциальном давлении, близком к насыщению*, но в первую очередь — это способность структурированной воды *вытеснять растворенные вещества* и из клеток, и из экстравертных моделей.

При помощи количественной теории распределения веществ, созданной в 1993 году, я показал, что незначительное, казалось бы, увеличение теплоты парообразования связанной воды всего на 126 кал/моль (на общем фоне в 9717,1 кал/моль для обычной воды — рост на 1,3%), обусловленное поляризацией молекулы воды при взаимодействии с белком, может количественно объяснить явление, всегда волновавшее умы физиологов — вытеснение сахарозы и Na^+ из клеток.

Теория МОПВ, в частности, ее *правило размера*, объяснили и причину той исторической ошибки, когда равномерное распределение мочевины и этиленгликоля между клеткой и средой было воспринято как неопровержимое доказательство свободного состояния клеточной воды, оказавшегося в таком согласии с идеей свободного состояния K^+ в клетках.

Придерживаясь представления о клетке и о ее фундаментальной структуре — протоплазме — как о фазе, о том, что любая часть клетки обладает теми же фазовыми свойствами, что и клетка в целом, теория МОПВ представила свое понимание физико-химического строения *клеточной мембраны* (название принято с оговорками, так как эта структура, в отличие от искусственных мембран, может и не иметь четкой внутренней границы). В новой модели непрерывной фазой клеточной мембраны, подобно остальной клетке, являются не липиды и их разнообразные производные, а поляризованная, структурированная вода. При таком понимании мембрана, как показывают факты, в сущности, проницаема для любых веществ (хотя проницаемость эта весьма различна), и именно поэтому она не может иметь решающего значения для обеспечения осмотической стабильности клетки и определять ее осмотические свойства так, как это принято в мембранной теории. Осмотическое поведение клетки определяется свойствами протоплазмы как целостной структуры. Этот решительный вывод подтверждается осмотической стабильностью клеток, лишенных мембраны.

Новое представление о мембране как о границе из поляризованной, ориентированной воды подкреплено рядом взаимодополняющих экспериментов. Среди них демонстрация того, что диффузия воды в яйцеклетки лягушки и в гигантские мышечные волокна морского желудя — это *диффузия, ограниченная объемными свойствами среды, а не мембраной*. Скорость диффузии воды через клеточную мембрану *такая же, как и через цитоплазму*, и *на порядки больше* скорости диффузии воды через фосфолипидный бислой. Валиномицин, который в концентрации 10^{-7} М повышает проницаемость для K^+ искусственного фосфолипидного бислоя в 1000 раз, *не* оказывает сопоставимого с этим влияния на проницаемость для K^+ скелетной мышцы лягушки, яйцеклетки лягушки, гигантского аксона кальмара, лимфоцитов человека и внутренней мембраны митохондрий печени мыши.

Наконец, проницаемость ацетилцеллюлозной мембраны для воды и шести неэлектролитов определяется теми же физическими факторами, что и проницаемость кожи лягушки для тех же веществ и при тех же температурах (0°, 4° или 25 °С). В ацетилцеллюлозной мембране, практически непроницаемой для сахарозы, подобно коже лягушки, имеются поры, заполненные поляризованной и ориентированной водой. Их средний диаметр (без воды) в *пять* раз превышает размер молекулы сахарозы и, тем не менее, такая мембрана остается для нее непроницаемой. Этот факт опровергает представление о том, что ее непроницаемость для сахарозы обусловлена механизмом *сита,* и вытесняет «ситечковое» мышление из мира клеточной физиологии в сферу промышленных технологий и насосных станций. Поры ацетилцеллюлозной или клеточной мембраны могут быть непроницаемы не потому, что они слишком малы в сравнении с размером иона или молекулы, а потому, что они заполнены связанной, структурированной водой, и чем лучше вещество растворяется в такой воде (*правило размера*), тем выше проницаемость мембраны к нему.

Прежде чем завершить подведение итогов *ассоциативного* аспекта теории ассоциации-индукции в отношении воды, я отмечу еще два важных достижения теории МОПВ.

Во-первых, теория МОПВ впервые объяснила, чем желатин принципиально отличается от большинства нативных (глобулярных) белков — своей открытой для воды структурой, полноразвернутой конформацией, благодаря которой он способен связывать воду, — а также что такое коллоид (макромолекулы или агрегаты частиц, связывающие воду или другой растворитель в многослойные поляризованные структуры) и коацерват (автономная кооперативная фаза, содержащая параллельно ориентированные коллоиды).

Во-вторых, Реймонд Дамадьян, задавшийся целью проверить методом ЯМР-спектроскопии предсказанное теорией МОПВ связанное состояние клеточной воды, изобрел *магнитно-резонансную томографию*, или МРТ.

16.6. Теория ассоциации-индукции

Индуктивная часть теории АИ призвана объяснить физическую природу *живого состояния*: как оно поддерживается и регулируется, в чем фундаментальная основа физиологической активности и каковы принципиальные изменения, сопровождающие гибель клетки. Не все эти основополагающие вопросы привлекали внимание мембранной теории или первых физиологов протоплазматического направления, хотя зачастую весьма интересовали древних натурфилософов.

1. Живое состояние покоя

Согласно теории АИ, отправным пунктом всех процессов жизнедеятельности является протоплазма в состоянии покоя. В этом состоянии все три основных компонента клетки (белки, вода и ионы K^+) ассоциированы между собой и находятся в состоянии термодинамического равновесия со средой. Обоснование этой концепции дано в главах 10 и 11.

1.1. Состояние покоя как состояние метастабильного равновесия

Идея равновесия в теории АИ резко противоречит представлению о жизни как об *установившемся режиме обмена веществ*. Подобно пламени свечи, под чьей спокойной и неизменной формой скрываются непрерывные химические реакции, жизнь с этой точки зрения рассматривается как внешнее выражение непрерывных биохимических реакций, в ходе которых производится АТФ, идущая непрерывным потоком на перекачивание Na^+ и другую работу. На мой взгляд, теория мембранных насосов изжила себя как продуктивная идея (глава 12). Однако к ней полезно время от времени возвращаться для соотнесения ее принципов с новыми данными и новым пониманием фактов, чтобы еще и еще раз напомнить себе свое идейное прошлое и объяснить, почему это прошлое было возможно.

Как и любые химические реакции, биохимические реакции прекращаются, если температура снижается до десятков и сотен градусов ниже нуля (например, при температуре жидкого азота), не говоря уже о температурах, близких к абсолютному нулю. Если бы жизнь в самом деле поддерживалась непрерывными химическими реакциями, то при такой температуре она неминуемо угасла бы навсегда, как пламя свечи. Однако состояние термодинамического равновесия, на котором настаивает теория АИ, вовсе не обязательно должно разрушаться при сверхнизких температурах. Широко известно, что не только клетки, но и целые эмбрионы (в том числе человека) можно сохранять живыми, хотя и «спящими», в жидком азоте [176]. И в любой момент можно восстановить нормальную жизнедеятельность замороженной клетки или ткани. Возможность криоконсервации клеток доказывает, что ее фундаментальная структура — протоплазма — существует в состоянии метастабильного равновесия.

1.2. Покоящееся живое состояние как низкоэнтропийное состояние

В теории АИ клетка и протоплазма обладают низкой энтропией, в первую очередь благодаря адсорбированному состоянию клеточной воды, клеточного K^+, конгруэнтных анионов, АТФ и т. д., что было экспериментально подтверждено (гл. 10 и 11). Эта теория также предсказывает, что клетка и протоплазма склонны спонтанно утрачивать способность удерживать воду и K^+ в связанном состоянии (что ведет к увеличению подвижности внутриклеточной воды и ионов K^+) уже при умеренных подъемах температуры. Это подтверждается тем фактом, что мышцы лягушки погибают при нагревании всего лишь до 41 °C [519].

Термодинамика нам говорит, что изменение свободной энергии (ΔF) в ходе химической реакции связано с изменением энтальпии, или теплосодержания (ΔH), а также с изменением энтропии (ΔS) уравнением: $\Delta F = \Delta H - T\Delta S$. *Спонтанность* перехода мышцы лягушки из нормального живого состояния покоя в мертвое состояние при 41 °C указывает, что ΔF этой реакции отрицательно (то есть свободная энергия системы уменьшается). Тот факт, что этот переход запускается столь незначительным повышением температуры, говорит о том, что изменение энтропии (ΔS) при спонтанном переходе должно быть положительным и настолько большим, что $T\Delta S$ превышает теплопоглощение — положительное изменение энтальпии (ΔH). В сумме изменение свободной энергии (ΔF) становится отрицательным, а реакция — термодинамически выгодной, то есть проходит *самопроизвольно*. Этот анализ показывает, что энтропия живых клеток ниже, чем мертвых, как и утверждает теория АИ.

1.3. Чем различаются основные компоненты клетки — физическим состоянием или конформацией?

Три главных компонента протоплазмы и клетки — это вода, белки и ионы K^+. Адсорбированное состояние K^+ и воды в клетках уже

установлено (главы 10 и 11), и еще одно, термодинамическое обоснование этого утверждения, приведено выше. Но особого внимания со стороны теории требует конформация внутриклеточных белков. Пытаться обнаружить действительно *нативную* (как ее понимает теория АИ) конформацию белков в клетке в состоянии покоя — это все равно, что пытаться выяснить, жива или мертва кошка внутри черного ящика, если при каждом его открывании впрыскивать в него предварительно порцию сильнейшего яда, мгновенно убивающего животное. Я хочу этим сказать, что мы никогда не сможем установить истинную конформацию белков внутри покоящейся клетки, если всякий раз будем измельчать ее, экстрагировать белок весьма нефизиологичными растворами и проходить все остальные жесткие этапы, которые обычно включает выделение так называемых нативных белков. Необходим менее агрессивный подход.

1.3.1. Выяснение конформации гемоглобина по распределению ионов K^+ и Na^+ между эритроцитами и средой

Эритроциты, как и большинство клеток, избирательно накапливают K^+ и частично вытесняют Na^+. Гемоглобин составляет 97% внутриклеточных белков эритроцитов [74, pp. 117, 119, 120]. Исходя из установленного адсорбированного состояния K^+ и воды в клетках (главы 10 и 11), мы вправе ожидать, что гемоглобин играет важную роль в адсорбции K^+ и вытеснении Na^+. Однако так называемый *нативный* гемоглобин, будучи растворенным в воде в той же концентрации, что и в нормальных эритроцитах (36%), адсорбирует лишь малую часть ионов K^+ или Na^+, либо вовсе их не связывает [484; 114, p. 224]. Кроме того, вода в 36% растворе нативного гемоглобина не вытесняет Na^+ [306, Table 1A].

Теория АИ утверждает, что гемоглобин в эритроцитах отличается по свойствам от выделенного «нативного» гемоглобина, так как имеет в покоящейся клетке иную конформацию. Это подтверждают две группы данных.

Действительно, обработка раствором NaOH в концентрации 0,4 М освобождает не только все β- и γ-карбоксильные группы, делая возможной стехиометрическую избирательную адсорбцию ими Na^+ или K^+ (раздел 10.2, п. 2), но и NHCO-группы полипептидного остова, позволяя им связывать, поляризовать и ориентировать окружающую воду, превращая ее в плохой растворитель для сахарозы и Na^+ (раздел 11.3, п. 4). Как видно из этих опытов, гемоглобин способен адсорбировать K^+ и снижать растворимость Na^+ в воде, и он делает это тогда, когда возникают соответствующие условия. Каковы же эти условия? Заглянем для этого в живой эритроцит.

Если поместить свежие эритроциты в *гипотонический* раствор и подвергнуть их гемолизу, они утрачивают полностью или частично гемоглобин, ионы K^+ и способность частично вытеснять Na^+. Если к полученной таким образом взвеси теней эритроцитов добавить сахарозу, восстановив этим изотоничность среды, тени замкнутся, а их последующая инкубация при 37 °С вновь приведет к накоплению K^+ и вытеснению Na^+ — *но это возможно лишь при условии*, что в растворе до образования замкнутых теней будет присутствовать необходимое количество АТФ, а в самих тенях останется достаточное количество гемоглобина и некоторое количество прочно связанного, устойчивого к гемолизу вспомогательного белка (белков) X (раздел 14.2, п. 2).

Согласно экспериментальным данным, равновесное содержание K^+ в тенях, как и степень вытеснения Na^+ из них, *количественно* связано с содержанием в них *остаточного* белка (в основном гемоглобина): чем больше белка, тем больше ионов K^+ в тенях, тем сильнее вытеснение Na^+ из них (рис. 33). Замкнутые «белые» тени, полностью лишенные гемоглобина, не накапливают K^+ и не вытесняют Na^+. Приведенные в верхней части рис. 33 данные можно аппроксимировать линейной функцией. Если теперь экстраполировать полученную прямую до значения концентрации белка около 36 г/100 мл сырого веса (приблизительное содержание гемоглобина в эритроцитах), то получим соответствующее этому содержанию белка содержание K^+ в клетке (94 ммоль/кг сырого веса), которое окажется близким к фактическому уровню K^+ в эритроцитах — 99 ммоль/кг сырого веса [140, Fig. 5]. Более того, гемоглобин, необходимый для накопления в тенях K^+ и вытеснения Na^+, вовсе не обязан быть «родным» гемоглобином эритроцитов. Его можно заменить на чужеродный гемоглобин так, чтобы при закрытии теней после гемолиза он оказался внутри восстановленных клеток-теней.

В совокупности представленные данные показывают, что конформация гемоглобина в эритроцитах отличается от конформации выделенного нативного гемоглобина тем, что NHCO-группы его полипептидного остова, а также β- и γ-карбоксильные группы свободны от водородных и солевых связей и потому способны связывать воду и K^+. Кроме того, ясно, что гемоглобин, присутствующий изначально или введенный извне в тело эритроцита, принимает эту конформацию под влиянием АТФ и ее помощников: белка (или белков) X, а также конгруэнтных анионов (Cl^-), как это показано на принципиальной схеме на рис. 44.

1.3.2. Определение конформационного состояния миозина в мышечных волокнах лягушки по распределению неэлектролитов между клеткой и средой

Желатин, полиэтиленоксид (ПЭО), денатурированный NaOH гемоглобин, и другие экстравертные модели имеют в растворах полноразвернутую конформацию. Благодаря этому они способны связывать значительное количество воды и вытеснять неэлектролиты в объем, заполненный свободной водой, и этот эффект тем значительнее, чем больше размер молекул растворенного вещества. График зависимости величин q неэлектролитов от логарифма их мо-

лекулярной массы (или молекулярного объема) представляет собой S-образную кривую (рис. 25 и 28). В случае растворов *нативных* (глобулярных) белков величина q почти не меняется, оставаясь около значения, близкого к 1 (горизонтальная линия на рис. 25) при самых разных размерах молекул неэлектролитов (вплоть до молекулярного объема около 500 мл/моль). Подобно неэлектролитам в растворах экстравертных моделей, и в противоположность растворам «нативного» гемоглобина (раздел 11.3, п. 4, рис. 28 и 29), график зависимости величин q, полученный для 21 неэлектролита в мышечных волокнах лягушки, от их молекулярного объема представляет собой S-образную кривую. На основании этого сравнения можно сделать вывод, что основные мышечные белки — миозин и актин (раздел 15.1, п. 3) — имеют в покоящемся мышечном волокне лягушки конформацию, близкую к полноразвернутой.

Этот вывод подкрепляется и другими чертами сходства свойств клеточной воды (раздел 11.2) и воды в растворах экстравертных макромолекул, которыми, однако, не обладает вода растворов интровертных полимеров.

1.3.3. Выяснение конформации миозина и актина в мышечных волокнах лягушки по поглощению водяного пара

Мышца лягушки примерно на 80% состоит из воды, и на 20% — из белков. При таком соотношении 1 г белков мышечных волокон в среднем должен поглощать, согласно теории МОПВ, 4 г воды. При помощи нового *метода нулевой точки* Линг и Ху изучили поглощение пара интровертными белками и экстравертными полимерами — желатином, полиэтиленоксидом (ПЭО), поливинилпирролидоном (ПВП) и поливинилметиловым эфиром (ПВМЭ), — в труднодостижимых условиях, когда относительное давление пара близко к насыщению.

Результаты показали, что лишь экстравертные модели (макромолекулы в полноразвернутой конформации) при этом — физиологическом — давлении пара могут поглощать почти столько же воды, сколько и мышцы лягушки. В то же время, все исследованные глобулярные белки поглощают лишь от четверти до половины того количества воды, которое могут поглощать мышечные волокна лягушки (раздел 11.3, п. 7.1). Эти данные еще раз показывают, что если не весь миозин и актин, то хотя бы их большая часть должна находиться в полноразвернутом состоянии, которое одно только способно поглотить столько воды, сколько поглощается интактными мышечными волокнами.

Кстати, концентрация свободных веществ в клетке (таких, как Na^+ и Cl^-) слишком низка, чтобы значимо влиять на поглощение воды через механизм осмоса. Более распространенные в клетке вещества, такие, как K^+, АТФ и креатинфосфат, адсорбированы и вследствие этого осмотически неактивны или почти неактивны.

1.4. Ключевая роль АТФ в поддержании протоплазмы в состоянии покоя

Для того чтобы сыграть полный драматизма спектакль под названием «жизнь», каждый из множества кардинальных адсорбатов должен выполнить отведенную ему роль. Но ни один из них не смог бы сыграть свою роль убедительно, не будь АТФ. Адсорбция именно АТФ соответствующими кардинальными центрами совершенно необходима для формирования и поддержания протоплазмы в основном состоянии — состоянии покоя, отправной точки для совершения всех видов биологической работы. Это фундаментальное положение иллюстрирует рис. 44, на котором схематично показано, как АТФ поддерживает *элементарную живую машину* в живом состоянии, то есть возвращает ее в состояние покоя.

Два отличительных признака покоящегося состояния — избирательная адсорбция K^+ в присутствии Na^+ и связанное состояние воды, из которой в силу ее структурированности частично вытесняются Na^+, сахароза и другие вещества, для которых она оказывается плохим растворителем. Теория АИ предсказывает *прямую пропорциональную* зависимость между уровнем АТФ в клетке и равновесным содержанием в ней K^+. Должна существовать и *обратная пропорциональная* зависимость «АТФ — Na^+» и «АТФ — сахароза».

Данные, представленные на рис. 19, и часть данных на рис. 56 подтверждают положительную связь между уровнем АТФ и K^+ в группе мышечных волокон, развивающуюся *во времени*. А данные рис. 17 показывают ту же связь в *пространственном* распределении АТФ и K^+ вдоль тех же волокон. Соответствующая часть данных рис. 56 показывает обратную зависимость между уровнем АТФ в клетке, с одной стороны, и Na^+ и сахарозы — с другой.

1.5. Почему в структурированных слоях адсорбированной воды ее молекулы связаны между собой более прочно?

В разделе 11.3, п. 4 я показал, что отрицательная энергия взаимодействия молекул воды в клетках выше, чем в обычной воде, на величину, соответствующую так называемому *напряжению вытеснения* (U_{vp}). По экспериментальным данным о вытеснении веществ мы определили, что U_{vp} воды в мышечных волокнах лягушки составляет −126 кал/моль. Если мы предположим, для простоты, что эти −126 кал/моль представляют собой исключительно энергию взаимодействия, а не сумму энергии и энтропии, как это на самом деле и есть [168], то дополнительная — в результате поляризации — энергия взаимодействия воды в 1 кг сырого веса мышечных волокон составит $44 \times (-126) = -5{,}54$ ккал, где 44 — количество молей воды в 1 кг мышечных волокон в состоянии покоя. Откуда же берется эта энергия? Может ли она быть следствием адсорбции АТФ? Нет, не может.

Содержание АТФ в покоящемся мышечном волокне равно 5 ммоль/кг сырого веса мышц. Умножив эту цифру на энергию ад-

сорбции АТФ (−14,3 ккал/моль) [287] (раздел 14.3, п. 4), мы получим, что общая энергия адсорбции АТФ в таком объеме мышечной ткани составляет лишь $-14{,}3 \times 0{,}005 = -0{,}072$ ккал, то есть гораздо ниже дополнительной энергии взаимодействия молекул воды (−5,54 ккал) в том же количестве мышц.

Поясню природу этой дополнительной энергии с помощью простых моделей.

1. *Ориентация диполей воды.* Каждая молекула воды может рассматриваться как электрический диполь, хотя у нее и три полюса — один отрицательный и два положительных. Если два таких диполя расположены *параллельно*, — одноименными полюсами в одну сторону, — они будут отталкиваться. Если же они ориентированы *антипараллельно*, то будут притягиваться друг к другу. Основной причиной появления дополнительной энергии взаимодействия между собой связанных молекул воды в клетке является именно такая антипараллельная ориентация соседних молекул в многослойных водных структурах, в результате которой дипольный момент молекулы возрастает, она поляризуется.

2. *Раствор желатина.* В обычной воде тепловое движение ее молекул мешает им надолго сохранять антипараллельную ориентацию. Ситуация меняется при добавлении в воду желатина. Не меньше половины полипептидного остова молекулы этого белка находится в полноразвернутой конформации (раздел 11.3, п. 2), их CO- и NH-группы фиксированы в пространстве (скорость теплового движения молекулы желатина в составе геля практически равна нулю), и в силу *принципа усиления ассоциации при фиксации центров связывания* (раздел 10.1, п. 1) молекулы воды адсорбируются полипептидным остовом *на более продолжительное время*, чем время взаимодействия молекул воды в растворе без желатина. Тесное взаимодействие молекул воды с указанными диполями пептидной связи не только мгновенно влечет за собой их поляризацию и антипараллельную ориентацию в первом слое воды, но и передает эти изменения на соседние слои, формируя их один за другим. Таким образом, CO- и NH-группы полноразвернутых цепей желатина играют роль «центров кристаллизации» в процессе упорядочивания клеточной воды и индуцируют увеличение дипольного момента молекул воды, что приводит к усилению водородных связей между адсорбированными молекулами воды и к увеличению прочности всей водной структуры вокруг молекулы желатина. Обратите внимание, что и до, и после введения желатина система представляет собой стабильную динамичную структуру в состоянии термодинамического равновесия. Вода, взаимодействуя с желатином, переходит из высокоэнтропийного низкоэнергетического состояния в низкоэнтропийное высокоэнергетическое состояние многослойно организованной поляризованно-ориентированной воды, что выражается параметром U_{vp} — напряжением вытеснения.

3. *Живая клетка.* Белки клетки, например, миозин и актин в мышечных волокнах или гемоглобин в эритроцитах, играют, подобно желатину, роль «центров кристаллизации» в создании многослойной динамичной структуры антипараллельно ориентированных молекул воды. При этом и в клетке связанная вода поляризуется, заметно стабилизируя организованную водную структуру вокруг белка.

2. Протоплазма — глубоко интегрированная система молекулярных взаимодействий

Содержание воды в клетке составляет около 44 М; β- и γ-карбоксильных групп, адсорбирующих K^+, — около 100 мМ; АТФ — 5 мМ. Поскольку вся вода и K^+ в клетке находятся под контролем АТФ, согласно теории АИ, на каждую молекулу связанной АТФ приходится в среднем 20 связанных ионов K^+ и 8800 связанных молекул воды.

Возникает вопрос, как одной молекуле АТФ удается контролировать связывание почти 9000 молекул воды и ионов? Это возможно благодаря линейному и объемному распространению индуктивного эффекта: вдоль полипептидной цепи и через короткие боковые радикалы, в том числе с β- и γ-карбоксильными группами (раздел 14.3, п. 6), и через слои поляризованной, ориентированной воды на весь объем клетки. Сначала остановимся на линейном распространении.

2.1. Нативный гемоглобин in vitro

Весьма точные данные Листера по оксигенированию/деоксигенированию гемоглобина человека [557] строго подчиняются изотерме адсорбции Янга—Линга (уравнение А4 в приложении) [107, Fig. 7]. В уравнении изотермы фигурирует единственная константа внутреннего равновесия ($K^{\circ\circ}_{i\to j}$), равная 0,1 мм рт. ст.$^{-1}$, и единственный параметр, характеризующий *энергию взаимодействия ближайших центров* ($-\gamma/2$), равный +0,67 ккал/моль [107, p.139]. Тот факт, что для описания связывания гемоглобина с кислородом (или обратного процесса) требуется только один параметр $-\gamma/2$, прямо указывает на то, что группы гема ведут себя как единое целое, хотя их разделяют длинные полипептидные цепи (параметр $K^{\circ\circ}_{i\to j}$ также важен для такого вывода, но в дальнейшем для простоты изложения я упоминать его не буду). Обратите внимание на то, что этот вывод сделан не из общих соображений вроде «конформационных изменений» и «аллостерических влияний», а на основе индуктивного эффекта — физического явления, описанного языком математической физики.

2.2. Гемоглобин, денатурированный NaOH, in vitro

Взглянув на аминокислотную последовательность цепей гемоглобина [531; 536], нетрудно заметить, что расстояние между ближайшими β- и γ-карбоксильными группами в этом белке сильно варьирует: от 1 аминокислотного остатка (например, α74асп—α75асп) до 23 (β50асп—β73асп). Несмотря на это, для количественного описания

адсорбции Na^+ каждой β- и γ-карбоксильной группой молекулы денатурированного гемоглобина требуется наличие в соответствующем уравнении только одного параметра $-\gamma/2$, равного в данном случае +0,824 ккал/моль [114]. Если бы таких параметров требовалось *два и больше*, это бы означало, что в молекуле гемоглобина существует две или больше автономных областей.

2.3. Сократительный белок миозин in vivo

В скелетных мышцах лягушки 80% всех β- и γ-карбоксильных групп, способных связывать K^+, принадлежат миозину [122]. Размеры этого белка еще больше, чем гемоглобина [361], и соседние β- и γ-карбоксильные группы также находятся на разных расстояниях друг от друга. Однако кривая поглощения K^+ (и Na^+) мышечным волокном лягушки также строго подчиняется уравнению Янга—Линга, которое и в этом случае содержит *только один* параметр $-\gamma/2$, равный +0,62 ккал/моль.

Самого пристального внимания заслуживает тот факт, что и поглощение кислорода центрами гема нативного гемоглобина, и адсорбция Na^+ β- и γ-карбоксильными группами денатурированного гемоглобина, и адсорбция K^+ β- и γ-карбоксильными группами мышечных волокон лягушки характеризуется не множеством значений, а единственным (в каждом случае) значением параметра $-\gamma/2$. Физический смысл этой закономерности в том, что во всех случаях распространение индуктивного эффекта вдоль полипептидной цепи, обеспечивающего интеграцию функциональных групп белков как в масштабе одной молекулы, так и в масштабе клетки, *безразлично к расстоянию* между этими группами.

Независимость параметра $-\gamma/2$ от расстояния между соседними центрами связывания полностью согласуется с описанной в разделе 14.3, п. 6 и схематически изображенной на рис. 50 и 51 теоретической моделью незатухающей дистанционной передачи индуктивного эффекта, включающей серию ближних передач. Эта модель действует по принципу домино: сила удара одной костяшки по другой не зависит от расстояния до того места, где цепная реакция началась. Тема о клетке как интегрированной системе будет продолжена в разделе 16.6, п. 4.4.

Теперь перейдем к объемному распространению индуктивного эффекта через связанную воду, о чем уже говорилось в конце раздела 11.2. Физическим явлением, лежащим в основе такой передачи, является увеличение дипольного момента молекул воды при их взаимодействии с функциональными группами (диполями) пептидной связи и, далее, с соседними молекулами воды в составе водной оболочки, формирующейся вокруг белка. В идеальных условиях — при сильно полярной NP-поверхности (полипептидный остов белка) и при температуре абсолютного нуля — дополнительная энергия взаимодействия соседних молекул воды (из-за возросшего дипольного момента) в динамичной многослойной структуре поляризованной и ориентированной воды *постоянна* и не уменьшается по мере удаления от N- и P-центров. Конечно, в реальности температура окружающей среды далека от абсолютного нуля, и NP-поверхности не идеальны. Из-за этого дальность действия индуктивного эффекта ограничена. Но рассмотренные в этой книге данные свидетельствуют, что даже в реальных условиях его дальность весьма велика.

3. Объяснение четырех фундаментальных физиологических явлений

В годы своего расцвета мембранная теория была способна, казалось, объяснить все четыре фундаментальных свойства клетки одним простым предположением: клетка — это разбавленный раствор электролитов и других осмолитов, заключенный в мембрану толщиной около 100 Å (белковый матрикс клетки, как неотъемлемый элемент теоретической конструкции, мембранной теории не нужен). После ее фактического краха настал черед теории АИ дать объяснение тех же физиологических явлений при помощи почти столь же простого предположения: клетки — это протоплазма, интегрированная структура клетки, поддерживаемая в состоянии покоя под влиянием ключевого фактора, АТФ, и ряда вспомогательных факторов. Однако давайте по порядку.

3.1. Распределение веществ между клеткой и средой

Сначала вспомним некоторые факты. При 0 °C и в отсутствие инсулина большая часть D-глюкозы и глицина находится в воде мышечного волокна, то есть не связана клеточными структурами (этим отличаются еще 20 неэлектролитов, см. раздел 11.3, п. 4). В этом случае, как мы помним, их равновесные внутриклеточные концентрации линейно зависят (как это и должно быть в случае свободных веществ) от их концентраций в среде, а наклон прямой соответствует величине q вещества, которая в свою очередь определяется молекулярным объемом исследуемого соединения согласно *правилу размера* (рис. 26, 27 и 59). Такой же линейный вид с низкой величиной q имели и графики распределения Na^+ между мышцей лягушки и средой в присутствии в среде конкурирующего катиона K^+ в концентрациях выше физиологической нормы (рис. 54); то же справедливо и для распределения Mg^{2+} между клеткой и средой при его концентрации в среде выше 1 мМ (раздел 15.1, п. 1).

Добавление инсулина вместе с праймером при 25 °C создает в мышечных волокнах лягушки центры избирательной адсорбции D-глюкозы (и глицина) (рис. 59). Добавление в безглюкозную среду лактозы стимулирует E. coli синтезировать три белка, один из которых сразу стал рассматриваться в качестве лактозного насоса (в соответствии с действующей парадигмой), названного лактозной пермеазой. Однако конфликт концепции насосов с законом сохранения энергии заставляет пересмотреть функцию этого белка. Альтернатива состоит в том, что он является инсулиноподобным *внутри-*

клеточным гормоном. Это интересное предположение основывается на сходстве действия этой пермеазы на накопление лактозы в E. coli с действием инсулина на накопление D-глюкозы в мышце лягушки. И второе: пермеаза обнаруживается не в мембранной фракции гомогената E. coli, а только в цитоплазматической.

Ряд примеров равновесного распределения сахаров и других неэлектролитов между клеткой и средой подчиняется простому двухчленному уравнению Трошина (A1, приложение). Однако уравнение Трошина не способно объяснить ни поглощения кислорода эритроцитами (правая кривая во врезке к рис. 55), ни накопления ионов K^+ в условиях выраженной конкуренции со стороны Na^+ (рис. 57). То есть уравнение Трошина не работает во всех случаях, когда мы имеем дело с кооперативными процессами. С другой стороны, *все известные случаи распределения веществ между клеткой и средой можно количественно описать либо уравнением A7, в котором рассматривается лишь один вид центров адсорбции, либо более общим уравнением A6 для нескольких видов центров адсорбции.* Эти уравнения отличаются от уравнения Трошина тем, что учитывают *кооперативное взаимодействие* центров адсорбции.

По-видимому, именно в *автокооперативности* следует искать причину тонких различий между живой протоплазмой и кусочком ионообменной смолы, взятой с лабораторной полки. Оба эти материала способны избирательно накапливать K^+ в присутствии Na^+ и содержат поляризованную и ориентированную воду, способную вытеснять растворенные в ней вещества в среду с обычной водой.

Я уже отмечал, что уравнение A7, выведенное для центров связывания одного типа, способно, как оказалось, описывать *все* известные данные по распределению веществ между клеткой и средой. Это особенно удивительно, если вспомнить, что адсорбция только на *одном изолированном нативном белке,* таком как бычий сывороточный альбумин [439, Fig. 6], описывается как сумма нескольких изотерм адсорбции. Это вездесущее единообразие механизма адсорбции в клетке согласуется с концепцией единой элементарной живой машины (рис. 44), с тем, что в живой клетке имеет место синхронизация различных элементарных живых машин, как это происходит в популяции изолированных митохондрий (рис. 66 и 67).

3.2. Проницаемость

В теории АИ поверхность клетки, условно называемая клеточной мембраной, является пограничным состоянием все той же системы фиксированных зарядов и связанной воды, характерной для всего тела клетки (непринципиальные изменения вносятся лишь процессами, характерными для межфазной границы). Поэтому общее уравнение проницаемости (A13 в приложении), как и его частные случаи (уравнения A14—A16), с одной стороны, и уравнения равновесного распределения веществ между целой клеткой и средой, с другой, имеют один физический смысл.

По структуре и функциям клетки можно разделить на две категории: открытые *бифациальные* (например, эпителиальные клетки кожи лягушки) и закрытые *унифациальные* (например, мышечные волокна лягушки, яйцеклетки). Бифациальные клетки кожи лягушки, как и другие клетки, участвуют в обменных процессах, поэтому часть их мембраны, та, что обращена во внутреннюю среду организма, должна походить на мембрану закрытых, унифациальных, клеток. А задача сохранения питательных и других необходимых веществ и защиты от внешних неблагоприятных факторов должна ложиться на *наружную поверхность* клеток кожного эпителия лягушки. Поэтому скорость проникновения L-глюкозы, например, *через* кожу лягушки (в том числе через наружную поверхность самих эпителиальных клеток) более чем в 3000 раз ниже скорости проникновения через нее воды [217] (здесь — рис. 41). Я называю бифациальные клетки открытыми потому, что через них проходит поток веществ, перекачиваемый механизмом активного эпителиального транспорта (раздел 15.4).

Мы уже знаем, что диффузия меченой воды в яйцеклетки лягушки и мышечные волокна морского желудя ограничена объемным сопротивлением среды, а не конкретной структурой, например, мембраной. Это означает, что коэффициент диффузии воды через клеточную мембрану закрытых клеток не отличается от коэффициента диффузии воды через их цитоплазму и всего в 2—3 раза меньше коэффициента диффузии воды в обычной воде (см. подпись к рис. 39). Из соответствующего сравнения (с данными рис. 41) нетрудно сделать вывод, что проницаемость закрытых унифациальных клеток в целом гораздо выше, чем наружной мембраны бифациальных клеток.

Дайан Грэм и я изучали выход меченой D-глюкозы из мышечных клеток лягушки — то есть, из закрытых клеток (работа не опубликована). Проведя 20 независимых измерений, мы обнаружили, что время полуобмена ($t_{1/2}$) при 0 °C составляет 12,9 ± 1,86 мин. (стандартная ошибка). По моим оценкам, $t_{1/2}$ D-глюкозы при 25 °C не должно сильно отличаться от $t_{1/2}$ Na^+ при 25 °C, которое составляет 3,34 мин. [49, p. 150]. Эти данные показывают, что проницаемость закрытых клеток для питательных веществ (подобных D-глюкозе) на порядки больше проницаемости для них кожи лягушки (рис. 41) или мембран других открытых клеток — клеток междоузлий водорослей рода *Nitella* или *Chara* (рис. 34) для неэлектролитов сходного или даже меньшего размера [320].

Впечатляющие различия в свойствах открытых и закрытых клеток — еще одно свидетельство против мембранной теории, согласно которой, непрерывной фазой мембран всех клеток является все тот же двойной слой фосфолипидов. Свойства фосфолипидов настолько схожи в рассматриваемом контексте, что и проницаемость мембран на их основе не должна существенно зависеть от типа клеток. На несоответствие этого предсказания фактам прямо указал Вуд с

сотр. [435], заметивший, что проницаемость фосфолипидного бислоя для D-глюкозы в 1 000 000 раз меньше проницаемости для нее клеточной мембраны такой закрытой клетки, как эритроцит.

Модель строения клеточной мембраны в соответствии с теорией АИ отличается высочайшей гибкостью благодаря заложенным в нее физическим принципам. Согласно этой модели, проницаемость клетки определяется сорбционными свойствами поверхности клетки, ее более глубоких слоев и всей протоплазмы в целом. Кроме того, важную роль в этих процессах играет и связанная внутриклеточная вода. Все эти факторы проницаемости могут широко варьировать от одного типа клеток к другому в зависимости от потребностей клетки в ионах, неэлектролитах и амфолитах — например, в свободных аминокислотах и даже в гигантских молекулах белков. Никаких трудностей в объяснении столь значительных различий между клетками теория АИ не испытывает.

3.3. Регуляция объема клетки

Объем клетки складывается в основном из объема воды и клеточных белков. Соотношение количества воды и белков не остается постоянным и зависит как от физиологического состояния клетки, так и от ее типа. В целом это соотношение определяется тремя факторами, каждый из которых сводится, в конечном счете, к различиям в свойствах белков и в их количестве.

Первым фактором является способность доступных для растворителя участков полипептидных цепей и целых белков с полностью развернутой конформацией связывать воду, организуя ее в многослойную структуру поляризованных, ориентированных в пространстве молекул воды. Равновесный объем клетки определяется балансом сил между адсорбцией воды, увеличивающей объем клетки, и двумя другими факторами, противодействующими увеличению объема: солевыми связями (внутри- и межбелковыми), возникающими между фиксированными зарядами повсюду в клетке и ограничивающими способность белков связывать воду; и веществами с низким коэффициентом распределения между клеткой и средой (величиной q); в клетке они представлены только свободной фракцией и, поскольку их концентрация в клеточной воде меньше, чем в среде, этот компонент в общем балансе осмотических сил способствует потере воды клеткой, то есть уменьшению ее объема — вода уходит туда, где концентрация растворенных веществ выше (раздел 11.3, п. 7.2).

Реальность первого из упомянутых факторов контроля объема клетки (адсорбции воды полипептидной цепью) подтверждается тем, что выделенные мышечные волокна лягушки сохраняют свой нормальный объем не только в физиологическом растворе, но и во влажном воздухе с таким же парциальным давлением пара, что и у раствора Рингера; что состояние 95% воды в мышечном волокне лягушки подчиняется изотерме адсорбции Бредли (раздел 11.2); и что лишь полноразвернутые или экстравертные модели, такие, как желатин, ПЭО и ПВМЭ, способны поглотить столько же воды, сколько и клетки (раздел 11.3, п. 7.1). Роль солевых связей между фиксированными зарядами подтверждается тем, что интактные клетки сильно набухают в изотоническом растворе KCl (разрушающего солевые связи), но не меняют своего объема в изотоническом растворе NaCl, не способного разорвать солевые связи в клетке в состоянии покоя из-за низкого сродства карбоксильных групп к Na^+ (раздел 15.3). Вклад веществ, представленных в клетке только одной, свободной фракцией, растворенной в клеточной воде (и имеющих низкий коэффициент распределения), подтверждается тем, что клетки сжимаются в присутствии в среде NaCl в высоких концентрациях (величина q для Na^+ невелика) и, с другой стороны, набухают в изотонических растворах веществ с величиной q, близкой к 1, таких, как мочевина и этиленгликоль (раздел 11.3, п. 7.2).

Общий механизм набухания клетки при повреждении и под влиянием KCl (в повышенных концентрациях), а также зависимость этого набухания от концентрации NaCl в среде и от содержания АТФ в клетке (раздел 15.3) говорит в пользу взглядов теории АИ на регуляцию клеточного объема и ключевую роль АТФ как ЭАКА в поддержании состояния покоя живой клетки.

3.4. Потенциал покоя

На протяжении вот уже более 100 лет, со времени публикации мембранной теории потенциала покоя Бернштейна, предпринималось немало попыток найти искусственную (модельную) систему, свойства которой полностью отвечали бы требованиям мембранной теории потенциалов. Все они были безуспешны (раздел 15.5, п. 1.1.1).

Причина неудач, на мой взгляд, в ошибочности самой теории. На реальной мембране, какой она предстает перед нами в виде липидной пленки любой толщины, не может возникнуть мембранный потенциал так, как это представляет себе мембранная теория (рис. 4В). Действительно, как только проникающие в клетку ионы войдут в мембрану, их сразу остановит притяжение оставшихся снаружи ионов с противоположным зарядом, для которых мембрана непроницаема. В результате на границе раздела образуется двойной электрический слой, создающий устойчивую разность потенциалов, но не между сторонами мембраны, а на одной или на обеих *границах раздела фаз* — липидная фаза/внешняя среда, липидная фаза/внутренняя среда, на что указывала еще теория Нернста (раздел 15.5, п. 1.2).

Всякий раз, когда мембранная теория отвергала ту или иную модель как не соответствующую ее принципам, оказывалось, что она идеально соответствует теории локализованной поверхностной адсорбции (ЛПА). Две такие модели особенно интересны: стеклянная мембрана (особенно в свете открытия Горовитцем роли поверхностных катионов в образовании электрического потенциала) и коллоди-

евая мембрана (особенно в свете открытия Соллнером и сотр. роли фиксированных поверхностных карбоксильных групп в образовании электрического потенциала). Однако лучшей из всех искусственных моделей стала их комбинация — стеклянный электрод, покрытый окисленным коллодием (КС-электрод), и его модификация — стеклянный электрод, покрытый коллодием и обработанный затем полилизином (ПКС-электрод) [376, p. 286].

И КС-, и ПКС-электроды доказывают, что возникающий на них потенциал не имеет ничего общего с проницаемостью мембран для ионов; величину и знак потенциала определяют поверхностные фиксированные анионные центры. Поражает чрезвычайная схожесть КС-модели с живой клеткой: 1) и потенциал покоя мышцы лягушки, и потенциал КС-электрода нечувствительны к Cl^-; 2) и потенциал покоя мышцы лягушки, и потенциал КС-электрода нечувствительны к двухвалентным катионам, таким, как Mg^{2+}; 3) сравнительная чувствительность к ионам щелочных металлов как потенциала покоя мышцы лягушки, так и потенциала КС-электрода соответствует относительно низкой величине *c* (низкой плотности электронов на фиксированных анионах); 4) и потенциал покоя мышцы лягушки, и потенциал КС-электрода примерно в 100 раз более чувствительны к H^+, чем к K^+.

На данный момент все или почти все корректно измеренные потенциалы покоя того или иного вида клеток можно с высокой точностью количественно описать уравнением A19 или A21 (в приложении) или их частными случаями. Все эти уравнения являются производными общего уравнения распределения веществ между клеткой и средой (уравнения A3), учитывающего кооперативное взаимодействие центров связывания.

4. Физиологические явления как обратимые кооперативные переходы, контролируемые индуктивным эффектом

В главах 10 и 11 мы установили, что в покоящихся мышечных волокнах лягушки при физиологических температурах ионы K^+ адсорбируются на β- и γ-карбоксильных группах в стехиометрии 1 : 1, а молекулы воды — на CONH-группах полипептидного остова белков в виде многослойной структуры из поляризованных и ориентированных молекул. Однако достаточно небольшого подъема температуры (лишь на 10 °C), чтобы мышечные волокна погибли. При этом и K^+, и клеточная вода освобождаются из связанного состояния. Объясняя столь высокую чувствительность клетки к температуре, я подчеркивал, что она свидетельствует о низкой энтропии протоплазмы, и что механизмы, лежащие в основе наблюдаемых изменений состояния клеточного K^+ и воды, по своей природе электронные и могут быть количественно выражены изменениями показателей, названных величиной *c* и аналогом величины *c* (то есть изменениями плотности электронов на отрицательных фиксированных зарядах и отрицательных полюсах диполей соответственно).

4.1. Электронная плотность на функциональных группах белка — пульт управления жизнедеятельностью

В 1902 году Э. Овертон обнаружил [359], что для мышечного сокращения необходим Na^+ (или Li^+) в среде. Почти через полвека Ходжкин и Катц выяснили, что возбуждение нервного или мышечного волокна сопровождается локальным повышением проницаемости мембраны для Na^+. При этом Na^+ стремительно входит в цитоплазму, что и приводит к потенциалу действия. Если в окружающей среде нет Na^+, не будет ни потенциала действия, ни возбудимости. На основе этих данных была создана теория потенциала действия Ходжкина и Хаксли (раздел 15.6, п. 1), опубликованная в 1952 году. Хотя авторами внесен неоценимый вклад в данную область, и их теория потенциала действия была действительно красивой, ей не суждена была долгая жизнь (раздел 15.5, п. 1). Теперь мы знаем, что потенциал покоя — это не *транс*мембранный потенциал, поэтому и теория потенциала действия оказалась основанной на ложных предпосылках. При таких обстоятельствах потребовалось новое теоретическое объяснение.

Такое объяснение я предложил в 1955 году. Я исходил из того, что потенциал покоя клетки имеет много общего с потенциалом стеклянного электрода. Оба возникают благодаря присутствию на поверхности фиксированных анионных центров. На поверхности нервных и мышечных волокон эти центры представляют собой β- и γ-карбоксильные группы, избирательные к K^+ в состоянии покоя (раздел 10.1, п. 3). Таким образом, поверхность клетки в покое играет роль калий-чувствительного стеклянного электрода. Однако в состоянии возбуждения она превращается в натрий-чувствительный электрод.

Ключ к механизму такого превращения был найден в ионообменных смолах, свойства которых играли важную роль в становлении ТФЗЛ в 1952 году. Сульфонатный тип ионообменных смол избирателен к K^+ в присутствии Na^+, карбоксильные ионообменные смолы — наоборот. Брегман приписывал избирательность к K^+ сильным кислотным группам, а избирательность к Na^+ — слабым. Он объяснял эти различия разной поляризуемостью их кислотных групп, как ранее это делал Бунгенберг-де-Йонг с сотрудниками.

Идея Эйзенмана, Рудина и Кесби о том, что изменение ионной избирательности может быть вызвано изменением напряженности поля вокруг анионных центров стекла, подтолкнуло меня продолжить развитие ТФЗЛ. Результатом этих усилий стала теория ассоциации-индукции. Эта фундаментальная физико-химическая теория живой клетки стоит на том, что смена физиологических состояний означает изменения электронной плотности на атомах кислорода β- и γ-карбоксильных групп и на функциональных группах пептидной связи в масштабах всей клетки или отдельных ее структур, и что эти изменения можно количественно описать с помощью параметра «величина *c*».

Величина *c* (исчисляющаяся в ангстремах) — независимый параметр, от значений которого зависят константы диссоциации кислотных групп, а значит, и их pK. Так, уксусная кислота CH_3COOH обладает высоким pK, равным 4,75. Соответственно, она имеет высокую величину *c*, то есть относительно высокую плотность электронов на кислотной группе. При замещении одного из метильных атомов водорода атомом хлора образуется монохлоруксусная кислота $ClCH_2COOH$. Атом хлора сильнее притягивает электроны, чем замещенный им атом водорода. В результате индуктивного эффекта (перераспределения электронной плотности в молекуле) электронная плотность на карбоксильном атоме кислорода снижается. Снижение плотности заряда (уменьшение величины *c*) уменьшает сродство отрицательно заряженной карбоксильной группы к положительно заряженным протонам (H^+), в результате чего ее pK снижается до 2,8. При замещении двух атомов водорода на хлор образуется дихлоруксусная кислота, чья pK составляет 1,3, а величина *c* снижается еще больше. Наконец, при замещении всех трех атомов водорода атомами хлора образуется трихлоруксусная кислота, чья pK меньше единицы, а величина *c* крайне низка. Это яркий пример индуктивного влияния одних функциональных групп на свойства других, *удаленных* групп, в пределах одной молекулы.

Определившись с величиной *c* как количественной мерой плотности электронов и выбрав полипептидную цепь в качестве линейной модели, я вычислил энергию ассоциации с ней 5 ионов щелочных металлов, а также H^+ и NH_4^+ (ион NH_4^+ служил также моделью для описания свойств фиксированных катионов). Исследование свойств такой модели показало, что изменение величины *c,* в самом деле, может повлечь за собой появление избирательности к K^+ в присутствии Na^+ или, наоборот, — к Na^+ в присутствии K^+. Что не менее важно, полученные данные позволяют объяснить, как изменение величины *c* влияет на образование или разрыв солевых связей.

В отличие от *величины c* β- и γ-карбоксильных групп, расположенных на коротких боковых радикалах, *аналог величины c* отражает электронную плотность на карбонильных атомах кислорода (иминогруппа пептидной связи поляризуется значительно слабее), расположенных прямо на полипептидном остове. Взаимосвязь между аналогом величины *c* и избирательностью взаимодействия этих групп была выведена из следующих фактов и предположений: 1) склонность пептидной группы NHCO включаться в α-спирали (или β-складчатые структуры) напрямую зависит от *электронодонорной силы* боковой группы, примыкающей к данной пептидной связи; 2) электронодонорную силу боковой группы можно определить по pK соответствующей (гомологичной) карбоновой кислоты (например, уксусной кислоты для аланина, муравьиной кислоты для глицина); 3) склонность каждого аминокислотного остатка (боковая цепь и прилегающие к ней функциональные группы пептидной связи) образовывать α-спиральную, β-складчатую конформацию или конформацию случайного клубка (полноразвернутую конформацию) можно установить эмпирически.

Итог анализа свойств функциональных групп пептидной связи и прежде всего карбонильного кислорода сводится к тому, что показана положительная линейная корреляция (с коэффициентом корреляции около 0,75) между α-спиральными потенциалами (склонностью вступать в водородные связи) 19 аминокислотных остатков (три группы данных, установленных эмпирически) и значениями pK гомологичных им карбоновых кислот. Столь сильная корреляция, в свою очередь, позволила выяснить природу избирательности карбонильных атомов кислорода полипептидного остова: при высоком значении аналога величины *c* (при высокой плотности электронов на них) остов полипептида предпочитает образовывать α-спиральную конформацию, при низком аналоге величины *c* он предпочитает адсорбировать, поляризовать и ориентировать молекулы воды с образованием многослойных ассоциатов из ее молекул.

4.2. Смена избирательности ключевых функциональных групп белка — физиологический смысл индуктивного эффекта

Изменение кислотности уксусной кислоты в ряду ее хлорпроизводных — классический пример индуктивного эффекта. В этом случае он возникает благодаря разрыву одних *ковалентных связей* (с водородом) и образованию других (с хлором). Мишенью индуктивного эффекта здесь служит так называемая *ионная связь* между карбоксильной группой и H^+. Однако теория АИ подразумевает, что явление индуктивного изменения электронной плотности на функциональных группах распространено гораздо шире, чем это может показаться. Так, водородные связи, их образование и разрыв, тоже могут служить *мишенями* индуктивного эффекта, распространяющегося на гораздо большие расстояния, чем размер молекулы уксусной кислоты. Сама смена контрагентов по взаимодействию с функциональными группами белка (от K^+ к Na^+, от водородных связей во вторичных структурах белка к водородным связям с молекулами воды) также может *инициировать* дальнодействующий индуктивный эффект (раздел 14.3, п. 1). Экспериментальные данные в пользу такого взгляда известны давно. Новым является их последовательное применение для объяснения фундаментальных физиологических явлений.

Это расширение роли индуктивного эффекта необходимо для физиологии клетки потому, что энергия активации, необходимая для разрыва и образования водородных и ионных связей, достаточно мала, чтобы эти процессы происходили самопроизвольно даже при физиологических температурах, тогда как энергия активации, сопряженная с разрывом и образованием ковалентных связей, обычно слишком велика, чтобы это могло происходить самопроизвольно, без участия специальных ферментов или других факторов. Величина *c* и аналог величины *c* представляют собой количественную меру раз-

личий в прочности ионных и водородных связей, а кардинальные адсорбаты осуществляют дальнодействующее влияние на величину *c* и аналог величины *c* различных функциональных групп, что ведет к образованию или диссоциации ионных или водородных связей в масштабе макромолекулы и клетки в целом.

4.3. Классификация кардинальных адсорбатов, включая биологически активные вещества

Увы, современная фармакология, да и фармакология прошлого не идет дальше простой констатации очевидного: молекулы лекарственного средства взаимодействуют с соответствующими им стереоспецифическими рецепторными центрами, вызывая в них конформационные изменения. Вы не найдете ответа на вопрос, почему эти изменения происходят. Самое трудное — дать объяснение очевидному. Что касается теории АИ, то она с самого начала рассматривала клетку как *электронную машину*, изменение электронных плотностей в которой находится под контролем кардинальных адсорбатов, к числу которых относятся и биологически активные соединения. Можно выделить три основных типа кардинальных адсорбатов: электронодонорные кардинальные адсорбаты (ЭДКА), электроноакцепторные (ЭАКА) и электроноиндифферентные (ЭИКА).

В следующем разделе я напомню, как ЭАКА и ЭДКА определяют физиологическое состояние клетки.

4.4. Как клетка поддерживается в состоянии покоя и что происходит при его изменении. Роль кардинальных адсорбатов

Когда АТФ и вспомогательные факторы находятся на своих местах, другие кардинальные адсорбаты — такие, как уабаин, инсулин или адреналин — могут провести тонкую настройку структуры клетки для выполнения определенных функций, необходимых на данный момент.

4.4.1. Поддержание живого состояния при помощи АТФ — электроноакцепторного кардинального адсорбата

АТФ отличается от всех остальных кардинальных адсорбатов: она — *главный кардинальный адсорбат* и, играя ключевую роль, способна самостоятельно (или при участии вспомогательных факторов) поддерживать живое состояние протоплазмы. Другие кардинальные адсорбаты могут лишь настраивать структуру клетки для выполнения всего спектра физиологических функций (исключительные условия, в которых живое состояние может непродолжительное время поддерживаться без, или почти без АТФ, см. в работе [107, p. 196]).

Распределение веществ между клеткой и средой. Одно из главных назначений АТФ как ЭАКА состоит в поддержании β- и γ-карбоксильных групп белков в состоянии, когда они селективно связывают K^+ в присутствии Na^+. Это достигается благодаря способности АТФ снижать плотность электронов (величину параметра *c*) на указанных группах в масштабе макромолекулы, а затем и всей клетки в целом (рис. 42). Кроме того, АТФ, действуя как акцептор электронов, удерживает ключевые белки клетки в полноразвернутой конформации, снижая плотность электронов (величину аналога параметра *c*) на карбонильных группах полипептидного остова. Сдвиг электронной плотности в этом направлении приводит к смене селективности этих групп от водородных связей с иминогруппами (в α-спиралях, например) к водородным связям с водой. Это приводит к развертыванию белковой молекулы и ее взаимодействию с водой с образованием многослойных структур из поляризованных и ориентированных молекул воды в масштабе, в конечном счете, всей клетки. Величина *q* гидратированного Na^+ и сахарозы в такой структурированной воде значительно меньше единицы (в соответствии с *правилом размера*), то есть их концентрация в клеточной воде ниже, чем в среде.

Проницаемость клеточной мембраны. Ключевые белки клеточной мембраны (поверхности клетки) обладают тем же фундаментальным свойством, что и ключевые белки всей протоплазмы: селективность их функциональных групп определяется АТФ. При истощении запасов АТФ в клетке или при ее удалении любым другим способом связанная вода на клеточной поверхности десорбируется и диффузионный барьер из слоев структурированной воды разрушается. Эти структурные изменения приводят к скачкообразному увеличению проницаемости клетки в микроскопически тонком поверхностном слое. Однако такие изменения могут произойти и в масштабе всей клетки.

Регуляция клеточного объема. В интактных клетках с нормальным уровнем АТФ величина *c* внутриклеточных β- и γ-карбоксильных групп низка, поэтому они избирательны к K^+ в присутствии Na^+. Именно по этой причине такие мышцы набухают в изотоническом растворе KCl — сродство фиксированных анионов к K^+ выше, поэтому их связи с фиксированными катионами (солевые связи) разрываются. Из-за низкого сродства фиксированных анионов к Na^+ изотонический раствор NaCl набухания не вызывает. Однако при повреждении уровень АТФ в клетке падает. Из-за утраты главного ЭАКА плотность электронов на β- и γ-карбоксильных группах увеличивается, а с ней возрастает и их избирательность к Na^+. В этих условиях обычно безобидный Na^+ крови обретает способность вызывать патологическое набухание поврежденных клеток, действуя подобно ионам K^+ в интактных клетках.

Потенциал покоя. Потенциал покоя, как и ионная проницаемость, определяется АТФ благодаря ее способности изменять селективность фиксированных анионов белка в пользу ионов K^+. Для поддержания нормального потенциала покоя в мышце лягушки необходим также главный конгруэнтный анион мышечного волокна — креатинфосфат (КрФ). Обработка метаболическим ядом или сочетание отравления

с повторяющимися электрическими импульсами влечет за собой постепенное снижение уровня КрФ, вместе с которым постепенно уменьшается и потенциал покоя волокна [107, pp. 294—299]. При полном истощении АТФ потенциал покоя исчезает.

4.4.2. Модуляция состояния покоя уабаином — электронодонорным кардинальным адсорбатом

Фармакологическое действие сердечного гликозида, как и всех, кроме АТФ, кардинальных адсорбатов, заключается в определенной настройке состояния покоя, создаваемого и поддерживаемого АТФ и ее помощниками. Здесь будет рассмотрено влияние лишь одного препарата — уабаина, хотя на рис. 52, 53 показаны и другие примеры, включая совместное действие двух и более кардинальных адсорбатов.

Распределение веществ между клеткой и средой. В простом опыте по влиянию уабаина на распределение K^+ и Na^+ между клеткой и средой мы инкубировали в стерильных условиях при 25 °С четыре небольшие мышцы лягушки общим весом около 400 мг [190], из которых около 60 мг приходилось на жидкость в межклеточном пространстве и соединительной ткани. Оставшиеся 340 мг — «чистые» мышечные волокна. После 72 часов инкубации в растворе Рингера с уабаином (0,11 л раствора, концентрация уабаина $3{,}26 \times 10^{-7}$ М) установилось новое равновесное распределение, при котором *практически все 0,11 моль/кг K^+ были замещены эквимолярным (0,11 моль/кг) количеством Na^+* [190, p. 442].

Этот эксперимент ставит важный вопрос: как столь ничтожное количество уабаина может вызвать полное замещение столь большого количества K^+ в клетке на Na^+? Расширим наши аналитические возможности, рассмотрев этот вопрос с трех сторон: с позиций исторически первой версии мембранной теории, затем ее надстройки в виде теории мембранных насосов и, наконец, с точки зрения теории АИ.

1. Старая мембранная теория: внутриклеточный K^+ и замещающий его Na^+ свободны. Единственным препятствием, разделяющим их, является непроницаемая клеточная мембрана. В такой модели уабаин может вызвать замещение клеточных ионов K^+ ионами Na^+ (скорее смешивание), лишь превратив мембрану в решето; K^+ через образовавшиеся отверстия выйдет наружу, а Na^+ — проникнет внутрь. В конце концов, в клетке останется мало K^+ и появится много Na^+, — столько, сколько его было в омывающем растворе Рингера.

2. Теория мембранных насосов: внутриклеточный K^+ и замещающий его Na^+ свободны. Силой, разделяющей их, является локализованный в проницаемой мембране насос, непрерывно качающий Na^+ из клетки, а K^+ — в клетку (из-за проницаемости мембраны эти катионы стремятся к установлению диффузионного равновесия). Уабаин подавляет работу этого насоса, что приводит к снижению

концентрации ионов K^+ в клетке и значительному увеличению концентрации в ней ионов Na^+. Если кому-то покажется, что я слишком упрощаю, познакомьтесь с публикациями [52] и [539].

3. Теория ассоциации-индукции: большинство внутриклеточных ионов K^+ в интактных клетках адсорбировано β- и γ-карбоксильными группами белков (одна карбоксильная группа — один катион); клеточная вода также связана и потому является плохим растворителем для Na^+ и других крупных молекул — например, сахарозы. На основе этих небезосновательных положений возможны три объяснения действия уабаина (помечены буквами А, В, С).

В модели 3А результат действия уабаина на клетку уподобляется последствиям снижения содержания в ней АТФ. Нарастающее количество солевых связей сводит на нет число фиксированных анионов, готовых взаимодействовать с такими катионами, как K^+ или Na^+; связанная вода превращается в свободную, в ту, что лучше растворяет Na^+, и его внутриклеточная концентрация возрастает исключительно за счет свободной фракции (увеличивается коэффициент распределения Na^+ между водой клетки и водой среды — q).

В модели 3В уабаин как ЭДКА увеличивает плотность электронов на β- и γ-карбоксильных группах и на карбонильных группах полипептидного остова. В результате адсорбированный K^+ замещается адсорбированным Na^+ из-за потери фиксированными анионами сродства к K^+ и увеличения сродства к Na^+, а у карбонильных групп возрастает сродство к иминогруппам, и они включаются в α- и β-структуры, образование которых сопровождается десорбцией воды, увеличением в клетке содержания свободной воды, которая лучше растворяет Na^+, что приводит к увеличению концентрации этого катиона в воде клетки, то есть к увеличению его свободной фракции.

В модели 3С уабаин увеличивает плотность электронов на β- и γ-карбоксильных группах, но не влияет существенно на плотность электронов на карбонильных атомах кислорода полипептидного остова. В результате адсорбированный K^+ эквимолярно замещается на Na^+, а концентрация свободного Na^+ в воде клетки остается неизменной, так как остается неизменным связанное состояние воды.

Модель 1 (старая мембранная теория) может быть сразу же отвергнута, так как любое повреждение клеточной мембраны (превращение ее в решето) сопровождалось бы выходом из клетки меченого Na^+, чего в соответствующих опытах с уабаином не происходит. Кроме того, у интактной клетки наблюдается постоянный выходной поток Na^+, и уабаин либо не влияет на скорость этого потока, либо снижает его в зависимости от того, добавляли его после или до нагрузки радиоактивным Na^+ [540].

Модель 2 (теория мембранных насосов) также может быть отклонена по целому ряду причин. Здесь достаточно привести лишь одну. Портняжная мышца лягушки в составе препарата безнасосной незамкнутой клетки (БНК, рис. 7), как видно из названия, лишена

функционирующей клеточной мембраны (с насосами или без), какую представляет ее себе модернизированная мембранная теория. Несмотря на это, такая мышца поглощает Na^+ и выделяет K^+ под влиянием уабаина точно так же, как и целая мышца в растворе Рингера с уабаином (рис. 8В). Следовательно, изменение содержания K^+ и Na^+ в клетке, вызванное действием уабаина, не имеет ничего общего с работой каких-либо мембранных насосов.

Модель 3В (вариант В, теоретически возможный в рамках 3-й модели — теории АИ) также может быть отклонена, так как в этом случае суммарное количество Na^+ в клетке после обработки уабаином должно заметно превышать исходное суммарное содержание в ней K^+ и Na^+ (K^+ на фиксированных анионах, замененный на Na^+, плюс Na^+, растворенный в клеточной воде, которая стала обычной объемной водой, хорошим растворителем для этого иона), что противоречит фактам: на самом деле суммарное содержание клеточных K^+ и Na^+ под влиянием уабаина остается таким же, каким оно было до его воздействия (рис. 57).

Главное различие моделей 3А и 3С — физическое состояние Na^+, поглощенного мышечными волокнами под влиянием уабаина. Если бы весь Na^+, поглощенный под действием этого гликозида, был адсорбирован, то нам пришлось бы исключить и модель 3А, которая допускает прирост лишь свободного Na^+. Как видно из приведенных в разделе 15.1, п. 3 экспериментальных данных, среди которых и данные ЯМР из табл. 5, и электронные авторадиомикрофотографии на рис. 58а, поглощенный под влиянием уабаина Na^+ действительно находится в клетке в связанном состоянии, и поэтому модель 3А отпадает. Добавлю, что это также еще один довод против моделей 1 и 2, постулирующих свободное состояние внутриклеточного Na^+.

После исключения ложных объяснений, в том числе и тех, которые предложены теорией АИ, я продолжу анализировать имеющиеся экспериментальные данные на основе единственной выжившей модели 3С, которая, естественно, повторяет уже сделанный ранее вывод, что уабаин вызывает замещение в масштабе всей клетки адсорбированного K^+ эквимолярным количеством Na^+, никак не влияя при этом на связанное состояние клеточной воды (раздел 15.1, п. 3).

Для дальнейшего рассмотрения этого вопроса нам необходимо оценить количество β- и γ-карбоксильных групп, селективность которых переключается с K^+ на Na^+ под действием *одной* молекулы уабаина.

Я исхожу из того, что *все* присутствовавшие в растворе молекулы уабаина (количество которых равно $0{,}11 \times 3{,}26 \times 10^{-7}$, или $3{,}59 \times 10^{-8}$ моль) поглощаются мышечным волокном и связываются в нем со своими кардинальными центрами (рецепторами). Общее количество β- и γ-карбоксильных групп, в которых под влиянием уабаина происходит замена K^+ на Na^+ согласно данным эксперимента, равно $0{,}110 \times 3{,}40 \times 10^{-4}$, или $3{,}74 \times 10^{-5}$ моль. Разделив число молекул уабаина в мышце ($3{,}59 \times 10^{-8}$ моль) на количество β- и γ-карбоксильных групп, свойства которых он изменил ($3{,}74 \times \times 10^{-5}$ моль), мы получаем, что каждая молекула уабаина контролирует селективность 1042 β- и γ-карбоксильных групп.

Разве не удивительно, что адсорбция всего лишь одной молекулы уабаина клеточными структурами приводит к десенсибилизации к K^+ более тысячи β- и γ-карбоксильных групп? А ведь каждый из этих 1042 ионов K^+ или заместившего его Na^+ является не частью хаотичного потока ионов, из чего исходит мембранная теория (модели 1 и 2), а адсорбирован β- или γ-карбоксильными группами белков (в соотношении 1 : 1) и организован в клеточном пространстве в регулярные структуры, которыми являются и сами белки-адсорбенты, и образованные ими структуры, как А-диски миофибрилл. При этом каждый акт связывания *индивидуален* и *локализован*. Поскольку свойства ионов K^+ и Na^+ относительно стабильны, различия в их взаимодействии с каждой из β- и γ-карбоксильных групп отражают изменение параметров ближнего взаимодействия с ними со стороны самих карбоксильных групп — таких, например, как локальная электронная плотность на них — величина *c*. Можно сказать и по-другому: ничтожное количество уабаина каким-то образом превратило нашу протоплазматическую «ионообменную смолу» из смолы сильнокислотного сульфонатного типа (селективного к K^+ в присутствии Na^+) в смолу слабокислотного карбоксильного типа (с большим сродством к Na^+). Такое изменение невозможно объяснить каким-то особым размером пор в смоле, как я это пытался сделать в 1957 году, сидя в ресторане «Хауард Джонсон» в Филадельфии, но отбросил позднее эту идею без всякого сожаления. Не может это быть обусловлено и поляризуемостью функциональных групп коллоидов под влиянием свободных ионов, как предполагал Бунгенберг-де-Йонг в 1940-х годах. Однако различную селективность смол может объяснить идея Эйзенмана, Рудина и Кесби — идея о различной плотности электронов, количественным выражением которой является величина *c* (рис. 42), предложенная в порядке дальнейшего развития теории фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ).

Если все дело в изменении величины *c* β- и γ-карбоксильных групп белков под влиянием уабаина, то тогда его действие должно подчиняться правилу «все или ничего». Физики, изучая неживой мир, обнаружили, что этому правилу подчиняются так называемые ферромагнитные, или (авто)кооперативные явления, для которых характерна высокая положительная *энергия взаимодействия соседних центров* ($-\gamma/2$). Но коренное отличие биологических автокооперативных явлений в том, что соседние центры, взаимодействующие в биологических системах, расположены друг от друга *гораздо дальше*, чем в тех же ферромагнетиках. Это должно быть ясно из содержания раздела 16.6, п. 2, и из особенностей молекулярного механизма передачи индуктивного эффекта, рассмотренного в разделе 14.3, п. 6.

Теоретически, и падение костяшек домино, и передача дымовых сигналов по Великой китайской стене, и взаимодействие соседних центров в белке (рис. 50 и 51) могут распространяться на сколь угодно большое расстояние без угасания. Как медный провод объединил в свое время мир, так и индуктивный эффект благодаря своей чрезвычайной экономичности и дальнодействию может служить *уникальным* свойством протоплазмы, объединяющим различные ее составляющие в согласованную, интегрированную систему. В основе механизма интегрирования лежит *уникальная* особенность всех белков — *резонансная природа полипептидной цепи* (кето-енольная таутомерия), ассоциирующаяся с резонансными структурами ароматических соединений, например.

Возможно, действие уабаина на β- и γ-карбоксильные группы опосредовано его влиянием на другие кардинальные адсорбаты. Но одно бесспорно: в использованных концентрациях ($3{,}26 \times 10^{-7}$ М) уабаин никак не влияет на уровень АТФ в клетке [190, Fig. 9]. Даже если действие уабаина опосредовано, это не меняет сути: его действие в конечном счете выражается в изменении сродства β- и γ-карбоксильных групп, что приводит к важным последствиям для физиологического состояния клетки.

Проницаемость. В опытах по ингибированию поступления меченого Cs^+ в яйцеклетки лягушки под влиянием Rb^+ и Na^+ Линг и Фу [398] показали, что присутствие уабаина повышает сродство поверхностных β- и γ-карбоксильных групп к Na^+, и снижает к Rb^+ (рис. 62). Уабаин играет роль ЭДКА, вызывая повышение величины *c* (увеличение электронной плотности) у всех карбоксильных групп, как это следует из данных по изменению характера равновесного распределения ионов между мышцами лягушки и средой под влиянием уабаина [280].

Регуляция объема клетки. Истощение АТФ, как известно, сопровождается набуханием клетки, степень которого зависит от уровня Na^+ в окружающей среде (рис. 63). Теоретически, эффекты *истощения* количества в клетке какого-либо ЭАКА (такого, как АТФ, например) и *увеличения* содержания в ней какого-либо ЭДКА (например, уабаина) должны быть сходными (и в том, и в другом случае плотность электронов на ключевых функциональных группах белков возрастает). Это предсказание теории подтверждается в неопубликованной работе Линга и Бор: уабаин в концентрации $3{,}26 \times 10^{-7}$ М, слишком низкой, чтобы влиять на уровень АТФ, вызывает набухание мышечных волокон, степень которого зависит от концентрации Na^+ в среде.

Потенциал покоя. Если данные Акаике (рис. 68) проанализировать при помощи уравнения A19 (рис. 69), то становится очевидным, что уабаин действует как ЭДКА, вызывая повышение величины *c* у всех β- и γ-карбоксильных групп на поверхности мышечных волокон крысы, автокооперативно повышая их сродство к Na^+ и снижая к K^+.

4.5. Обратимые физиологические явления

4.5.1. Истинный активный транспорт

У животных, живущих в пресных водах с концентрацией Na^+ лишь около 0,2 мМ, содержание Na^+ в крови составляет около 100 мМ [15, Table 3.3]. Значит, те же лягушки способны поглощать этот ион из окружающей среды.

Данные рис. 41 говорят о том, что кожа лягушки чрезвычайно слабо проницаема для сахарозы. Поскольку величины *q* для сахарозы и Na^+ зачастую мало отличаются, можно ожидать, что скорость проникновения Na^+ также будет низка из-за мощного диффузионного барьера, которым является структурированная вода на наружной поверхности (мембране) эпителиальных клеток. Поэтому для того, чтобы объяснить движение Na^+ в организм лягушки (против градиента концентрации 500 : 1), одной проницаемости мало. В теории АИ механизм истинного активного транспорта состоит из двух мембран, действующих подобно клапанам, и белка-аккумулятора между ними, периодически связывающего и высвобождающего Na^+ (рис. 65).

Наружная поверхность кожи лягушки содержит большое количество β- и γ-карбоксильных групп с высокой плотностью электронов на них, благодаря чему они избирательно и прочно адсорбируют Na^+. Локальная концентрация этого катиона на поверхности кожи становится гораздо выше, чем в среде. В этом заключается первый этап транспорта Na^+.

Затем накопившиеся на поверхности клетки ионы Na^+ проникают в нее путем дублетной и/или триплетной адсорбционно-десорбционной диффузии (рис. 35 и 36). Проникнув внутрь, они адсорбируются β- и γ-карбоксильными группами белка-аккумулятора, избирательность которых зависит от АТФ, а также от других, вспомогательных, кардинальных адсорбатов (*совместное действие* всех факторов приводит к увеличению плотности электронов на этих группах, и поэтому их сродство становится выше к Na^+; пример — совместное действие АТФ с уабаином; см. рис. 57, раздел 14.3, п. 7). Когда количество адсорбированного Na^+ достигает порога, активируется Na,K-АТФаза белка-аккумулятора, и АТФ расщепляется.

За расщеплением АТФ следует десорбция Na^+ со всех белков-аккумуляторов (то есть с Na^+-аккумулирующего белкового матрикса). Одновременно десорбируется и связанная вода цитоплазмы и внутренней мембраны эпителиальной клетки. В клетке возникает объем со свободной водой, хорошо растворяющей Na^+ — своего рода канал, ведущий из клетки во внутреннюю среду организма. По этому туннелю, «прорубленному» в толще связанной воды, свободный Na^+ выходит из эпителиальной клетки в кровоток, вода в котором также свободна. Регенерация АТФ знаменует подготовку к следующему циклу.

Данная модель истинного активного транспорта через кожу лягушки требует от эпителиальных клеток участия в циклических (об-

ратимых) процессах, которые трудно зарегистрировать ввиду малого размера клеток. Поэтому мы благодарны Бруксу за демонстрацию циклического поглощения Rb^+ из окружающей среды протоплазмой *Nitella* с последующим циклическим высвобождением этого иона в центральную вакуоль (рис. 67).

4.5.2. Потенциал действия

Разгадка такого явления, как потенциал действия, — величайшее достижение физиологии клетки в XX веке. Но я считаю, что мембранная теория, на принципах которой основано объяснение этого феномена, по своей сути, увы, неверна. В нервных и мышечных волокнах «течет» вовсе не разбавленный раствор свободных электролитов в свободной воде, как это считалось сто лет назад, и в чем многие убеждены и теперь. Мембранный потенциал существует только в воображении апологетов мембранной теории, а не в реальном мире живых и искусственных мембран. Большинству ученых не удалось показать, что изменение уровня K^+ в клетке влияет на потенциал покоя. Потенциал покоя безразличен и к уровню ионов Cl^- и Mg^{2+} в окружающей среде, несмотря на то, что мембрана для них легко проницаема. Есть и другие свидетельства, противоречащие принципам теории потенциала действия Ходжкина и Хаксли. Так, например, не может быть натриевого потенциала по Ходжкину и Хаксли; невозможен и так называемый натриевый канал, столь же бессмысленный, как и канал, построенный в открытом море.

Согласно теории АИ, потенциал действия, как и потенциал покоя, на основе которого он развивается, представляет собой электрическое явление, возникающее благодаря β- и γ-карбоксильным группам, рассыпанным по поверхности клетки. Потенциал действия — автокооперативный процесс, распространяющийся по поверхности протоплазмы нервного или мышечного волокна или другой возбудимой клетки. Он сопровождается временным согласованным повышением величины c всех поверхностных β- и γ-карбоксильных групп, что приводит к резкой смене их сродства с K^+ на Na^+. Одновременно происходит увеличение аналога величины c всех карбонильных групп полипептидного остова белков, ведущее к деполяризации воды в поверхностных слоях клетки, превращению ее в обычную воду и к соответствующему росту величины q для ионов Na^+, сахарозы и других веществ.

В пользу такого понимания говорят данные о временном повышении pK поверхностных β- и γ-карбоксильных групп белков, ответственных за поступление Na^+ в клетку, и о временной смене их избирательности с характерного для состояния покоя порядка $Rb^+ > K^+ > Na^+$, соответствующего низкой величине c, на обратный порядок, свидетельствующий о резком увеличении плотности электронов на этих группах.

Объяснение потенциала действия, предложенное теорией АИ, находит подтверждение в данных Тасаки и сотр. [524], показавших, что прохождение потенциала действия по нерву краба сопровождается стремительным локальным набуханием аксона (раздел 15.6), по времени совпадающим с потенциалом действия.

Триумфом теории АИ явилась работа Виллегаса, Блей и Виллегас [262], блистательно показавших, что во время потенциала действия поверхность аксона кальмара становится на мгновение более проницаемой для крупных молекул эритритола, маннита и сахарозы, если в среде присутствует Na^+. Это Na^+-зависимое повышение неизбирательной проницаемости для неэлектролитов с большим молекулярным объемом идеально соответствует пониманию потенциала действия теорией АИ. Мы постоянно говорили о том, что распад ионо-водо-белкового комплекса с АТФ приводит к перераспределению электронной плотности в молекуле белка и, как следствие, к *одновременному* наступлению ряда событий, в том числе к изменению поверхностного адсорбционного электропотенциала и десорбции воды. Именно это последнее ведет к разрушению диффузионного барьера на поверхности клетки, и крупным молекулам становится легче проникать в нее. Ионы Na^+, адсорбируясь на места, занимавшиеся K^+, значительно ускоряют распад ионо-водо-белкового комплекса. Поэтому эти ионы так необходимы. Соответствие данных упомянутой работы требованиям теории АИ превзошло самые смелые ожидания. Ведь авторы этого первоклассного исследования вряд ли знали о существовании теории АИ. Случайные находки такого рода стали бы закономерными, если бы теория АИ была широко известна.

5. Мертвое состояние

Физико-химическая теория жизни была бы неполной, если бы ее не завершала физико-химическая теория смерти: ведь жизнь и смерть — это два состояния одной и той же структуры — протоплазмы.

5.1. Жизнь и смерть протоплазмы

Когда Томас Хаксли прочел в 1869 году одну из своих знаменитых воскресных лекций «Физическая основа жизни» [72], ему ответили не только горячими аплодисментами, но и резким несогласием. Так, шотландский философ Джеймс Хатчинсон Стерлинг выступил с концепцией единого вещества, воплощениями которого были и омар, и баранина, и ростбиф, и сам человек, который всем этим питается [3, p. 308]. Стерлинг явно упустил из виду очевидное различие между прожаренным ростбифом и живым человеком. Чтобы парировать аргументы своих противников, Хаксли нужно было дать определение жизни и смерти на субклеточном уровне. Только так можно было провести границу между жареным и живым. Однако тогда рассмотреть этот вопрос на таком уровне было непросто, в чем можно убедиться на других примерах из истории науки.

Август Вейсман (1834—1915), разделявший живое вещество на *зародышевую плазму* и *сому*, оказался в затруднительном положе-

нии, когда попытался объединить их в более широкое понятие, каким является протоплазма. Ему пришлось признать, что, поскольку на тот момент никто не представлял себе разницы между мертвым «протеидом» и живым, можно лишь сделать предположение, что суть различий кроется на физико-химическом уровне [3, p. 344]. Уже в наше время, когда физико-химические подходы в биологии стали еще более актуальными, историк Томас Холл попытался бросить свежий взгляд на эту проблему [3, p. 344]. Однако все, что ему удалось — это привести череду мнений современных биологов (живо напоминавших застарелую «теорию» Стерлинга), что границу между жизнью и смертью можно провести только на уровне целой клетки, что это невозможно сделать на уровне ее структуры — протоплазмы [3, p. 310].

Знал ли Холл, что такая возможность появилась еще за семь лет до его публикации? Что это стало возможным благодаря «Физической теории жизни: теории ассоциации-индукции» [98]? Вряд ли.

Но и в этой книге, в частности, в разделе 14.2, п. 1, достаточно материала для размышлений на эту тему. Феномен жизни может и должен поддаваться пониманию и на субклеточном уровне, а не только на уровне целой клетки. Основа для такого понимания — физико-химические свойства фундаментальной структуры — протоплазмы. Работа именно этой структуры обеспечивает все формы жизнедеятельности.

5.2. Как протоплазма умирает

Согласно теории АИ, покоящееся живое состояние — это состояние метастабильного равновесия. Подобно монете, стоящей на ребре, система в метастабильном состоянии может легко выйти из равновесия вследствие любого возмущения. Однако я ограничусь лишь двумя: нагреванием и отравлением.

Говоря о гибели мышцы лягушки от нагревания, я подчеркивал, что движущей силой этой трансформации является прирост энтропии. Однако мышца лягушки погибает при температуре, которая является нормальной для тканей птиц, например, не говоря уже о микроорганизмах. Выходит, что одно и то же повышение температуры гибельно для протоплазмы одних клеток и безразлично для других. Может ли связанный со смертью прирост энтропии столь сильно различаться в протоплазме лягушек и птиц? Нет, потому что величина q ионов Na^+ (и сахарозы), численно отражающая физическое состояние клеточной воды, мало отличается в клетках различных животных и даже растений.

Различие летальных температур обусловлено различием сил, стабилизирующих структуру живой протоплазмы — к примеру, прочностью солевых связей (раздел 15.3). Такое объяснение согласуется с теорией *термостабильности* живых организмов Перутца [322]: в одних и тех же ферментах, выделенных из более термостабильных бактерий, содержится больше солевых связей. Несмотря на то, что

конечный результат летального действия температуры и ядов один, последние убивают клетку другим способом.

Хотя мышцы лягушки обрабатывали десятью ядами с совершенно разными токсикологическими характеристиками (рис. 19), смерть наступала при одинаковом, критическом, падении уровня АТФ в клетке. Это подтверждает справедливость постулата теории АИ о ключевой роли АТФ в поддержании живого состояния (раздел 16.6, п. 1.4). Поскольку АТФ является ЭАКА, ее потеря влечет за собой критическое (надпороговое) *увеличение* электронной плотности на всех ключевых функциональных группах белков: на β- и γ-карбоксильных группах и на карбонильных группах полипептидного остова (повышение величины c и аналога величины c, соответственно). Поэтому в гибнущей протоплазме происходит десорбция K^+ и воды. И, что забавно, белки в погибшей клетке приобретают конформацию, близкую к так называемой «нативной».

5.3. Анатомия мертвой протоплазмы

В теории АИ покоящееся живое состояние представляет собой состояние с высокой отрицательной энергией (с большим запасом энергии) и низкой энтропией. Нагревание разрушает это состояние, высвобождая связанные K^+ и воду, приводя к росту энтропии. Яды приводят к тому же результату, но посредством подавления процесса регенерации АТФ.

Рост плотности электронов (или плотности заряда) на карбонильных группах полипептидного остова при истощении АТФ способствует десорбции клеточной воды. Освобождающиеся из связи с водой CO- и NH-группы пептидных связей могут участвовать в образовании α-спиральной структуры или β-складчатого листа. С ростом плотности заряда на β- и γ-карбоксильных группах (с ростом величины c) адсорбированный K^+ замещается на Na^+ или на фиксированные катионы (при образовании солевых связей между фиксированными зарядами). Однако, по имеющимся данным, Na^+ адсорбируется *не полностью и на короткое время*, также замещаясь вскоре фиксированными катионами, образующими более прочные связи с фиксированными анионами, чем Na^+. Именно образование солевых связей внутри молекул белка и между ними объясняет, почему протоплазма погибших мышц плотнее, чем у живых, и менее податлива, чем насыщенная ионами Na^+ карбоксильная ионообменная смола. При этом солевые связи между фиксированными зарядами образуются несмотря на то, что окружающая среда, будь то морская вода, кровь, тканевая жидкость или раствор Рингера, обычно богата ионами Na^+.

Все эти изменения при умирании можно проследить от *автокооперативного* разрушения протоплазматического ансамбля белков, воды и ионов до полного формирования всех солевых связей между фиксированными анионами и фиксированными катионами. В живом состоянии АТФ и K^+ адсорбированы, а вода поляризована, ори-

ентирована и ограничена в своей подвижности полноразвернутыми белковыми цепями. В мертвом состоянии АТФ разрушена, а адсорбированный K^+ и конгруэнтные анионы, как и молекулы воды, становятся свободными (рис. 44, 48, 51). Однако остается ответить еще на один вопрос. Почему все-таки именно фиксированные катионы, а не Na^+, являются конечным пунктом в череде взаимодействий, в которые вступают β- и γ-карбоксильные группы при гибели клетки?

Расчеты, представленные на рис. 42 (и соответствующие экспериментальные данные), позволяют нам утверждать, что при низкой величине *c* на известных фиксированных анионах они избирательны к K^+ в присутствии Na^+, и наоборот, с ростом величины *c* сродство к Na^+ возрастает. Трудность в том, что нам неизвестно положение в ряду селективности фиксированных катионов (ε-аминогрупп, гуанидиновых групп и др.). Мы можем лишь предполагать, что оно находится где-то рядом с ионами NH_4^+ (раздел 14.1, п. 2). Но кривая, рассчитанная для NH_4^+, не дает нам никаких оснований полагать, что ионы NH_4^+, а, значит, и фиксированные катионы более предпочтительны для фиксированных анионов, чем Na^+ в условиях, когда связанный K^+ утрачен из-за критически низкого содержания в клетке АТФ. Может быть, есть еще какой-то механизм, который позволил бы нам объяснить, почему солевые связи между фиксированными зарядами образуются с такой неотвратимостью? Такой механизм действительно существует, и он был уже упомянут в разделе 15.3, п. 2.

Чтобы разобраться с этим механизмом, снова обратимся к уравнению (4) из раздела 15.3, п. 1, и подставим вместо X^+ ион K^+, а вместо Y^- — конгруэнтный анион. Внутренняя среда интактной клетки представлена поляризованной, ориентированной клеточной водой, а ионное равновесие смещено вправо (когда K^+ и конгруэнтные анионы адсорбированы). Концентрация свободного K^+ и конгруэнтных анионов в клетке снижается еще больше не только потому, что они переходят в связанное состояние, но и в результате вытеснения оставшегося свободным K^+ из клетки структурированной клеточной водой, сравнительно плохим растворителем (величина *q* для этих ионов принимает низкие значения). Если K^+ или конгруэнтные анионы спонтанно диссоциируют в покоящейся клетке, то прирост энтропии, вызванный такой диссоциацией, будет сравнительно невелик из-за ограниченной подвижности этих ионов в неподвижной структурированной клеточной воде.

С другой стороны, когда клетка начинает разрушаться из-за падения уровня АТФ (универсальная причина ее трансформаций и гибели), связанный K^+ начинает замещаться ионами Na^+ до тех пор, пока этот процесс не достигнет критического уровня, за которым начинается разрушение структурированной воды. До этого переломного момента связанная вода (обеспечивающая низкую величину *q*), способствовавшая адсорбции K^+, способствует связыванию и Na^+ (как в опытах с уабаином).

Но с окончательной утратой АТФ ситуация резко меняется — клетка гибнет, вода из структурированной превращается в обычную объемную воду. Величина *q* для Na^+ и конгруэнтных анионов растет, приближаясь к единице, десорбция ионов происходит теперь уже в условиях полной свободы перемещения. Однако присмотримся к фиксированным катионам.

Фиксированные катионы (ε-аминогруппы остатков лизина, гуанидиновые группы остатков аргинина) не могут освободиться от связи с белком и стать свободными *при физиологических условиях*, они по-прежнему остаются фиксированными (кислотные группы, разу-

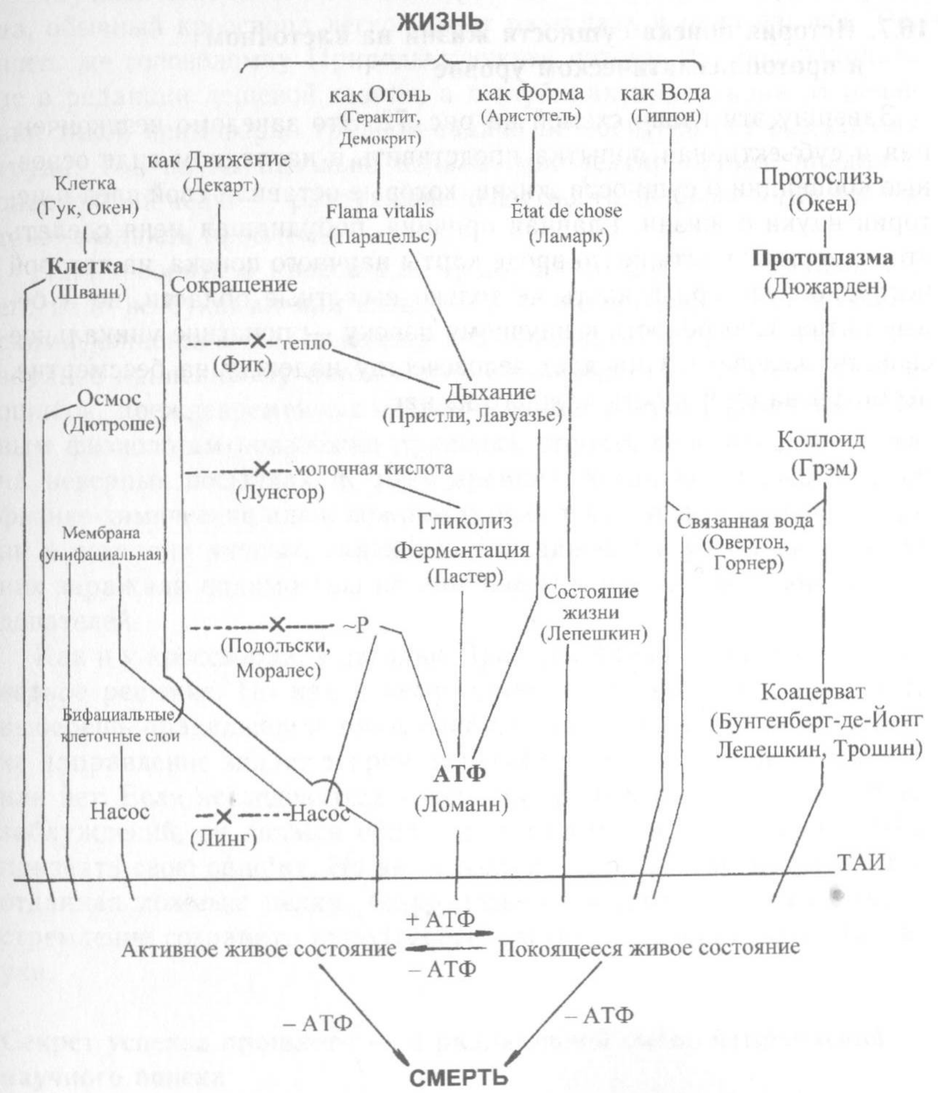


Рис. 72. История поиска сущности жизни на клеточном и протоплазматическом уровне. Роль в истории биологии Лоренца Окена (Lorenz Oken, 1779—1851), лишь вскользь упомянутого в книге, см. в работе [15, p. 6].

меется, тоже). Поэтому при гибели клетки, деполяризации воды и десорбции K^+, Na^+ и конгруэнтных анионов фиксированные катионы своего статуса не меняют. В конкуренции свободного катиона (Na^+) и фиксированного катиона за фиксированный анион побеждает последний из конкурентов, потому что фиксированные катионы (как и фиксированные анионы) образуют, как мы уже знаем, более прочные связи именно с *фиксированными* противоионами. В результате равновесие реакции в уравнении (4) при гибели клетки полностью сдвигается влево, а погибшая протоплазма стягивается солевыми связями во все более плотный белковый матрикс, вплоть до *трупного окоченения*.

16.7. История поиска сущности жизни на клеточном и протоплазматическом уровне

Завершу эту главу схемой на рис. 72. Это заведомо незаконченная и субъективная попытка представить в наглядном виде основные концепции о сущности жизни, которые оставили свой след в истории науки о жизни. Главная причина, побудившая меня сделать это — желание дать нечто вроде карты научного поиска, на которой нетрудно будет разглядеть не только известные области, но и белые пятна. Способность к научному поиску — поистине уникальное свойство человека. Она дает человечеству надежду на бессмертие, несмотря на смертность каждого из нас.

ЭПИЛОГ

Разгадывание кроссворда или охота на лис: две модели научной работы.

Научный поиск в чем-то схож с разгадыванием кроссворда. Правда, обычный кроссворд легко может разгадать и один человек. Решить же головоломку Природы сложнее потому, что она родилась не в редакции дешевой газеты, а в глубинах мироздания. В решении такой неимоверно трудной задачи не обойтись без разделения труда. Так наука невольно начала фрагментироваться, впадая в опаснейший недуг — разрушение целостности. У физиологии клетки тоже возникли проблемы.

Если говорить о кроссворде «физиология клетки», то заполнять его надо не буквами или словами, а концепциями, физико-химическими концепциями. Поскольку познание истины происходит не по заранее написанному отточенному сценарию, а *в процессе* проб и ошибок, преждевременных озарений и запоздалых прозрений, первым физиологам неизбежно пришлось строить свои представления на неверных посылках. К тому времени, когда появились верные физико-химические идеи, ложные успели уже пустить глубокие корни в сознании ученых, оказались вписанными в учебники и через них заражали видимостью истины новые и новые поколения исследователей.

Как и у кроссворда, у загадки Природы может быть только *одно, верное* решение. Но как к нему придти? Это как в охоте на лис: выберешь правильное направление погони — и добыча твоя. В науке направление задает теория, независимо от того, правильная она или нет. Если исследователь совершил ошибку и оказался в болоте заблуждений, он должен обладать смелостью и мудростью, чтобы признать свою ошибку. Но это в теории. На деле, карьера и жизнь, отданная ложным целям, безраздельно довлеют над человеком, а стремление сохранить лицо (скорее маску) разрушает ценности науки.

Разгадывание кроссворда или охота на лис: две модели научной работы

Секрет успехов прошлого — в радикальной смене направления научного поиска

Фрагментация — угроза будущему науки

Всеобъемлющая теория, которая могла бы собрать Шалтай-болтая

Система образования — ключ к будущему биологии

«Предел науки — бесконечность», мысль, которая всегда будет маяком для истинного исследователя

Секрет успехов прошлого — в радикальной смене направления научного поиска

Несмотря на значительные трудности, науке удавалось в прошлом совершать радикальные перемены. Эти перемены были названы *научными революциями*. Почему они удавались? Прежде чем попытаться найти ответ, давайте не будем забывать, что научные

революции, вне зависимости от их успешности, никогда не проходили гладко. За свой научный подвиг Бруно был сожжен на костре, Галилей провел остаток жизни в темнице, а Земмельвейс умер в сумасшедшем доме только потому, что требовал от врачей дезинфицировать свои руки. Лишь с наступлением эпохи Просвещения начали появляться выдающиеся люди, которые успевали еще при жизни увидеть торжество своих идей.

Предложение заменить общепринятую, но неверную теорию на истинную обычно вносилось одним или несколькими учеными. Именно это я называю первым этапом научной революции [107, p. 319]. Однако наука — не аморфный конгломерат ученых, новую революционную теорию должно принять достаточно сплоченное научное сообщество. Именно эту перемену во мнении большинства историки называют научной революцией, но для меня это лишь второй этап революции (в предыдущих работах я называл первым этапом — революцию в голове ученого, а вторым — научную революцию в трудах историка) [107, p. 319]. Второй этап, понятно, гораздо труднее первого. Великий физиолог и физик Герман фон Гельмгольц в лекции о Фарадее в 1881 году сказал: «...зачастую умному человеку легче открыть миру новую истину, чем понять, почему остальные ее не принимают» [537, p. 1].

Чтобы пояснить, как научные революции попадают в историю, я приведу два примера.

Джозеф Пристли (1733—1804) был и ученым, и министром. Как уже было сказано, он открыл кислород, однако принял его за «дефлогистированный воздух». Пока Антуан Лавуазье не доказал, что это был именно кислород в нашем современном понимании, Пристли сражался с ним всеми доступными средствами, но, в конце концов, понял, что Лавуазье прав. Совершив поворот на 180 градусов, Пристли начал превозносить «химическую революцию» Лавуазье с бьющим через край восхищением и энтузиазмом: «В науке можно найти совсем немного революций, столь великих, неожиданных и всеохватывающих...» [346]. Тут же новая теория Лавуазье была принята всеми остальными учеными.

Майкл Фарадей (1791—1867) вырос в Лондоне, в бедной семье и не сумел получить регулярного образования. Однако его идеи в области электричества и магнетизма совершили революцию в физике, им был создан первый электрический двигатель. Но почти все коллеги-современники чурались его. Некоторые даже предлагали ему «заново пройти математику за шестой класс, прежде чем соваться в океан Лапласовой физики» [366, p. 507]. Но мир не без проницательных людей.

Уильям Томсон (лорд Кельвин) и в особенности Джеймс Клерк Максвелл по достоинству оценили вклад Фарадея в науку. Максвелл позже сам совершил один из величайших прорывов в физике, предложив знаменитую волновую теорию света, согласно которой, свет представляет собой электромагнитные волны. Однако он всегда настаивал, что именно идеи Фарадея легли в основу его теории поля [54, p. 509, p. 513]. Так завершилась другая научная революция.

Через восемьдесят девять лет после смерти Фарадея Альберт Эйнштейн — вероятно, величайший ученый всех времен — писал: «Нам, впитавшим идеи Фарадея, так сказать, с молоком матери, трудно оценить по достоинству все их величие и мужество их творца» [365, p. 101]. Самое удивительное, что Фарадей совершил все это, «не воспользовавшись ни одной математической формулой» [537, p. 1].

Эти два исторических примера учат нас, что секрет успеха научных революций прошлого крылся в глубочайшей приверженности их главных действующих лиц и научного сообщества в целом принципам *честной игры, спортивного поведения*. Можно спросить: неужели эта формула успеха столь трудна, что ее соблюдения нельзя ожидать от простых людей?

Думаю, это так. В самом деле, спортсмен участвует в соревнованиях с намерением победить в честной борьбе без всякой задней мысли. Правда, время от времени сообщается, что кто-то пользовался запрещенными препаратами или пытался переубедить арбитра применением физической силы, но это лишь редкие исключения. Все спортсмены овладевают наукой побеждать и проигрывать. Именно в соблюдении общепринятого морального кодекса честной игры и заключен сам дух спорта. Однако этот дух не приходит сам. *Ребенок начинает учиться ему в тот день, когда впервые участвует в игре* — у родителей, тренеров и всех тех, кто бескорыстно любит игру, понимает ее и своим примером прививает остальным законы спортивной чести, зная, что без них торжество игры немыслимо. В спорте честная игра поощряется еще и тем обстоятельством, что любой зритель может вполне уверенно судить о ее честности. В конце концов, спорт — это и зрелище.

Увы, спортивный дух, столь же важный для науки, как и для спорта, едва теплится в такой научной сфере, как физиология клетки, начиная со второй половины XX века (за всю науку говорить не буду). Упадок нравов начался тихо и незаметно, когда в 1940-е годы государство начало финансировать научные исследования через систему грантов. Чтобы проводить отбор тех, кому поддержку оказывать, а кому нет, была введена *система экспертных оценок* [348; 349].

Само по себе государственное финансирование — *огромное благо* для науки и ученых, в том числе и для меня. Однако люди, избираемые в экспертные комиссии, в отличие от арбитров в спорте, сами участвуют в соревнованиях за призы, которые присуждают. Часто они забывают, что науке не выжить без честной игры, и видят в неумолимо надвигающейся научной революции угрозу своей личной выгоде и авторитету. Пользуясь доверенной им властью, они пытаются ее сдержать [247; 350]. В отличие от спорта, деятельность этих арбитров обычно скрыта от зрителей и даже анонимна.

Создание и внедрение в практику чего-то лучшего, чем эта вездесущая система «экспертных оценок», — чтобы по-настоящему свежие идеи начали поощряться, а не подавляться, — дело чрезвычайной срочности. Пока соответствующая реформа не будет проведена, система экспертных оценок в ее современном виде будет оставаться кандалами науки такой великой страны, как Соединенные Штаты Америки, которые не терпят посягательств на свободу и в гораздо менее важных вопросах.

Фрагментация — угроза будущему науки

В своей «Истории физиологии» Карл Ротшух указал, что с ростом числа физиологов количество научных журналов возросло до такой степени, что «физиология перестала быть единым предметом для преподавания, что фактически равноценно концу этой дисциплины как области научного поиска с четкими границами» [352, p. 349].

Это было сказано в 1973 году по поводу так называемой органной физиологии — физиологии почек, физиологии пищеварения и т. д. Однако в физиологии клетки дела обстоят не лучше. Она тоже потеряла целостность очертаний, распавшись на биохимию, биофизику, фармакологию, биологию клетки, молекулярную биологию, математическую биологию, и т. д., и т. п. Введение системы экспертных оценок раздробило эту область еще больше — по числу экспертов, мнению которых жизненно необходимо соответствовать.

Всеобъемлющая теория, которая могла бы собрать Шалтай-болтая

«Извечная тайна мира — его познаваемость» (Иммануил Кант). И познаваемость его во многом обязана тому, что природа часто оказывается проще, чем наше представление о ней. Это обстоятельство породило принцип «бритвы Оккама»: «То, что можно объяснить посредством меньшего, напрасно выражать посредством большего».

Возвращаясь к раздробленности науки, узкого специалиста можно уподобить астроному, изучающему небо со дна колодца. Не увидев целого, невозможно понять внутренней простоты и логичности Природы. Как же остановить развивающийся кризис? Мой ответ: *начать с объединяющей* теории.

В начале книги я показал, почему мембранная теория одно время была такой теорией (глава 4). К сожалению, с появлением новых данных не осталось сомнений, что мембранная теория уводит нас с верного пути. Тогда появились теории, в основе которых лежало представление о клетках как о плотных телах, состоящих из протоплазмы. Увы, физиологи протоплазматического направления не смогли тогда создать объединяющую теорию — ее время еще не наступило.

Не было ни развитых фундаментальных наук физико-химического направления (глава 7), ни технологий, таких как меченые атомы, которые сыграли решающую роль в проверке истинности конкурирующих теорий. К тому же ученые прошлого не могли воспользоваться благами государственной поддержки науки, которая в Соединенных Штатах появилась лишь к концу Второй мировой войны.

К тому времени, когда я пришел в науку, ситуация сильно изменилась к лучшему, что я уже не раз подчеркивал в этой книге, но станет ли теория ассоциации-индукции той единственной объединяющей теорией — покажет только будущее. Однако нельзя отрицать, что эта теория — первая в истории физико-химическая теория жизни на клеточном и субклеточном уровне, а эта книга — ясное свидетельство ее достоверности.

Система образования — ключ к будущему биологии

Начнем с того, чего преподаватель не желает. Ни один достойный своего звания учитель не желает сознательно выдавать ложную теорию за правду, или прививать своим ученикам красивые картинки вместо системного знания.

Однако великий учитель делает нечто большее. Кроме чистого знания, он утверждает учеников в глубоком понимании законов честной спортивной борьбы точно так же, как любящие отцы или тренеры обучают детей правилам и навыкам спортивной игры. Им удается вдохнуть в учеников непреходящую любовь к изучаемому предмету, подготовить их к служению науке, человечеству, которое не может не вдохновлять. Чтобы понять, как это удается некоторым учителям, вернемся снова к жизни Майкла Фарадея.

В четырнадцать лет Майкл работал учеником в небольшой переплетной мастерской. Он вполне мог продолжить эту карьеру и прожить жизнь безбедно. Но этого не случилось. Что же зажгло в маленьком переплетчике мечту о жизни, подобной жизни подвижников науки — Галилея и Ньютона? Насколько мне удалось выяснить, все началось с двух статей об *истории науки*.

Когда старательный ученик-переплетчик склеивал разорванные страницы одного из томов Британской энциклопедии, что-то привлекло его взгляд. Это была статья под названием «История электричества», автором которой был Джеймс Тайтлер. Тот, в свою очередь, большую часть материала позаимствовал из книги Джозефа Пристли «История и современное состояние учения об электричестве» [379]. Фарадей был так взволнован прочитанным, что начал ставить опыты прямо на каминной полке в мастерской своего хозяина. Роль лабораторного оборудования сыграли две стеклянные бутылки, которые продал ему старьевщик за шесть пенсов и один пенни. Вскоре он уже защищал свою теорию электричества перед друзьями в целях «совершенствования их разума». К сожалению, чем жарче становилась его любовь к науке, тем призрачнее — перспектива стать профессиональным ученым. Его обучение переплетному делу близилось к завершению, и он оказался на перепутье.

Неожиданно в его судьбе произошел счастливый перелом. За драку был уволен швейцар Королевского института, где работал тогда такой прославленный ученый, как сэр Гемфри Дэви, и на страже парадного подъезда встал молодой Майкл Фарадей. Вот с этого незначительного эпизода началось восхождение Фарадея как исследователя, ставшего одним из величайших ученых в истории.

Сначала он просто помогал Дэви и другим ученым, но вскоре стал работать самостоятельно. Несмотря на напыщенное название, Королевский институт не имел постоянных источников дохода. Как и остальным сотрудникам, Фарадею приходилось самому зарабатывать на опыты. Одним из его заработков было чтение публичных лекций. Ему пришлось немало потрудиться, чтобы овладеть лекторским искусством, что удалось ему до такой степени, что порой школьники сбегали даже с празднования рождества, чтобы послушать его лекции, одна из которых называлась так: «Химическая история свечи».

Вокруг Фарадея, в институтской среде, постоянно обсуждали *историю* того или иного вопроса. Может быть, в *истории* есть нечто особенное, что делает ее столь притягательной для юности? В этом, видимо, нет ничего удивительного, ведь английское слово history (история) одного корня со словом story (рассказ). Неспроста ребенку читают рассказы и истории. Они всегда так динамичны и последовательны. В них рассказывается о вещах, понятных юным слушателям, а конец всегда такой сладостно-счастливый.

А что можно рассказать про физиологию клетки? На протяжении своей истории она неуклонно деградировала (появились даже голоса, что близится закат науки вообще). Раздробленная, растасканная по углам узкими специалистами, упорствующими в своих заблуждениях, некогда неделимая физиология клетки уже не способна предложить ничего, кроме отрывков из обрывков целостного знания. Если такое положение дел не будет исправлено, ее конец и в самом деле близок, потому что питающих науку юных дарований нечем зажечь, нечем пробудить в них искреннего интереса к науке, разбитой на тысячи осколков. Но, может быть, еще есть надежда?

Теория ассоциации-индукции впервые сделала физиологию клетки по-настоящему последовательной. Я убежден, что подлинная история физиологии клетки является поистине интригующим рассказом, способным привлечь внимание юных фарадеев. Именно поэтому я решил, в конце концов, что нам нужна эта книга.

Хотя учителя и ученики — важная для меня аудитория, книга рассчитана не только на них. В равной мере она адресована всем заинтересованным ученым, в особенности связанным с биологией и медициной, которые хотят освежить свои фундаментальные знания. Она может заинтересовать молекулярных биологов, ищущих ускользающие связи генетики с клеточной и субклеточной физиологией. Физики, ищущие новые сферы применения своим талантам, смогут найти в ней отправные точки для своих исследований. Биотехнологам и фармакологам, пытающимся найти новые способы лечения заболеваний и новые лекарства, знакомство с книгой тоже может быть полезным. Кроме того, она может быть адресована и образовательным ведомствам, ищущим новые методические рекомендации по составлению программ школьного и высшего образования, к научным журналистам и редакторам, желающим дать глоток свежего воздуха своим читателям. Тем не менее, главную роль должны сыграть именно учителя и преподаватели вузов вместе с их подопечными. Только взращивание поколений людей с действительно широким кругозором сохранит нам надежду, что мы когда-нибудь вырвемся из порочного круга отживших идей.

«Предел науки — бесконечность», мысль, которая всегда будет маяком для истинного исследователя.

Прошло пятьдесят пять лет с тех пор, как советник президента по науке Ваннавер Буш направил президенту Франклину Делано Рузвельту доклад, озаглавленный «Предел науки — бесконечность» [400]. Те, кого убедила книга Хоргана «Конец науки» (см. предисловие), могут решить, что Буш все-таки ошибался, и наука действительно должна иметь свое завершение. Те же, кто прочел эту книгу, почувствует, возможно, в себе силы признать правоту Ваннавера Буша, выразившего глубокую мысль в столь блистательной форме.

Например, изобретение МРТ — это не только знаменательный этап в развитии физиологии клетки, оно доказывает, что физика жива как никогда. Более того, именно физика и есть сверхсовременная физиология клетки. И наоборот, физиология клетки придает физике совершенно новое дыхание, открывает перед ней новые горизонты. В конце концов, благодаря именно физиологическим процессам в триллионах нервных клеток физиков и была сотворена сама физика.

Каковы перспективы физиологических исследований? Приведу лишь два примера.

Во-первых, теория АИ поможет понять, что забытые ныне работы многих поколений ученых, пылящиеся на полках библиотек, на самом деле являются замечательными открытиями в биохимии, биофизике и молекулярной биологии. И пусть какие-то из них будут противоречить теории АИ — главное, что эти противоречия (действительные или мнимые) дадут новый импульс для дальнейшего развития физиологии клетки.

Во-вторых, я отвечу на вопрос, которым начиналось повествование: как найти путь к новым технологиям создания средств против рака, СПИДа и других смертельных заболеваний, угрожающих человечеству? Эти средства — лекарственные препараты, *спроектированные рационально*, в соответствии с требованиями теории, а не методом научного тыка.

Странно слышать на политических дебатах обещания предотвратить неминуемое банкротство программ бесплатного медицинско-

го страхования, несмотря на неуклонное старение населения США. Ясно, что спрос на лекарства будет неуклонно расти, а эмпирические методы создания новых препаратов остаются весьма дорогостоящими потому, что их поиск ведется практически вслепую. Огромные средства бросаются на ветер, в то время как в бедных странах больные СПИДом остаются умирать, как брошенные кошки или собаки.

Можно ли надеяться на улучшение ситуации, если мы будем и дальше упрямо следовать мембранной теории, которую физиологическая роль содержимого клетки на теоретическом уровне не интересует? Механизм действия лекарств, излагаемый в учебниках, остается неизменным на протяжении десятилетий: это все тот же ключ с замком. Действие лекарства начинается и заканчивается взаимодействием с рецептором, но к чему сводится это взаимодействие, кроме стерических соответствий, остается настолько туманным, что об этом предпочитают молчать. Такой уровень понимания действия лекарств ведет или уже привел фармакологию в тупик.

С другой стороны, одно только название конкурирующей теории — теория ассоциации и индукции — предлагает совершенно новый механизм действия лекарств. Он, по своей сути, *электронный* (главы 14 и 15). На основе обнаруженной зависимости между плотностью зарядов (плотностью электронов) на ключевых функциональных группах белков, благодаря которой происходит смена их избирательности с K^+ на Na^+ (свободные карбоксильные группы) или с фиксированных катионов на молекулы воды (группы пептидной связи), можно в несложных опытах определить, является ли какое-либо лекарство или иной кардинальный адсорбат *электроноакцепторным* (ЭАКА) или *электронодонорным кардинальным адсорбатом* (ЭДКА). Одно это — уже огромный шаг вперед, подобного которому прежде не было.

Такой подход уже начал приносить плоды в виде новых данных об особенностях ряда клеток, как нормальных, так и злокачественно измененных. Среди кардинальных адсорбатов, к которым относятся все без исключения лекарства, самым важным является АТФ. Согласно полученным нами данным о ее влиянии на клетки, АТФ является ЭАКА. Уабаин, напротив, является ЭДКА.

Чтобы понять, почему же АТФ играет в клетке роль ЭАКА, а уабаин — ЭДКА, потребуются самые напряженные усилия будущих поколений биологов, химиков и физиков, в особенности тех, кому будут по силам все эти дисциплины вместе. Я полон надежд, что эта книга будет способствовать появлению таких ученых. Но это все дело будущего. А пока вернемся на наш, еще весьма примитивный, уровень знаний.

Я не раз повторял и повторю еще раз: ответственнейшим этапом проверки любой теории в физиологии клетки является проверка теоретических положений на *неживых, искусственных моделях*. Такая модель должна обладать основными физико-химическими характеристиками настоящих клеток, и потому эти характеристики легко будет изучить и убедиться, верна теория или нет. К 1992 году почти все положения теории АИ получили подтверждение на искусственных моделях, за одним заметным исключением.

До сих пор не удавалось найти модель, на которой было бы видно, как лекарства и прочие кардинальные адсорбаты в ничтожных концентрациях способны вызывать перераспределение электронной плотности в макромолекуле с соответствующим изменением селективности ее ключевых функциональных групп.

Но теперь я, вместе с моими сотрудниками доктором Чжэнь-дун Чэнь и Маргарет Оксенфельд, с гордостью могу объявить, что несколько таких неживых моделей найдено, и предсказанные теорией АИ изменения в них ориентировочно подтверждены. Должен добавить, что зарегистрированные изменения хоть и весьма невелики, но статистически достоверны. В конце концов, это всего лишь модели, а не настоящие клетки.

В заключение дам, если позволите, напутствие молодому поколению физиологов, опирающееся на опыт непопулярных, так сказать, ученых: никогда не изменяйте своему призванию, повсюду следуйте за своим увлечением, будьте упорны в достижении целей, в которые вы верите, будьте в согласии с самим собой. Сейчас у вас гораздо больше возможностей для этого, чем у Майкла Фарадея, который был невыразимо счастлив даже тогда, когда стал мальчиком на побегушках в Королевском институте, казавшемся ему, без сомнения, волшебным миром физики.

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. Уравнение Трошина [92]

$$C_c = C_s K\left(1+\frac{A}{C_s K + a}\right), \qquad \text{(A1)}$$

где C_c и C_s — концентрации исследуемого вещества соответственно в клеточной воде (или воде модели) и в окружающей среде. K — «коэффициент пропорциональности», характеризующий различие между внутриклеточной водой (водой модели) и водой среды. A — предел адсорбции, как его назвал Трошин; a — константа, характеризующая кривизну подъема изотермы адсорбции.

2. Изотерма адсорбции Бредли [278]

Бредли вывел изотерму многослойной адсорбции поляризованных молекул газа, обладающих постоянным дипольным моментом:

$$\ln\left(\frac{p_0}{p}\right) = K_2 K_1^{\,a} + K_4, \qquad \text{(A2)}$$

где p_0/p — величина, обратная относительному давлению пара; a — количество поглощенного газа. При заданных условиях K_1, K_2 и K_4 — константы.

3. Уравнение Линга для равновесного распределения веществ между клеточной водой и водой среды [168]

$$q = \exp\left\{\frac{1{,}23\, v\Delta E_s\left[1-(1-b)\dfrac{(kv)^n}{1+(kv)^n}\right]-(\Delta E_v + 1{,}23\,\Delta e^*)v}{RT}\right\}, \qquad \text{(A3)}$$

где q — коэффициент равновесного распределения исследуемого вещества между водой клетки (или модели) и водой среды, эквивалентный величине K в уравнении Трошина (A1); v — молекулярный объем (молярный объем) вещества, исчисляемый в мл; b — величина много меньше 1, характеризующая вероятность встраивания молекул (очень крупных) в пространственную решетку связанной воды; k и n — показатели, характеризующие крутизну снижения вероятности встраивания молекулы растворенного вещества в пространственную решетку связанной воды по мере роста ее молекулярного объема; ΔE_s — *изменение удельной поверхностной энергии поляризации (или энергии поляризации вещества)* при перемещении вещества из обычной воды в поляризованную клеточную на каждый см^2, исчисляемое в кал/моль • см^2; ΔE_v — *удельная энергия поляризации растворителя*, соответствующая разности между энергией, затрачиваемой на «образование» полости объемом 1 мл в поляризованной клеточной воде, и энергией, выделяющейся при заполнении этой полости обычной водой; исчисляется в кал/моль • мл; Δe^* — *прирост энергии активации*, обусловленный затруднением вращательного движения, возникающего при переносе вещества из о воды в поляризованную, на единицу поверхности, исчисляется в кал/моль • см^2; R — постоянная; T — абсолютная температура.

4. Изотерма адсорбции Янга—Линга [185]

Начнем с одинаковых по свойствам центров адсорбции, равномерно располо в одну линию. Каждый центр может адсорбировать две разновидности частиц: p_i и торые находятся в свободном состоянии в растворе бесконечного объема, находящ диффузионном равновесии с линейной цепью (p_i либо p_j может также означать сво центр). Учитывается лишь взаимодействие соседних центров. Тогда для цепи N-ц среднее число адсорбированных каждой цепью частиц p_i равно

$$[p_i]_{ad} = \frac{[f]}{2}\left[1+\frac{\xi-1}{\sqrt{(\xi-1)^2+4\xi\exp(\gamma/RT)}}\right].$$

В этом уравнении

$$\xi = \frac{[p_i]_{ex}}{[p_j]_{ex}}\cdot K^{oo}_{j\to i},$$

где $[p_i]_{ex}$ и $[p_j]_{ex}$ — концентрации соответственно веществ i и j в окружающем ра $K^{oo}_{j\to i}$ — внутренняя константа равновесия адсорбционного обмена j на i, при котор щее число пар i-j остается неизменным; $-\gamma/2$ — энергия взаимодействия соседних це определяемая как изменение энергии системы при образовании каждой новой пары двух соседних центрах связывания; $[f]$ — концентрация центров адсорбции.

Если $-\gamma/2$ больше нуля, адсорбция одной частицы i способствует адсорбции друг тиц i. Этот тип кооперативного взаимодействия обычно называют *ферромагнитным* $-\gamma/2$ меньше нуля, адсорбция частицы i способствует адсорбции альтернативных ча Этот тип кооперативного взаимодействия обычно называют *антиферромагнитным*. С физиология клетки редко имеет дело с магнетизмом, так что во избежание путан предложил вместо ферромагнитного и антиферромагнитного взаимодействия говор ответственно об *автокооперативном* и *гетерокооперативном* взаимодействии [24 295; 107, p. 138].

Уравнение A4 было выведено на основе одномерной модели Изинга [353]. Суще «теорема», будто бы «не может быть фазовых переходов в одном измерении» [354]. теорема не всегда выполняется (см. работы [355; 356]).

5. Общее уравнение Линга для распределения веществ между клеткой и средой частные случаи [136]

$$[p_i]_{in} = \alpha q_i [p_i]_{ex} + \sum_{L=1}^{N}\frac{[f]_L}{2}\left(1+\frac{\xi_L-1}{\sqrt{(\xi_L-1)^2+4\xi_L\exp(\gamma_L/RT)}}\right),$$

где $[p_i]_{in}$ соответствует внутриклеточной концентрации вещества i в мкмоль/г го веса клеток; $[p_i]_{ex}$ — концентрация вещества i в окружающей среде в мм $[f]_L$ — доля фиксированных анионов типа L — обычно β- и γ-карбоксильных гру в общем количестве отрицательно (N) заряженных центров, исчисляется в мкм сырого веса клеток; α — число меньше 1, соответствующее массовому содерж воды в клетках; q_i — *средний коэффициент равновесного распределения вещес* между водой клетки и средой (см. уравнение A3 выше); ξ_L — параметр, определя уравнением A5, однако относится лишь к центрам адсорбции L-типа среди об количества (N) типов центров адсорбции.

Уравнение A6 может быть преобразовано для частного случая, когда все це адсорбции относятся к одному типу, то есть, когда ξ_L равно ξ

РИЛОЖЕНИЕ

1. Уравнение Трошина [92]

$$C_c = C_s K\left(1+\frac{A}{C_s K + a}\right), \qquad \text{(A1)}$$

е C_c и C_s — концентрации исследуемого вещества соответственно в клеточной воде (или де модели) и в окружающей среде. K — «коэффициент пропорциональности», характери-ющий различие между внутриклеточной водой (водой модели) и водой среды. A — предел сорбции, как его назвал Трошин; a — константа, характеризующая кривизну подъема этермы адсорбции.

2. Изотерма адсорбции Бредли [278]

Бредли вывел изотерму многослойной адсорбции поляризованных молекул газа, ладающих постоянным дипольным моментом:

$$\ln\left(\frac{p_0}{p}\right) = K_2 K_1{}^a + K_4, \qquad \text{(A2)}$$

е p_0/p — величина, обратная относительному давлению пара; a — количество поглощен-го газа. При заданных условиях K_1, K_2 и K_4 — константы.

3. Уравнение Линга для равновесного распределения веществ между клеточной водой зодой среды [168]

$$q = \exp\left\{\frac{1{,}23\, v\Delta E_s\left[1-(1-b)\dfrac{(kv)^n}{1+(kv)^n}\right]-(\Delta E_v + 1{,}23\,\Delta e^*)v}{RT}\right\}, \qquad \text{(A3)}$$

е q — коэффициент равновесного распределения исследуемого вещества между водой етки (или модели) и водой среды, эквивалентный величине K в уравнении Трошина (A1); — молекулярный объем (молярный объем) вещества, исчисляемый в мл; b — величина ого меньше 1, характеризующая вероятность встраивания молекул (очень крупных) в про-ранственную решетку связанной воды; k и n — показатели, характеризующие крутизну ижения вероятности встраивания молекулы растворенного вещества в пространственную шетку связанной воды по мере роста ее молекулярного объема; ΔE_s — *изменение удельной верхностной энергии поляризации (или энергии поляризации вещества)* при перемеще-и вещества из обычной воды в поляризованную клеточную на каждый см^2, исчисляемое кал/моль • см^2; ΔE_v — *удельная энергия поляризации растворителя*, соответствующая зности между энергией, затрачиваемой на «образование» полости объемом 1 мл в поляри-занной клеточной воде, и энергией, выделяющейся при заполнении этой полости обычной дой; исчисляется в кал/моль • мл; Δe^* — *прирост энергии активации*, обусловленный затруднением вращательного движения, возникающего при переносе вещества из обычной воды в поляризованную, на единицу поверхности, исчисляется в кал/моль • см^2; R — газовая постоянная; T — абсолютная температура.

4. Изотерма адсорбции Янга—Линга [185]

Начнем с одинаковых по свойствам центров адсорбции, равномерно расположенных в одну линию. Каждый центр может адсорбировать две разновидности частиц: p_i и p_j, которые находятся в свободном состоянии в растворе бесконечного объема, находящегося в диффузионном равновесии с линейной цепью (p_i либо p_j может также означать свободный центр). Учитывается лишь взаимодействие соседних центров. Тогда для цепи N-центров среднее число адсорбированных каждой цепью частиц p_i равно

$$[p_i]_{ad} = \frac{[f]}{2}\left[1+\frac{\xi-1}{\sqrt{(\xi-1)^2+4\xi\exp(\gamma/RT)}}\right]. \qquad \text{(A4)}$$

В этом уравнении

$$\xi = \frac{[p_i]_{ex}}{[p_j]_{ex}}\cdot K^{oo}_{j\to i}, \qquad \text{(A5)}$$

где $[p_i]_{ex}$ и $[p_j]_{ex}$ — концентрации соответственно веществ i и j в окружающем растворе; $K^{oo}_{j\to i}$ — внутренняя константа равновесия адсорбционного обмена j на i, при котором об-щее число пар i-j остается неизменным; $-\gamma/2$ — энергия взаимодействия соседних центров, определяемая как изменение энергии системы при образовании каждой новой пары i-j на двух соседних центрах связывания; $[f]$ — концентрация центров адсорбции.

Если $-\gamma/2$ больше нуля, адсорбция одной частицы i способствует адсорбции других частиц i. Этот тип кооперативного взаимодействия обычно называют *ферромагнитным*. Если $-\gamma/2$ меньше нуля, адсорбция частицы i способствует адсорбции альтернативных частиц j. Этот тип кооперативного взаимодействия обычно называют *антиферромагнитным*. Однако физиология клетки редко имеет дело с магнетизмом, так что во избежание путаницы я предложил вместо ферромагнитного и антиферромагнитного взаимодействия говорить соответственно об *автокооперативном* и *гетерокооперативном* взаимодействии [244; 313; 295; 107, p. 138].

Уравнение A4 было выведено на основе одномерной модели Изинга [353]. Существует «теорема», будто бы «не может быть фазовых переходов в одном измерении» [354]. Но эта теорема не всегда выполняется (см. работы [355; 356]).

5. Общее уравнение Линга для распределения веществ между клеткой и средой и его частные случаи [136]

$$[p_i]_{in} = \alpha q_i [p_i]_{ex} + \sum_{L=1}^{N}\frac{[f]_L}{2}\left(1+\frac{\xi_L-1}{\sqrt{(\xi_L-1)^2+4\xi_L\exp(\gamma_L/RT)}}\right), \qquad \text{(A6)}$$

где $[p_i]_{in}$ соответствует внутриклеточной концентрации вещества i в мкмоль/г сыро-го веса клеток; $[p_i]_{ex}$ — концентрация вещества i в окружающей среде в ммоль/л; $[f]_L$ — доля фиксированных анионов типа L — обычно β- и γ-карбоксильных групп — в общем количестве отрицательно (N) заряженных центров, исчисляется в мкмоль/г сырого веса клеток; α — число меньше 1, соответствующее массовому содержанию воды в клетках; q_i — *средний коэффициент равновесного распределения вещества i* между водой клетки и средой (см. уравнение A3 выше); ξ_L — параметр, определяемый уравнением A5, однако относится лишь к центрам адсорбции L-типа среди общего количества (N) типов центров адсорбции.

Уравнение A6 может быть преобразовано для частного случая, когда все центры адсорбции относятся к одному типу, то есть, когда ξ_L равно ξ

$$[p_i]_{in} = \alpha q_i [p_i]_{ex} + \frac{[f]}{2}\left(1 + \frac{\xi - 1}{\sqrt{(\xi-1)^2 + 4\xi \exp(\gamma / RT)}}\right). \quad \text{(A7)}$$

Как было отмечено в 1992 году [107, pp. 161–162], почти все полученные к тому времени экспериментальные данные могли быть описаны уравнением A7 и другими частными случаями уравнения A6, в том числе

$$[p_i]_{in} = \alpha q_i [p_i]_{ex} + \sum_{L=1}^{N} \frac{[f]_L [p_i]_{ex} K_i^L}{1 + \sum_{i=1}^{n} [p_i]_{ex} K_i^L}, \quad \text{(A8)}$$

где присутствует количество n конкурирующих веществ, а K_i — константа адсорбции вещества i центрами адсорбции типа L из общего числа N типов центров, исчисляемая в моль$^{-1}$. Если имеются лишь два вида веществ, i и j, уравнение A8 еще более упрощается до

$$[p_i]_{in} = \alpha q_i [p_i]_{ex} + \frac{[f][p_i]_{ex} K_i}{1 + K_i [p_i]_{ex} + K_j [p_j]_{ex}}. \quad \text{(A9)}$$

Если же имеется лишь вещество i, уравнение A9 сводится к

$$[p_i]_{in} = \alpha q_i [p_i]_{ex} + \frac{[f][p_i]_{ex} K_i}{1 + K_i [p_i]_{ex}}, \quad \text{(A10)}$$

и становится идентичным уравнению Трошина, которое приведено выше как уравнение A1 с обозначениями, принятыми Трошиным.

Уравнение A9 может быть написано в обратной форме для случаев, когда $[f] K_i >> \alpha q_i$:

$$\frac{1}{[p_i]_{in}} = \frac{K_i}{[f]}\left(1 + \frac{[p_j]_{ex}}{K_j}\right)\frac{1}{[p_i]_{ex}} + \frac{1}{[f]}. \quad \text{(A11)}$$

Если построить графики зависимости определенных экспериментально значений $1/[p_i]_{in}$ от $1/[p_i]_{ex}$ в присутствии различных концентраций конкурирующего вещества j, получается серия прямых, сходящихся в одной точке на оси ординат. Значения констант адсорбции K_i and K_j, как и количество (содержание) центров адсорбции $[f]$, можно определить по наклону этих прямых и точкам их пересечения с осями координат.

6. Уравнение клеточной проницаемости Линга [107, Equation 26]

В теории ассоциации-индукции поверхность протоплазмы (поверхность клетки) ничем принципиально не отличается от остальной цитоплазмы. Поэтому уравнение проницаемости, ограниченной поверхностью, может быть выведено из уравнения распределения веществ A6. Исходная проницаемость (v_i) для вещества i клеток, содержащих N типов центров адсорбции, в моль/см^2/с может быть определена при помощи следующего уравнения:

$$v_i = A_i [p_i]_{ex} + \sum_{L=1}^{N} \frac{v_i^{\max(L)}}{2}\left[1 + \frac{\xi_L - 1}{\sqrt{(\xi_L - 1)^2 + 4\xi_L \exp(\gamma_L / RT)}}\right], \quad \text{(A12)}$$

где $A_i[p_i]$ характеризует интенсивность поступления вещества i, неопосредованного связыванием; A_i — константа, исчисляемая в см/с; $v_i^{\max(L)}$ — максимальная скорость проникновения вещества i адсорбционно-десорбционным путем с участием центров связывания L-типа; ξ_L и γ_L означают то же, что в уравнениях A4 и A5, однако относятся лишь к центрам типа L на поверхности клетки. Частный случай этого уравнения для клеточной поверх с одним типом центров адсорбции:

$$v_i = A_i [p_i]_{ex} + \frac{v_i^{\max}}{2}\left[1 + \frac{\xi - 1}{\sqrt{(\xi-1)^2 + 4\xi \exp(\gamma / RT)}}\right].$$

Частные случаи уравнений A8, A9 и A10 представлены соответственно уравнениями A15 и A16:

$$v_i = A_i [p_i]_{ex} + \sum_{L=1}^{N} \frac{v_{\max} K_i^L [p_i]_{ex}}{1 + \sum_{i=1}^{n} K_i^L [p_i]_{ex}},$$

$$v_i = A_i [p_i]_{ex} + \frac{v_{\max} K_i [p_i]_{ex}}{1 + K_i [p_i]_{ex} + K_j [p_j]_{ex}},$$

и

$$v_i = A_i [p_i]_{ex} + \frac{v_{\max} K_i [p_i]_{ex}}{1 + K_i [p_i]_{ex}}.$$

Необходимо подчеркнуть, что во всех этих уравнениях подразумевается дублет механизм адсорбционно-десорбционной диффузии. Более сложное уравнение для плетных механизмов Линг и Оксенфельд представили 1965 году [222].

7. Уравнение клеточного объема Линга [195]

Следующее уравнение описывает равновесное содержание воды в клетках при личной концентрации веществ в среде, имеющих различный коэффициент распред ния между клеточной водой и средой (величину q):

$$a = \frac{1}{\log K_3} \cdot [\log[\log\left(1 + \frac{(1-q)n_2}{n_1}\right) - K_4] - \log K_1],$$

где a — количество воды (в г), связываемой 100 г сухого белка (исходный сухой n_2 — моляльная концентрация вещества, а n_1 равна 55,51 — количеству молей в в котором растворено n_2 молей вещества. K_1, K_3 и K_4 — константы, если физиче условия неизменны.

Объем клеток ($V_{кл}$, в мл), весом 1 г, определяется следующим уравнением:

$$V_{кл} = W_{белков}(\%)\left\{\frac{a}{100} + V + \frac{aqM[C]_{ex}}{100d}\right\},$$

где $W_{белков}$ (%) — массовое содержание белков в клетках на 1 г сырого веса до начала менения объема, численно равно исходному сухому весу клеток; V — средний парциаль молярный объем белков, составляет приблизительно 0,73; q — коэффициент равновес распределения исследуемого вещества S между водой клетки и средой; M — его молеку ная масса; $[C]_{ex}$ — молярная концентрация вещества S в омывающем растворе; d — п ность раствора вещества S. Три слагаемых в фигурных скобках представляют собой с ветственно объем клеточной воды, объем клеточных белков и молекулярный объем веще S в исследуемом растворе (a — то же, что и в уравнении A17).

$$[p_i]_{in} = \alpha q_i [p_i]_{ex} + \frac{[f]}{2}\left(1 + \frac{\xi - 1}{\sqrt{(\xi-1)^2 + 4\xi \exp(\gamma / RT)}}\right). \quad \text{(A7)}$$

ık было отмечено в 1992 году [107, pp. 161–162], почти все полученные к тому времени ·риментальные данные могли быть описаны уравнением A7 и другими частными слу- и уравнения A6, в том числе

$$[p_i]_{in} = \alpha q_i [p_i]_{ex} + \sum_{L=1}^{N} \frac{[f]_L [p_i]_{ex} K_i^L}{1 + \sum_{i=1}^{n} [p_i]_{ex} K_i^L}, \quad \text{(A8)}$$

рисутствует количество n конкурирующих веществ, а K_i — константа адсорбции ства i центрами адсорбции типа L из общего числа N типов центров, исчисля- в моль$^{-1}$. Если имеются лишь два вида веществ, i и j, уравнение A8 еще более цается до

$$[p_i]_{in} = \alpha q_i [p_i]_{ex} + \frac{[f][p_i]_{ex} K_i}{1 + K_i [p_i]_{ex} + K_j [p_j]_{ex}}. \quad \text{(A9)}$$

ли же имеется лишь вещество i, уравнение A9 сводится к

$$[p_i]_{in} = \alpha q_i [p_i]_{ex} + \frac{[f][p_i]_{ex} K_i}{1 + K_i [p_i]_{ex}}, \quad \text{(A10)}$$

ювится идентичным уравнению Трошина, которое приведено выше как уравнение A1 значениями, принятыми Трошиным.

авнение A9 может быть написано в обратной форме для случаев, когда $[f]K_i >> \alpha q_i$:

$$\frac{1}{[p_i]_{in}} = \frac{K_i}{[f]}\left(1 + \frac{[p_j]_{ex}}{K_j}\right)\frac{1}{[p_i]_{ex}} + \frac{1}{[f]}. \quad \text{(A11)}$$

ıи построить графики зависимости определенных экспериментально значений $1/[p_i]_{in}$ $_i]_{ex}$ в присутствии различных концентраций конкурирующего вещества j, получается прямых, сходящихся в одной точке на оси ординат. Значения констант адсорбции K_j, как и количество (содержание) центров адсорбции $[f]$, можно определить по ну этих прямых и точкам их пересечения с осями координат.

′равнение клеточной проницаемости Линга [107, Equation 26]

еории ассоциации-индукции поверхность протоплазмы (поверхность клетки) ничем принально не отличается от остальной цитоплазмы. Поэтому уравнение проницаемости, ıченной поверхностью, может быть выведено из уравнения распределения веществ A6. ная проницаемость (v_i) для вещества i клеток, содержащих N типов центров адсорбмоль/см^2/с может быть определена при помощи следующего уравнения:

$$v_i = A_i [p_i]_{ex} + \sum_{L=1}^{N} \frac{v_i^{\max(L)}}{2}\left[1 + \frac{\xi_L - 1}{\sqrt{(\xi_L - 1)^2 + 4\xi_L \exp(\gamma_L / RT)}}\right], \quad \text{(A12)}$$

$p_i]$ характеризует интенсивность поступления вещества i, неопосредованного свя- ıем; A_i — константа, исчисляемая в см/с; $v_i^{\max(L)}$ — максимальная скорость проник- я вещества i адсорбционно-десорбционным путем с участием центров связывания ; ξ_L и γ_L означают то же, что в уравнениях A4 и A5, однако относятся лишь к центрам типа L на поверхности клетки. Частный случай этого уравнения для клеточной поверхности с одним типом центров адсорбции:

$$v_i = A_i [p_i]_{ex} + \frac{v_i^{\max}}{2}\left[1 + \frac{\xi - 1}{\sqrt{(\xi-1)^2 + 4\xi \exp(\gamma / RT)}}\right]. \quad \text{(A13)}$$

Частные случаи уравнений A8, A9 и A10 представлены соответственно уравнениями A14, A15 и A16:

$$v_i = A_i [p_i]_{ex} + \sum_{L=1}^{N} \frac{v_{\max} K_i^L [p_i]_{ex}}{1 + \sum_{i=1}^{n} K_i^L [p_i]_{ex}}, \quad \text{(A14)}$$

$$v_i = A_i [p_i]_{ex} + \frac{v_{\max} K_i [p_i]_{ex}}{1 + K_i [p_i]_{ex} + K_j [p_j]_{ex}}, \quad \text{(A15)}$$

и

$$v_i = A_i [p_i]_{ex} + \frac{v_{\max} K_i [p_i]_{ex}}{1 + K_i [p_i]_{ex}}. \quad \text{(A16)}$$

Необходимо подчеркнуть, что во всех этих уравнениях подразумевается дублетный механизм адсорбционно-десорбционной диффузии. Более сложное уравнение для триплетных механизмов Линг и Оксенфельд представили 1965 году [222].

7. Уравнение клеточного объема Линга [195]

Следующее уравнение описывает равновесное содержание воды в клетках при различной концентрации веществ в среде, имеющих различный коэффициент распределения между клеточной водой и средой (величину q):

$$a = \frac{1}{\log K_3} \cdot [\log[\log\left(1 + \frac{(1-q)n_2}{n_1}\right) - K_4] - \log K_1], \quad \text{(A17)}$$

где a — количество воды (в г), связываемой 100 г сухого белка (исходный сухой вес); n_2 — моляльная концентрация вещества, а n_1 равна 55,51 — количеству молей воды, в котором растворено n_2 молей вещества. K_1, K_3 и K_4 — константы, если физические условия неизменны.

Объем клеток ($V_{кл}$, в мл), весом 1 г, определяется следующим уравнением:

$$V_{кл} = W_{белков}(\%)\left\{\frac{a}{100} + V + \frac{aqM[C]_{ex}}{100d}\right\}, \quad \text{(A18)}$$

где $W_{белков}$ (%) — массовое содержание белков в клетках на 1 г сырого веса до начала изменения объема, численно равно исходному сухому весу клеток; V — средний парциальный молярный объем белков, составляет приблизительно 0,73; q — коэффициент равновесного распределения исследуемого вещества S между водой клетки и средой; M — его молекулярная масса; $[C]_{ex}$ — молярная концентрация вещества S в омывающем растворе; d — плотность раствора вещества S. Три слагаемых в фигурных скобках представляют собой соответственно объем клеточной воды, объем клеточных белков и молекулярный объем вещества S в исследуемом растворе (a — то же, что и в уравнении A17).

8. Уравнение потенциала покоя Линга [248]

В 1979 году Линг предложил общее уравнение потенциала покоя, в котором учтено кооперативное взаимодействие соседних центров адсорбции:

$$\Psi = \text{constant} + \frac{RT}{F}\ln\frac{1}{[K^+]_{ex}}\left(1+\frac{\xi-1}{\sqrt{(\xi-1)^2+4\xi\exp(\gamma/RT)}}\right), \quad \text{(A19)}$$

где

$$\xi = \frac{[K^+]_{ex}}{Na^+_{ex}}\cdot K^{oo}_{Na\to K}. \quad \text{(A20)}$$

ξ, $K^{oo}_{Na\to K}$ и $-\gamma/2$ обозначают то же, что и в уравнении A5, однако относятся лишь к поверхностным β- и γ-карбоксильным группам; к тому же адсорбаты здесь не *i* и *j*, а конкретные катионы Na^+ и K^+. Уравнение A19 можно также изобразить в следующем виде:

$$\psi = \frac{RT}{F}\ln[f^-]+\frac{RT}{F}\ln\frac{1}{[K^+]_{ex}}\left[1+\frac{\xi-1}{\sqrt{(\xi-1)^2+4\xi\exp(\gamma/RT)}}\right], \quad \text{(A21)}$$

В случае, если энергия взаимодействия соседних центров ($-\gamma/2$) равна нулю, уравнение A21 сводится к

$$\psi = \frac{RT}{F}\ln[f^-]-\frac{RT}{F}\ln\{K_K[K^+]_{ex}+K_{Na}[Na^+]_{ex}\}, \quad \text{(A22)}$$

где K_K и K_{Na} — константы адсорбции K^+ и Na^+ фиксированными анионами поверхности. Уравнение A22 — частный случай следующего, более общего уравнения для потенциала покоя для случая, когда центры адсорбции не взаимодействуют друг с другом:

$$\psi = \frac{RT}{F}\ln[f^-]-\frac{RT}{F}\ln\left\{1+K_K[K^+]_{ex}+\sum_{i=1}^{n}K_i[p_i]_{ex}\right\}, \quad \text{(A23)}$$

где $[p_i]_{ex}$ — соответствует концентрации катиона *i*, одного из n конкурирующих катионов в среде, а K_i — константа адсорбции *i*-того катиона поверхностными анионными центрами. В уравнении A22 учитывается вклад только одного конкурирующего с K^+ катиона — Na^+ (когда вкладом других конкурентов можно пренебречь). Уравнение A23 позволяет учитывать вклады Na^+ и других конкурирующих катионов, например, H^+, Ca^{2+}.

9. Уравнение потенциала действия Линга [15, p. 494]

$$\Psi = \text{constant} + \frac{RT}{F}\ln\frac{1}{2[K^+]_{ex}K_K}\left[1+\frac{\xi-1}{\sqrt{(\xi-1)^2+4\xi\exp(\gamma/RT)}}\right]-\frac{RT}{F}\ln\left[\frac{[Na^+]^{free}_{in}}{q_{Na}}+\frac{[K^+]^{free}_{in}}{q_K}\right], \quad \text{(A24)}$$

где Ψ — величина потенциала действия, $[Na^+_{in}]^{free}$ и $[K^+_{in}]^{free}$ — концентрация свободного Na^+ и K^+ в воде микроскопически тонкого поверхностного слоя клетки, а q_{Na} и q_K — их коэффициенты равновесного распределения между водой клетки и средой. Прочие обозначения те же, что в уравнениях A19—A22.

ПРИЛОЖЕНИЯ

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ ТЕОРИИ АССОЦИАЦИИ-ИНДУКЦИИ И СМЕЖНЫХ ПОНЯТИЙ

(словарь составлен на основе определений, данных автором, или определений, заимствованных из других источников)

$(NO\text{-}NO\text{-}NO)^n$ система: формула для обозначения трехмерной системы фиксированных зарядов (геля, коацервата, дисперсионной фазы), образованной на основе линейного полимера одного типа, представляющего собой цепь с закономерно чередующимися отрицательно заряженными группами (N) и незаряженными, нейтральными, группами (O), расположенными друг от друга на расстоянии, оптимальном для связывания адсорбата определенного заряда и геометрической конфигурации, то есть комплементарной адсорбату; *n* обозначает среднее количество цепей полимера, объединенных общей водной оболочкой, идущих параллельно друг другу и сгруппированных вокруг общей оси симметрии. Пример линейного полимера этого типа: поливинилметиловый эфир.

$(NP\text{-}NP\text{-}NP)^n$ система: формула для обозначения трехмерной системы фиксированных зарядов (геля, коацервата, дисперсионной фазы), образованной на основе линейного полимера одного типа, представляющего собой цепь с закономерно чередующимися отрицательно заряженными группами (N) и положительно заряженными группами (P), расположенными друг от друга на расстоянии, оптимальном для связывания адсорбата определенного заряда и геометрической конфигурации, то есть комплементарной адсорбату; *n* обозначает среднее количество цепей полимера, объединенных общей водной оболочкой, идущих параллельно друг другу и сгруппированных вокруг общей оси симметрии.

CO-группа: в этой книге обычно обозначает карбонильную группу (C=O), входящую в состав пептидной связи: (-**CO**CHRNH-)$_n$.

D-эффект: см. F-эффект.

f^-, f^+: фиксированный анион и фиксированный катион соответственно.

F-эффект: комбинация из D-эффекта и I-эффекта. Первый — электростатический эффект взаимодействия зарядов в пространстве, а второй — электростатический эффект, передаваемый через электроны в молекул опосредованный промежуточными ато ми. Также иногда называемый *прям* F-эффектом.

I-эффект: см. F-эффект.

$K^{00}_{i\to j}$: см. Внутренняя константа равновес также называемую константой сопряж ного адсорбционного обмена адсорбат *на j.*

$K^{00}_{Na\to K}$: константа сопряженного адсорбцион го обмена Na^+ на K^+, см. Внутренняя к стант равновесия.

NP-NP система: линейная система (наприм макромолекула) с закономерно чередую щимися отрицательными (N) и полож тельными (P) зарядами.

NP-NP-NP система: двухмерный полимерн матрикс (плоскость), состоящий из пара лельно расположенных линейных макром лекул, каждая из которых несет чередую щуюся последовательность положительн (P) и отрицательных (N) фиксированн зарядов. На плоскости заряды чередуют в шахматном порядке. В пакете из плоск стей заряд P одной плоскости соседству с зарядом N другой плоскости (плоскост комплементарны друг другу). Расстояни между зарядами определяет характер вза имодействия макромолекулы с другим соединениями, как низко-, так и высок молекулярными, то есть преимуществом сорбционном процессе обладает адсорбат комплементарный адсорбенту.

N-центр: отрицательно заряженный центр ил отрицательный полюс диполя в состав макромолекулы.

O-центр: нейтральная (незаряженная) группа в составе макромолекулы.

α-аминогруппа: аминогруппа, связанная с α-атомом углерода, то есть с атомом угле рода, следующим за карбоксильной груп пой. Например, в α-положении находится аминогруппа в молекуле аминокислоты глицина (NH_2CH_2COOH).

Уравнение потенциала покоя Линга [248]

1979 году Линг предложил общее уравнение потенциала покоя, в котором учтено ко-
тивное взаимодействие соседних центров адсорбции:

$$\Psi = \text{constant} + \frac{RT}{F}\ln\frac{1}{[K^+]_{ex}}\left(1+\frac{\xi-1}{\sqrt{(\xi-1)^2+4\xi\exp(\gamma/RT)}}\right), \quad \text{(A19)}$$

$$\xi = \frac{[K^+]_{ex}}{Na^+{}_{ex}}\cdot K^{oo}_{Na\to K}. \quad \text{(A20)}$$

$_{\to K}$ и $-\gamma/2$ обозначают то же, что и в уравнении А5, однако относятся лишь к поверх-
им β- и γ-карбоксильным группам; к тому же адсорбаты здесь не *i* и *j*, а конкретные
ы Na^+ и K^+. Уравнение А19 можно также изобразить в следующем виде:

$$\psi = \frac{RT}{F}\ln[f^-]+\frac{RT}{F}\ln\frac{1}{[K^+]_{ex}}\left[1+\frac{\xi-1}{\sqrt{(\xi-1)^2+4\xi\exp(\gamma/RT)}}\right], \quad \text{(A21)}$$

лучае, если энергия взаимодействия соседних центров $(-\gamma/2)$ равна нулю, уравнение
одится к

$$\psi = \frac{RT}{F}\ln[f^-]-\frac{RT}{F}\ln\{K_K[K^+]_{ex}+K_{Na}[Na^+]_{ex}\}, \quad \text{(A22)}$$

и K_{Na} — константы адсорбции K^+ и Na^+ фиксированными анионами поверхности.
ение А22 — частный случай следующего, более общего уравнения для потенциала
для случая, когда центры адсорбции не взаимодействуют друг с другом:

$$\psi = \frac{RT}{F}\ln[f^-]-\frac{RT}{F}\ln\left\{1+K_K[K^+]_{ex}+\sum_{i=1}^{n}K_i[p_i]_{ex}\right\}, \quad \text{(A23)}$$

$_{ex}$ — соответствует концентрации катиона *i*, одного из n конкурирующих катионов
, а K_i — константа адсорбции *i*-того катиона поверхностными анионными центрами.
нении А22 учитывается вклад только одного конкурирующего с K^+ катиона — Na^+
вкладом других конкурентов можно пренебречь). Уравнение А23 позволяет учиты-
клады Na^+ и других конкурирующих катионов, например, H^+, Ca^{2+}.

Уравнение потенциала действия Линга [15, p. 494]

$$\text{constant}+\frac{RT}{F}\ln\frac{1}{2[K^+]_{ex}K_K}\left[1+\frac{\xi-1}{\sqrt{(\xi-1)^2+4\xi\exp(\gamma/RT)}}\right]-\frac{RT}{F}\ln\left[\frac{[Na^+]_{in}^{free}}{q_{Na}}+\frac{[K^+]_{in}^{free}}{q_K}\right], \quad \text{(A24)}$$

— величина потенциала действия, $[Na^+_{in}]^{free}$ и $[K^+_{in}]^{free}$ — концентрация свободного Na^+
воде микроскопически тонкого поверхностного слоя клетки, а q_{Na} и q_K — их коэффи-
равновесного распределения между водой клетки и средой. Прочие обозначения
что в уравнениях А19—А22.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ ТЕОРИИ АССОЦИАЦИИ-ИНДУКЦИИ И СМЕЖНЫХ ПОНЯТИЙ

(словарь составлен на основе определений, данных автором, или определений, заимствованных из других источников)

$(NO\text{-}NO\text{-}NO)^n$ система: формула для обозначения трехмерной системы фиксированных зарядов (геля, коацервата, дисперсионной фазы), образованной на основе линейного полимера одного типа, представляющего собой цепь с закономерно чередующимися отрицательно заряженными группами (N) и незаряженными, нейтральными, группами (O), расположенными друг от друга на расстоянии, оптимальном для связывания адсорбата определенного заряда и геометрической конфигурации, то есть комплементарной адсорбату; *n* обозначает среднее количество цепей полимера, объединенных общей водной оболочкой, идущих параллельно друг другу и сгруппированных вокруг общей оси симметрии. Пример линейного полимера этого типа: поливинилметиловый эфир.

$(NP\text{-}NP\text{-}NP)^n$ система: формула для обозначения трехмерной системы фиксированных зарядов (геля, коацервата, дисперсионной фазы), образованной на основе линейного полимера одного типа, представляющего собой цепь с закономерно чередующимися отрицательно заряженными группами (N) и положительно заряженными группами (P), расположенными друг от друга на расстоянии, оптимальном для связывания адсорбата определенного заряда и геометрической конфигурации, то есть комплементарной адсорбату; *n* обозначает среднее количество цепей полимера, объединенных общей водной оболочкой, идущих параллельно друг другу и сгруппированных вокруг общей оси симметрии.

CO-группа: в этой книге обычно обозначает карбонильную группу (C=O), входящую в состав пептидной связи: $(\text{-}\mathbf{CO}CHRNH\text{-})_n$.

D-эффект: см. F-эффект.

f^-, f^+: фиксированный анион и фиксированный катион соответственно.

F-эффект: комбинация из D-эффекта и I-эффекта. Первый — электростатический эффект взаимодействия зарядов в пространстве, а второй — электростатический эффект, передаваемый через электроны в молекуле — опосредованный промежуточными атомами. Также иногда называемый *прямым* F-эффектом.

I-эффект: см. F-эффект.

$K^{00}_{i\to j}$: см. Внутренняя константа равновесия, также называемую константой сопряженного адсорбционного обмена адсорбата *i* *на j*.

$K^{00}_{Na\to K}$: константа сопряженного адсорбционного обмена Na^+ на K^+, см. Внутренняя константа равновесия.

NP-NP система: линейная система (например, макромолекула) с закономерно чередующимися отрицательными (N) и положительными (P) зарядами.

NP-NP-NP система: двухмерный полимерный матрикс (плоскость), состоящий из параллельно расположенных линейных макромолекул, каждая из которых несет чередующуюся последовательность положительных (P) и отрицательных (N) фиксированных зарядов. На плоскости заряды чередуются в шахматном порядке. В пакете из плоскостей заряд P одной плоскости соседствует с зарядом N другой плоскости (плоскости комплементарны друг другу). Расстояние между зарядами определяет характер взаимодействия макромолекулы с другими соединениями, как низко-, так и высокомолекулярными, то есть преимуществом в сорбционном процессе обладает адсорбат, комплементарный адсорбенту.

N-центр: отрицательно заряженный центр или отрицательный полюс диполя в составе макромолекулы.

O-центр: нейтральная (незаряженная) группа в составе макромолекулы.

α-аминогруппа: аминогруппа, связанная с α-атомом углерода, то есть с атомом углерода, следующим за карбоксильной группой. Например, в α-положении находится аминогруппа в молекуле аминокислоты глицина (NH_2CH_2COOH).

α-спиральная структура: правильная спираль, возникающая в результате образования водородных связей между карбонильными и аминогруппами аминокислотных остатков (каждым первым и третьим). Является элементом вторичной структуры белка.

β- и γ-карбоксильные группы: аспарагиновая и глютаминовая кислоты (дикарбоновые аминокислоты), входя в состав полипептида (белка), привносят с собой отрицательно заряженные группы: β-карбоксильные — аспарагиновой кислоты, и γ-карбоксильные — глютаминовой кислоты.

β-складчатая структура (лист): лентовидная гармошкообразная конформация из двух параллельных фрагментов полипептидной цепи одной молекулы белка называется β-складчатым листом. Пептидные группы (–CO-NH–) обеих цепей располагаются попарно в общей для них плоскости так, что удерживают друг друга благодаря водородным связям, возникающим между элементами пептидной группы N–H и O=C. Две соседние плоскости (в каждой из которых имеется по две пептидных группы – по одной от каждой из цепей) находятся под углом друг к другу подобно складкам гармошки. Если параллельные цепи ориентированы в противоположных направлениях (–CO-NH– ... –HN-OC–), структура называется антипараллельным складчатым листом ($\beta_а$), а если взаимодействующие цепи ориентированы в одном направлении (–CO-NH– ... –CO-NH–), структура называется параллельным складчатым листом ($\beta_п$). В складчатых структурах α-C-атомы располагаются на перегибах, а боковые цепи при них расположены почти перпендикулярно плоскости листа, и направлены то вверх, то вниз от плоскости в ряду от одного α-C-атома углерода к другому. Энергетически более стабильной является антипараллельная складчатая структура. Она присуща фибриллярным белкам групп кератина и миозина, а также белку шелка – фиброину. β-складчатые листы (ленты) могут сшиваться своими краями (теми же водородными связями) с образованием более широких листов, в которые могут включаться цепи двух и более белковых молекул.

$-\gamma/2$ (энергия смежного взаимодействия): энергия взаимодействия соседних центров между собой при кооперативной адсорбции, равная приросту энергии связывания при образовании каждой новой пары взаимодействующих центров связывания альтернативных адсорбатов *i-j* в кооперативном ансамбле бесконечно длинной цепи таких центров (см. раздел 14.3, п. 2 и раздел 4 приложения).

ε-аминогруппа: аминогруппа ($-NH_2$) в боковом радикале молекулы лизина (или остатка лизина в полипептиде), присоединенная к 5-му (ε) атому углерода, считая от карбоксильной группы.

Абсорбированная вода: вода, впитанная гидрофильными коллоидами. Примером могут служить сухие семена растений, впитывающие воду перед прорастанием. Белки обладают большой поглощающей способностью; крахмал и целлюлоза – в меньшей степени. Поглощаемая вода увеличивает объем поглощающего ее материала; при набухании давление может быть очень значительным.

Абсорбировать: поглощать атомы и молекулы одного вещества другим.

Автокооперативная адсорбция: адсорбция, при которой связывание адсорбата одним центром адсорбции усиливает сродство не менее двух соседних центров к этому адсорбату. Иными словами, с каждым актом адсорбции сродство адсорбента к данному адсорбату стремительно нарастает, то есть $-\gamma/2 >> 0$.

Автокооперативность: способность системы к кооперативному переходу с эффектом ускорения изменений благодаря взаимному положительному (стимулирующему) взаимодействию ее элементов.

Автокооперативный фазовый переход: кооперативный фазовый переход, происходящий по закону «все или ничего» благодаря сильному положительному взаимодействию соседних частиц в системе, делающему время жизни промежуточных состояний чрезвычайно коротким.

Адсорбат: адсорбированное вещество (в отличие от адсорбтива — поглощаемого вещества, еще находящегося в объеме фазы).

Адсорбироваться: связываться с поверхностью твердого тела, или с центром адсорбции — специфическим участком твердого тела либо макромолекулы.

Адсорбционно-десорбционная диффузия: движение иона или молекулы в систему, несущую фиксированные заряды/центры связывания, или из нее; пример: поверхность мышечной клетки. Адсорбционно-десорбционный тип входа или выхода означает, что ион или молекула проходят через клеточную поверхность в результате последовательной цепи взаимодействий с фиксированными центрами адсорбции. Такой же тип диффузии имеет место и в теле клетки.

Адсорбционное окрашивание: метод визуализации анионных групп в ультратонких срезах, используемых в электронной микроскопии. Эти группы становятся «видимыми» в результате связывания с ними электронно-плотных ионов Cs^+; обработка ионами Cs^+ проводится в присутствии в растворе Li^+. Метод предложен Людвигом Эдельманом в 1991 г. [282].

Адсорбция: процесс концентрирования вещества из объема фаз на границе их раздела. Подробности и историю изучения см. в работе [107] (р. 37, п. 5). См. также Локализованная адсорбция.

Аминокислоты: органические (карбоновые) кислоты, содержащие, как правило, одну или две аминогруппы ($-NH_2$). В зависимости от положения аминогруппы в углеродной цепи по отношению к карбоксилу различают α-, β-, γ- и т. д. аминокислоты. В природе широко распространены α-аминокислоты, имеющие (кроме глицина) один или два асимметрических атома углерода и, в основном, L-конфигурацию. В построении молекул белка участвуют обычно около 20 аминокислот (пролин – α-иминокислота). Специфическая последовательность чередования аминокислот в пептидных цепях, определяемая генетическим кодом, определяет первичную структуру белка.

Аминокислоты, способные нести отрицательный заряд: тирозин и цистеин имеют боковые группы, которые могут нести отрицательный заряд — фенольная и тиольная группа соответственно.

Аминокислоты, способные нести положительный заряд: лизин, аргинин, и гистидин (так называемые основные аминокислоты). Их боковые группы способны принимать протон: ε-аминогруппа лизина, гуанидиновая группировка аргинина и имидазольное кольцо гистидина.

Ацетилцеллюлозная мембрана: тонкая насыщенная водой прозрачная мембрана, производимая из ацетилцеллюлозы. Перед использованием мембрану подвергают действию температуры 90 °C в течение получаса для «активации», что делает ее проницаемость для растворенных веществ более селективной.

Белки (белок): сложные высокомолекулярные природные органические полимерные вещества, построенные из аминокислот, соединённых пептидными связями. Последовательность аминокислот в белке определена соответствующим геном.

Белок-аккумулятор: гипотетический белок — ключевое звено в механизме активного эпителиального транспорта согласно теории ассоциации-индукции. Внутриклеточн белок бифациальных эпителиальных к ток, циклически «впитывающий» (связы ющий) транспортируемые ионы или дру растворенные вещества с последующей транслокацией и высвобождением.

Белок-переключатель: гипотетический бе (в рамках теории ассоциации-индукци способный запускать или прекращать кой-либо физиологический процесс.

Величина *c*: один из количественных пара тров, используемый в теории ассоциац индукции (описание см. в тексте). Э показатель характеризует электронн плотность однозарядного атома кислор в кислородсодержащей кислотной груп Отражает вариабельность электрон плотности, определяющей константу д социаций кислот (pK). Слабые кисло (с высоким pK) имеют более высокое з чение *c*, сильные кислоты (с низким pK) более низкую величину *c*.

Величина *c′*: эквивалент величины *c*, приме емый к катионным группам. Высокое з чение *c′* соответствует большой плотно электронов на положительном заряде, н кое – малой.

Величины *c* аналог: аналог величины *c*, харак ризующий электронную плотность на ат кислорода в пептидной группе белка.

Величины *c′* аналог: аналог величины *c′*, рактеризующий электронную плотность положительно заряженной иминогру пептидной связи белка.

Внутренняя константа равновесия (K^{00}_{i-} в равновесной системе, содержащей д конкурирующих адсорбата *i* и *j*, констан равновесия обмена *i* на *j* для центра с зывания, соседствующим с одной стор с сайтом связывания, удерживающим ве ство *i*, а с другой стороны с сайтом, связа ным с *j*. При этом замена *i* на *j* на средн сайте связывания (между двумя указанн ми) не должна влиять на общее количест адсорбированных пар *ij* в системе.

Водородная связь: слабая нековалентная свя образующаяся между электроотрицател ным атомом молекулы (например, атом кислорода) и электроположительным я ром водорода (протоном), который, в св очередь, ковалентно связан с другим эле троотрицательным атомом той же или седней молекулы. Таким образом, водоро ная связь выглядит как связь между дву электроотрицательными группами бла даря посреднической роли атома водоро расположенного между ними.

ıральная структура: правильная спираль, возникающая в результате образования водородных связей между карбонильными и аминогруппами аминокислотных остатков (каждым первым и третьим). Является элементом вторичной структуры белка.

γ-карбоксильные группы: аспарагиновая и глютаминовая кислоты (дикарбоновые аминокислоты), входя в состав полипептида (белка), привносят с собой отрицательно заряженные группы: β-карбоксильные — аспарагиновой кислоты, и γ-карбоксильные — глютаминовой кислоты.

ıадчатая структура (лист): лентовидная гармошкообразная конформация из двух параллельных фрагментов полипептидной цепи одной молекулы белка называется β-складчатым листом. Пептидные группы (−CO-NH−) обеих цепей располагаются попарно в общей для них плоскости так, что удерживают друг друга благодаря водородным связям, возникающим между элементами пептидной группы N−H и O=C. Две соседние плоскости (в каждой из которых имеется по две пептидных группы — по одной от каждой из цепей) находятся под углом друг к другу подобно складкам гармошки. Если параллельные цепи ориентированы в противоположных направлениях (−CO-NH− ... −HN-OC−), структура называется антипараллельным складчатым листом (β_α), а если взаимодействующие цепи ориентированы в одном направлении (−CO-NH− ... −CO-NH−), структура называется параллельным складчатым листом ($\beta_п$). В складчатых структурах α-C-атомы располагаются на перегибах, а боковые цепи при них расположены почти перпендикулярно плоскости листа, и направлены то вверх, то вниз от плоскости в ряду от одного α-C-атома углерода к другому. Энергетически более стабильной является антипараллельная складчатая структура. Она присуща фибриллярным белкам групп кератина и миозина, а также белку шелка — фиброину. β-складчатые листы (ленты) могут сшиваться своими краями (теми же водородными связями) с образованием более широких листов, в которые могут включаться цепи двух и более белковых молекул.

(энергия смежного взаимодействия): энергия взаимодействия соседних центров между собой при кооперативной адсорбции, равная приросту энергии связывания при образовании каждой новой пары взаимодействующих центров связывания альтернативных адсорбатов *i-j* в кооперативном ансамбле бесконечно длинной цепи таких центров (см. раздел 14.3, п. 2 и раздел 4 приложения).

ε-аминогруппа: аминогруппа ($-NH_2$) в боковом радикале молекулы лизина (или остатка лизина в полипептиде), присоединенная к 5-му (**ε**) атому углерода, считая от карбоксильной группы.

Абсорбированная вода: вода, впитанная гидрофильными коллоидами. Примером могут служить сухие семена растений, впитывающие воду перед прорастанием. Белки обладают большой поглощающей способностью; крахмал и целлюлоза – в меньшей степени. Поглощаемая вода увеличивает объем поглощающего ее материала; при набухании давление может быть очень значительным.

Абсорбировать: поглощать атомы и молекулы одного вещества другим.

Автокооперативная адсорбция: адсорбция, при которой связывание адсорбата одним центром адсорбции усиливает сродство не менее двух соседних центров к этому адсорбату. Иными словами, с каждым актом адсорбции сродство адсорбента к данному адсорбату стремительно нарастает, то есть $-\gamma/2 >> 0$.

Автокооперативность: способность системы к кооперативному переходу с эффектом ускорения изменений благодаря взаимному положительному (стимулирующему) взаимодействию ее элементов.

Автокооперативный фазовый переход: кооперативный фазовый переход, происходящий по закону «все или ничего» благодаря сильному положительному взаимодействию соседних частиц в системе, делающему время жизни промежуточных состояний чрезвычайно коротким.

Адсорбат: адсорбированное вещество (в отличие от адсорбтива — поглощаемого вещества, еще находящегося в объеме фазы).

Адсорбироваться: связываться с поверхностью твердого тела, или с центром адсорбции — специфическим участком твердого тела либо макромолекулы.

Адсорбционно-десорбционная диффузия: движение иона или молекулы в систему, несущую фиксированные заряды/центры связывания, или из нее; пример: поверхность мышечной клетки. Адсорбционно-десорбционный тип входа или выхода означает, что ион или молекула проходят через клеточную поверхность в результате последовательной цепи взаимодействий с фиксированными центрами адсорбции. Такой же тип диффузии имеет место и в теле клетки.

Адсорбционное окрашивание: метод визуализации анионных групп в ультратонких срезах, используемых в электронной микроскопии. Эти группы становятся «видимыми» в результате связывания с ними электронно-плотных ионов Cs^+; обработка ионами Cs^+ проводится в присутствии в растворе Li^+. Метод предложен Людвигом Эдельманом в 1991 г. [282].

Адсорбция: процесс концентрирования вещества из объема фаз на границе их раздела. Подробности и историю изучения см. в работе [107] (p. 37, п. 5). См. также Локализованная адсорбция.

Аминокислоты: органические (карбоновые) кислоты, содержащие, как правило, одну или две аминогруппы ($-NH_2$). В зависимости от положения аминогруппы в углеродной цепи по отношению к карбоксилу различают α-, β-, γ- и т. д. аминокислоты. В природе широко распространены α-аминокислоты, имеющие (кроме глицина) один или два асимметрических атома углерода и, в основном, L-конфигурацию. В построении молекул белка участвуют обычно около 20 аминокислот (пролин – α-иминокислота). Специфическая последовательность чередования аминокислот в пептидных цепях, определяемая генетическим кодом, определяет первичную структуру белка.

Аминокислоты, способные нести отрицательный заряд: тирозин и цистеин имеют боковые группы, которые могут нести отрицательный заряд — фенольная и тиольная группа соответственно.

Аминокислоты, способные нести положительный заряд: лизин, аргинин, и гистидин (так называемые основные аминокислоты). Их боковые группы способны принимать протон: ε-аминогруппа лизина, гуанидиновая группировка аргинина и имидазольное кольцо гистидина.

Ацетилцеллюлозная мембрана: тонкая насыщенная водой прозрачная мембрана, производимая из ацетилцеллюлозы. Перед использованием мембрану подвергают действию температуры 90 °C в течение получаса для «активации», что делает ее проницаемость для растворенных веществ более селективной.

Белки (белок): сложные высокомолекулярные природные органические полимерные вещества, построенные из аминокислот, соединённых пептидными связями. Последовательность аминокислот в белке определена соответствующим геном.

Белок-аккумулятор: гипотетический белок — ключевое звено в механизме активного эпителиального транспорта согласно теории ассоциации-индукции. Внутриклеточный белок бифациальных эпителиальных клеток, циклически «впитывающий» (связывающий) транспортируемые ионы или другие растворенные вещества с последующей их транслокацией и высвобождением.

Белок-переключатель: гипотетический белок (в рамках теории ассоциации-индукции), способный запускать или прекращать какой-либо физиологический процесс.

Величина *c*: один из количественных параметров, используемый в теории ассоциации-индукции (описание см. в тексте). Этот показатель характеризует электронную плотность однозарядного атома кислорода в кислородсодержащей кислотной группе. Отражает вариабельность электронной плотности, определяющей константу диссоциаций кислот (pK). Слабые кислоты (с высоким pK) имеют более высокое значение *c*, сильные кислоты (с низким pK) — более низкую величину *c*.

Величина *c′*: эквивалент величины *c*, применяемый к катионным группам. Высокое значение *c′* соответствует большой плотности электронов на положительном заряде, низкое – малой.

Величины *c* аналог: аналог величины *c*, характеризующий электронную плотность на атоме кислорода в пептидной группе белка.

Величины *c′* аналог: аналог величины *c′*, характеризующий электронную плотность на положительно заряженной иминогруппе пептидной связи белка.

Внутренняя константа равновесия ($K^{00}_{i\to j}$): в равновесной системе, содержащей два конкурирующих адсорбата *i* и *j*, константа равновесия обмена *i* на *j* для центра связывания, соседствующим с одной стороны с сайтом связывания, удерживающим вещество *i*, а с другой стороны с сайтом, связанным с *j*. При этом замена *i* на *j* на среднем сайте связывания (между двумя указанными) не должна влиять на общее количество адсорбированных пар *ij* в системе.

Водородная связь: слабая нековалентная связь, образующаяся между электроотрицательным атомом молекулы (например, атомом кислорода) и электроположительным ядром водорода (протоном), который, в свою очередь, ковалентно связан с другим электроотрицательным атомом той же или соседней молекулы. Таким образом, водородная связь выглядит как связь между двумя электроотрицательными группами благодаря посреднической роли атома водорода, расположенного между ними.

Восемь взаимодействий: восемь видов взаимодействия, учтенных при вычислении данных, подобных показанным на рис. 42, а именно: 1) заряд–заряд; 2) заряд–постоянный диполь; 3) заряд–индуцированный диполь; 4) постоянный диполь–постоянный диполь; 5) постоянный диполь–индуцированный диполь; 6) индуцированный диполь–индуцированный диполь; 7) дисперсионные (лондоновские) силы; 8) силы отталкивания Борна.

Вращательная энтропия: энтропия вещества, связанная с вращательными движениями его молекул. Минимальных значений вращательная энтропия атома или молекулы достигает в кристаллической решетке или при температуре, близкой к абсолютному нулю.

Время диэлектрической переориентации Дебая (Debye) (время диэлектрической релаксации Дебая), τ_D: постоянная скорости падения макроскопической поляризации при внезапном удалении внешнего поля.

Время полуобмена: время, необходимое для обмена половины ионов или молекул одной фазы на аналогичные ионы и молекулы смежной фазы. Например, время полуобмена ионов натрия клетки на ионы натрия среды. Обычно определяется с помощью меченых атомов или молекул, которые вносятся в среду в относительно небольшом количестве. Принимается, что радиоактивный изотоп натрия распределяется точно так же, как и нерадиоактивный. То же относится и к молекулам, меченным радиоактивными атомами, включенными в их состав. Термин применим и к процессам обмена подвижных атомов, входящих в состав белков и других макромолекул. Например, ионы водорода способны обмениваться на ионы дейтерия, его тяжелого изотопа.

Всё или ничего: так говорят о явлении, которое либо происходит в полном объеме, либо не происходит вовсе, то есть явление развивается быстро, так как время жизни промежуточных состояний очень мало.

Вспомогательный кардинальный адсорбат: кардинальный адсорбат, выполняющий роль модификатора состояния клетки. Как правило, действует совместно с основным кардинальным адсорбатом (АТФ), играющим ключевую роль в поддержании живого состояния клетки.

Вторичная структура белка: совокупность участков полипептидной молекулы, характеризующихся регулярной структурой, обусловленной водородными связями между группами C=O и H—N, принадлежащими пептидным группам разных аминокислот. К вторичным структурам относятся α-спирали, β-складчатые листы, трёхчленная спиральная структура — особенная структура, образующаяся в результате сплетения трёх полипептидных цепей (пример: коллаген).

Высокоэнергетическое, низкоэнтропийное состояние: согласно теории ассоциации-индукции, клетка или протоплазма в состоянии покоя характеризуется высоким содержанием (запасом) свободной энергии и низкой энтропией. При переходе клетки в активное состояние, энтропия системы возрастает, энергия высвобождается и расходуется на совершение различных видов биологической работы.

Гель: 1) в коллоидной химии гели — дисперсные системы с жидкой дисперсионной средой, в которых частицы дисперсной фазы образуют пространственную структурную сетку. Представляют собой твердообразные («студенистые») тела, способные сохранять форму, обладающие упругостью и пластичностью. Типичные гели имеют коагуляционную структуру, то есть частицы дисперсной фазы соединены в местах контакта силами межмолекулярного взаимодействия непосредственно или через тонкую прослойку дисперсионной среды. Для них характерна тиксотропия, то есть способность в изотермических условиях самопроизвольно восстанавливать свою структуру после механического разрушения. Такие гели образуются, например, при коагуляции золей (коагели), понижении температуры или концентрировании мицеллярных растворов мыл, выделении новой дисперсной фазы из пересыщенных растворов (лиогели). Гели могут возникать в виде рыхлых осадков либо образуют структурную сетку во всем объеме первоначально жидкой системы без нарушения ее макрооднородности. Гели с водной дисперсионной средой называются гидрогелями, с углеводородной — органогелями.

Генеральный кардинальный адсорбат (ГКА): кардинальный адсорбат (например, АТФ), способный вносить ключевые изменения в свойства сорбентов, с которыми он взаимодействует (таким сорбентом в теории Линга являются белки). К этим изменениям следует отнести, прежде всего, глубокие конформационные изменения в молекуле-сорбенте, вызванные перераспределением в ней электронной плотности, приводящим к исключительно важным изменениям свойств различных функциональных групп белка, включая фиксированные заряды.

Гетерокооперативное взаимодействие: кооперативное взаимодействие центров связывания, в результате которого связывание адсорбата *i* одним центром связывания усиливает связывание адсорбата *j* соседним центром адсорбции (интенсивность такого рода взаимодействий характеризует параметр — $\gamma/2$). Понятие гетерокооперативного взаимодействия родилось в контексте теории АИ и напоминает антиферромагнитное кооперативное взаимодействие, известное в физике.

Гидратированный K^+, гидратированный Na^+: см. Гидратированный ион.

Гидратированный ион: гидратация — взаимодействие веществ с водой, при котором молекулы воды не разрушаются. Взаимодействие воды с ионами обусловлено дипольным характером молекулы воды. Первичной гидратацией называют взаимодействие ионов только с соседними молекулами воды, вторичной — со всей остальной ее массой. В водном растворе такие ионы, как K^+ и Na^+, гидратированы, то есть окружены гидратной оболочкой, причем размер гидратной оболочки у Na^+ больше, так как радиус этого иона меньше радиуса иона K^+, следовательно, сила электростатического взаимодействия Na^+ с водой больше, и он притягивает большее количество молекул воды.

Гидратная вода: вода, молекулы которой находятся в относительно стабильной связи с ионами, неэлектролитами, макромолекулами (в т. ч. белками) и т. д. (см. Гидратированный ион).

Гиперболическая кривая: в качестве примера гиперболической функции обычно приводят график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. При низких концентрациях субстрата скорость реакции нарастает быстро, а при больших прирост замедляется таким образом, что кривая приобретает вид равносторонней гиперболы, поэтому такие зависимости называются гиперболическими. Подобный вид имеют многие другие кривые: к примеру, кривая связывания кислорода миоглобином (см. кривую слева во врезке к рис. 55). Однако часто пренебрегают тем, что экспериментальная кривая лишь приближается к гиперболе, а не совпадает с ней. Свойство гиперболы таково, что с ростом аргумента (x) функция (y) растет до бесконечности, стремясь к пределу, называемому асимптотой. Реальные процессы в клетке таким свойством не обладают (уравнение ферментативной кинетики Генри-Михаэлиса-Ментен, изотерма адсорбции Ленгмюра), их течение имеет предел. Поэтому слово «гиперболический» лучше употреблять в кавычках.

Глобулярные белки: белки, полипептидные цепи которых свернуты в компактные сферические или эллипсоидные структуры (глобулы). Важнейшие представители глобулярных белков: альбумины, глобулины, протамины, гистоны, проламины, глутелины. Многие глобулярные белки выполняют динамические функции. Так, к глобулярным белкам относятся почти все известные ферменты, антитела, некоторые гормоны и многие транспортные белки. Большинство полярных боковых групп аминокислотных остатков полипептидных цепей таких белков находится на поверхности глобул в гидратированном состоянии, а гидрофобные группы скрыты внутри глобул.

Градиент концентрации: градиент означает изменение, переход; градиент концентрации — нарастание или падение концентрации растворенного вещества, вызванное различными причинами: например, механическим препятствием, действием электромагнитных, гравитационных полей или различием в растворяющей способности граничащих фаз, например, октанол/вода.

Гуанидиновая группа: $NH_2C{=}NH^-(NH)$ — по своим размерам и форме похожа на гидратированные ионы натрия и потому сходна с ними по биологическим эффектам. Из аминокислот, входящих в состав белков, гуанидиновую группу содержит аргинин.

Гуммиарабик: наиболее важный представитель класса природных полисахаридов. Находит широкое применение в медицинской, косметической, пищевой и фармацевтической промышленности благодаря комплексу таких свойств, как биологическая активность, биодеградируемость, биосовместимость, комплексообразующая и сорбционная способности.

Денатурированный белок: первое определение денатурации было предложено Хсеном Ву (H. Wu) в 1931 г. и звучало так: «Денатурация – это такое изменение молекул нативного белка, в результате которого он теряет растворимость в средах, в которых растворялся в нативном состоянии» [107, p. 37, п 4]. С тех пор значение терминов «нативный белок» и «денатурированный белок» изменилось. Так, слово «нативный» часто используется для обо-

взаимодействий: восемь видов взаимо-
ствия, учтенных при вычислении дан-
х, подобных показанным на рис. 42, а
енно: 1) заряд–заряд; 2) заряд–посто-
ный диполь; 3) заряд–индуцированный
юль; 4) постоянный диполь–постоян-
й диполь; 5) постоянный диполь–инду-
рованный диполь; 6) индуцированный
юль–индуцированный диполь; 7) дис-
рсионные (лондоновские) силы; 8) силы
алкивания Борна.

тельная энтропия: энтропия вещества,
занная с вращательными движениями
молекул. Минимальных значений вра-
тельная энтропия атома или молекулы
тигает в кристаллической решетке или
температуре, близкой к абсолютному
ю.

циэлектрической переориентации Дебая
ebye) (время диэлектрической релакса-
Дебая), τ_D: постоянная скорости па-
ия макроскопической поляризации при
запном удалении внешнего поля.

полуобмена: время, необходимое для
ена половины ионов или молекул одной
ы на аналогичные ионы и молекулы
жной фазы. Например, время полуоб-
а ионов натрия клетки на ионы натрия
ды. Обычно определяется с помощью
еных атомов или молекул, которые вно-
ся в среду в относительно небольшом ко-
естве. Принимается, что радиоактивный
топ натрия распределяется точно так
как и нерадиоактивный. То же относит-
и к молекулам, меченным радиоактив-
ми атомами, включенными в их состав.
мин применим и к процессам обмена
вижных атомов, входящих в состав бел-
и других макромолекул. Например,
ы водорода способны обмениваться на
ы дейтерия, его тяжелого изотопа.

ничего: так говорят о явлении, которое
о происходит в полном объеме, либо не
исходит вовсе, то есть явление развива-
быстро, так как время жизни проме-
очных состояний очень мало.

ательный кардинальный адсорбат:
динальный адсорбат, выполняющий
модификатора состояния клетки. Как
вило, действует совместно с основным
динальным адсорбатом (АТФ), играю-
ключевую роль в поддержании живо-
остояния клетки.

ая структура белка: совокупность уча-
в полипептидной молекулы, характе-
ующихся регулярной структурой, обус-
енной водородными связями между
ппами C=O и H—N, принадлежащими
пептидным группам разных аминокислот. К вторичным структурам относятся α-спирали, β-складчатые листы, трёхчленная спиральная структура — особенная структура, образующаяся в результате сплетения трёх полипептидных цепей (пример: коллаген).

Высокоэнергетическое, низкоэнтропийное состояние: согласно теории ассоциации-индукции, клетка или протоплазма в состоянии покоя характеризуется высоким содержанием (запасом) свободной энергии и низкой энтропией. При переходе клетки в активное состояние, энтропия системы возрастает, энергия высвобождается и расходуется на совершение различных видов биологической работы.

Гель: 1) в коллоидной химии гели — дисперсные системы с жидкой дисперсионной средой, в которых частицы дисперсной фазы образуют пространственную структурную сетку. Представляют собой твердообразные («студенистые») тела, способные сохранять форму, обладающие упругостью и пластичностью. Типичные гели имеют коагуляционную структуру, то есть частицы дисперсной фазы соединены в местах контакта силами межмолекулярного взаимодействия непосредственно или через тонкую прослойку дисперсионной среды. Для них характерна тиксотропия, то есть способность в изотермических условиях самопроизвольно восстанавливать свою структуру после механического разрушения. Такие гели образуются, например, при коагуляции золей (коагели), понижении температуры или концентрировании мицеллярных растворов мыл, выделении новой дисперсной фазы из пересыщенных растворов (лиогели). Гели могут возникать в виде рыхлых осадков либо образуют структурную сетку во всем объеме первоначально жидкой системы без нарушения ее макрооднородности. Гели с водной дисперсионной средой называются гидрогелями, с углеводородной — органогелями.

Генеральный кардинальный адсорбат (ГКА): кардинальный адсорбат (например, АТФ), способный вносить ключевые изменения в свойства сорбентов, с которыми он взаимодействует (таким сорбентом в теории Линга являются белки). К этим изменениям следует отнести, прежде всего, глубокие конформационные изменения в молекуле-сорбенте, вызванные перераспределением в ней электронной плотности, приводящим к исключительно важным изменениям свойств различных функциональных групп белка, включая фиксированные заряды.

Гетерокооперативное взаимодействие: кооперативное взаимодействие центров связывания, в результате которого связывание адсорбата *i* одним центром связывания усиливает связывание адсорбата *j* соседним центром адсорбции (интенсивность такого рода взаимодействий характеризует параметр — $\gamma/2$). Понятие гетерокооперативного взаимодействия родилось в контексте теории АИ и напоминает антиферромагнитное кооперативное взаимодействие, известное в физике.

Гидратированный K^+, гидратированный Na^+: см. Гидратированный ион.

Гидратированный ион: гидратация — взаимодействие веществ с водой, при котором молекулы воды не разрушаются. Взаимодействие воды с ионами обусловлено дипольным характером молекулы воды. Первичной гидратацией называют взаимодействие ионов только с соседними молекулами воды, вторичной — со всей остальной ее массой. В водном растворе такие ионы, как K^+ и Na^+, гидратированы, то есть окружены гидратной оболочкой, причем размер гидратной оболочки у Na^+ больше, так как радиус этого иона меньше радиуса иона K^+, следовательно, сила электростатического взаимодействия Na^+ с водой больше, и он притягивает большее количество молекул воды.

Гидратная вода: вода, молекулы которой находятся в относительно стабильной связи с ионами, неэлектролитами, макромолекулами (в т. ч. белками) и т. д. (см. Гидратированный ион).

Гиперболическая кривая: в качестве примера гиперболической функции обычно приводят график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. При низких концентрациях субстрата скорость реакции нарастает быстро, а при больших прирост замедляется таким образом, что кривая приобретает вид равносторонней гиперболы, поэтому такие зависимости называются гиперболическими. Подобный вид имеют многие другие кривые: к примеру, кривая связывания кислорода миоглобином (см. кривую слева во врезке к рис. 55). Однако часто пренебрегают тем, что экспериментальная кривая лишь приближается к гиперболе, а не совпадает с ней. Свойство гиперболы таково, что с ростом аргумента (x) функция (y) растет до бесконечности, стремясь к пределу, называемому асимптотой. Реальные процессы в клетке таким свойством не обладают (уравнение ферментативной кинетики Генри-Михаэлиса-Ментен, изотерма адсорбции Ленгмюра), их течение имеет предел. Поэтому слово «гиперболический» лучше употреблять в кавычках.

Глобулярные белки: белки, полипептидные цепи которых свернуты в компактные сферические или эллипсоидные структуры (глобулы). Важнейшие представители глобулярных белков: альбумины, глобулины, протамины, гистоны, проламины, глутелины. Многие глобулярные белки выполняют динамические функции. Так, к глобулярным белкам относятся почти все известные ферменты, антитела, некоторые гормоны и многие транспортные белки. Большинство полярных боковых групп аминокислотных остатков полипептидных цепей таких белков находится на поверхности глобул в гидратированном состоянии, а гидрофобные группы скрыты внутри глобул.

Градиент концентрации: градиент означает изменение, переход; градиент концентрации — нарастание или падение концентрации растворенного вещества, вызванное различными причинами: например, механическим препятствием, действием электромагнитных, гравитационных полей или различием в растворяющей способности граничащих фаз, например, октанол/вода.

Гуанидиновая группа: $NH_2C{=}NH^-(NH)$ — по своим размерам и форме похожа на гидратированные ионы натрия и потому сходна с ними по биологическим эффектам. Из аминокислот, входящих в состав белков, гуанидиновую группу содержит аргинин.

Гуммиарабик: наиболее важный представитель класса природных полисахаридов. Находит широкое применение в медицинской, косметической, пищевой и фармацевтической промышленности благодаря комплексу таких свойств, как биологическая активность, биодеградируемость, биосовместимость, комплексообразующая и сорбционная способности.

Денатурированный белок: первое определение денатурации было предложено Хсеном Ву (H. Wu) в 1931 г. и звучало так: «Денатурация — это такое изменение молекул нативного белка, в результате которого он теряет растворимость в средах, в которых растворялся в нативном состоянии» [107, p. 37, п 4]. С тех пор значение терминов «нативный белок» и «денатурированный белок» изменилось. Так, слово «нативный» часто используется для обо-

значения структуры белка, находящегося в кристаллической форме (в случае глобулярных белков это — свернутая глобула). В этом контексте денатурация означает смену свернутой конформации на полностью развернутую. Однако имеются веские основания полагать, что большинство белков в своем естественном окружении внутри клетки существуют не в свернутом, а в полностью развернутом виде (раздел 16.6, п. 1.3). В результате термин «денатурация» не только потерял свой изначальный смысл, но приобрел в контексте этой книги противоположное новое значение: денатурация — не развертывание, а свертывание белковой молекулы.

Диффузионное давление: полезное выражение, восходящее к понятию «плотность диффузионного потока» — чем ближе к источнику диффундирующего вещества, тем выше диффузионное давление потока на воображаемое препятствие (например, на мембрану).

Диффузионное равновесие: диффундирующее вещество достигает диффузионного равновесия, когда количество вещества, поступающего в любую область диффузионного пространства в единицу времени, становится равным количеству вещества, покидающего эту область, то есть входные и выходные потоки уравновешиваются.

Диффузия, ограниченная поверхностью: диффузия из одной фазы (допустим, твердого тела) в другую (допустим, жидкость), самым медленным этапом которой является переход вещества через границу раздела между фазами.

Дуплетная адсорбция-десорбция: один из способов входа иона в клетку либо модельную систему (или выхода из нее), заключающийся в его временном связывании с противоположно заряженным фиксированным ионом (адсорбции), колебаниях вокруг него и дальнейшей десорбции.

Закон макроскопической электронейтральности: закон, гласящий, что у любого объекта макроскопических размеров в любой момент времени общее число положительных зарядов равно общему числу отрицательных зарядов. Даже весьма незначительное нарушение этого баланса зарядов привело бы к возникновению электростатического потенциала. Убедимся в этом на видоизмененном примере, приведенном Гугенгеймом [97, p. 330—331]. Представьте себе живую клетку сферической формы радиусом 0,1 мкм (10^{-6} м). Удалим из нее небольшое количество K^+ – 10^{-18} моль. В результате, внутри клетки появится избыток отрицательных зарядов, составляющий 10^{-18} от числа Фарадея, или $0{,}965 \times 10^5 \times 10^{-18} = 9{,}65 \times 10^{-14}$ кулонов. Электрический потенциал ψ заряженной сферы радиуса r в водной среде определяется формулой $\psi = Q/\varepsilon r$, где Q – электрический заряд, а ε – диэлектрическая проницаемость воды, равная $78{,}5 \times 1{,}11 \times 10^{-10}$ Кл/В·м $= 8{,}72 \times 10^{-9}$ Кл/В·м при 25 °С. Подставив полученные значения, мы получаем $\psi = (9{,}65 \times 10^{-14})/(8{,}72 \times 10^{-9} \times \times 10^{-6}) = 11$ вольт. При этом разность электрических потенциалов, фактически регистрирующаяся в животных клетках, не превышает 0,1 вольт. Если предположить, что в нашей сферической клетке *K^+ содержится в обычной концентрации 100 ммоль/кг, его количество в нашей клетке должно составить* $(4/3)\,\pi\, r^3 \times 10^{-4} = 4{,}19 \times (10^{-4})^3 \times \times 10^{-4} = 4{,}19 \times 10^{-16}$ моль. Удаленное в нашем мысленном эксперименте количество калия (10^{-18} моль) составляет $10^{-18}/(4{,}19 \times 10^{-16}) = 2{,}39 \times 10^{-3}$, или всего лишь 0,239% от общего количества K^+ в клетке. Как видим, стремление системы к электронейтральности не позволит нам удалить из клетки даже ничтожное, казалось бы, количество зарядов.

Закон экономии мысли: см. Лезвие Оккама.

Золи: коллоидные системы с жидкой дисперсионной средой. Золи с водной средой называются гидрозолями, с органической средой — органозолями. Частицы дисперсной фазы золя (мицеллы) находятся в броуновском движении. При коагуляции лиофобные золи (то есть такие, для которых характерно слабое взаимодействие частиц со средой) превращаются в гели.

Зона высокой ассоциативной плотности: если взглянуть на кусочек сахара спустя некоторое время после того, как его обнаружат муравьи, то мы обнаружим, что чем ближе к сахару, тем плотнее территория вокруг него «заселена» муравьями. Сходная картина складывается и вокруг фиксированных анионов — чем ближе к аниону, тем плотнее пространство вокруг него заселено противоионами, например, K^+. Ближайшую к фиксированному заряду область назовем зоной высокой ассоциативной плотности.

Изомерия: явление, заключающееся в существовании веществ, одинаковых по составу и молекулярной массе, но различающихся по строению или расположению атомов в пространстве и вследствие этого — по физическим и химическим свойствам. Такие вещества называются изомерами.

Изотерма: закон связи между физическими величинами в равновесных процессах адсорбции при постоянной температуре.

Изотерма адсорбции: см. Изотерма адсорбции Ленгмюра.

Изотерма адсорбции Ленгмюра: изотермы адсорбции — кривые зависимости равновесного количества адсорбированного вещества от его давления или концентрации в объемной фазе при постоянной температуре. При адсорбции на твердых поверхностях часто рассматривают полное содержание адсорбированного вещества в поверхностном слое толщиной в одну молекулу (мономолекулярная адсорбция) или несколько (полимолекулярная адсорбция). Мономолекулярная адсорбция на однородных поверхностях из газовой фазы или раствора описывается уравнением Ирвинга Ленгмюра (Irving Langmuir, 1881—1957), предложенным в 1918 г. Для неоднородных поверхностей используют эмпирическое уравнение Фрейндлиха. Оба уравнения учитывают взаимодействие адсорбированных молекул между собой.

Изотерма многослойной адсорбции Брэдли: уравнение, предложенное Р. Брэдли в 1936 году и связывающее адсорбционную емкость мультислоя атомов или молекул газа (с неизменными дипольными моментами — например, водяного пара), сформировавшегося на полярных поверхностях, с изменениями парциального давления пара при постоянной температуре (уравнение А2 в приложении).

Иминогруппа: группа =N–H или =N–R, где R — радикал, не обладающий свойствами кислоты. Иминогруппа входит в состав пролина — единственной иминокислоты.

Индуктивный (индукционный) эффект: вид взаимного влияния атомов в молекуле, заключается в перераспределении электронной плотности в молекуле, при котором плотность электронов (плотность заряда) может измениться у ковалентной связи, на функциональной группе, на активном центре или на каком-либо рассматриваемом атоме. Наиболее сильное и медленно затухающее влияние оказывают заряженные заместители, например NR_3^+, SO_3^-, O^-. Индуктивное влияние заместителей на константы равновесия или скорости реакций выражается в изменении разностей свободных энергий $\delta\Delta G$ продуктов (или переходного состояния) и исходных веществ для замещенного соединения по сравнению со стандартным. Например, при диссоциации кислот RCOOH появляется отрицательный заряд *e* на атоме кислорода карбоксильной группы (–COO). Он взаимодействует с заместителем, несущим электрический заряд на расстоянии *r* с энергией $\delta\Delta G = e^2 r^{-1}$. При наличии в молекуле полярного заместителя X, $\delta\Delta G$ зависит от величины электрического дипольного момента *m*, связи C—X, расстояния *r* между точкой локализации диполя связи (обычно в центре тяжести суммарного заряда валентных электронов) и реакционным центром, и угла Θ между направлениями *m* и *r*: $\delta\Delta G = -em\cos\Theta\, r^{-2}$. Индукционный эффект проявляется также в сдвиге электронов химических связей под действием внутримолекулярного электрического поля. Количественно он выражается величиной индуцированного дипольного момента m_i, которая пропорциональна поляризуемости связи σ при напряженности поля E: $m_i = \sigma E$. Индукционный эффект ведет к изменению полярности химических связей. В ряду CH_3Cl, CH_2Cl_2, $CHCl_3$ дипольные моменты соединений равны соответственно (в Кл • м): $6{,}23 \cdot 10^{-30}$; $4{,}63 \cdot 10^{-30}$; $3{,}50 \cdot 10^{-36}$. Увеличение размера легко поляризуемого углеводородного радикала обусловливает возрастание дипольного момента молекулы (в скобках приведены значения $m \cdot 10^{-30}$ в Кл • м): CH_3Cl (6,23), C_2H_5Cl (6,30), изо-C_3H_7Cl (6,68), трет-C_4H_9Cl (7,71). В результате индукционного эффекта электронная плотность на реакционном центре или индикаторном атоме может увеличиваться (положительный И. э., +I) или уменьшаться (отрицательный И. э., –I). Индукционный эффект заряженного заместителя определяется знаком заряда, положительно заряженный является акцептором электронов, то есть проявляет –I-эффект; отрицательно заряженный – донор (+I-эффект). Электроотрицательные группы обычно проявляют –I-эффект, а алкильные радикалы, Si–, Ge– и оловосодержащие группы и т. п. – +I-эффект. Однако при малых углах Θ возможен «обратный» индукционный эффект. Важную роль играют взаимодействия зарядов с индуцируемыми ими в углеводородных радикалах диполями. Они стабилизируют заряды любого знака и проявляются главным образом в газофазных реакциях протонирования и кислотной диссоциации. Возникновение дипольного момента молекулы под воздействием электрического поля реагента называется индуктомерным эффектом. В рамках формального подхода индуктивный эффект

значения структуры белка, находящегося кристаллической форме (в случае глобулярных белков это — свернутая глобула). этом контексте денатурация означает мену свернутой конформации на полностью развернутую. Однако имеются веские основания полагать, что большинство елков в своем естественном окружении нутри клетки существуют не в свернутом, в полностью развернутом виде (раздел 16.6, п. 1.3). В результате термин «денатурация» не только потерял свой изначальный смысл, но приобрел в контексте этой ниги противоположное новое значение: енатурация — не развертывание, а свертывание белковой молекулы.

рузионное давление: полезное выражение, осходящее к понятию «плотность диффузионного потока» — чем ближе к источнику диффундирующего вещества, тем выше иффузионное давление потока на воображаемое препятствие (например, на мембрану).

рузионное равновесие: диффундирующее ещество достигает диффузионного равновесия, когда количество вещества, поступающего в любую область диффузионного ространства в единицу времени, становится равным количеству вещества, покидающего эту область, то есть входные и выходные потоки уравновешиваются.

рузия, ограниченная поверхностью: диффузия из одной фазы (допустим, твердого ела) в другую (допустим, жидкость), самым медленным этапом которой является ереход вещества через границу раздела ежду фазами.

етная адсорбция-десорбция: один из способов входа иона в клетку либо модельную истему (или выхода из нее), заключающийся в его временном связывании с противоположно заряженным фиксированным оном (адсорбции), колебаниях вокруг него дальнейшей десорбции.

макроскопической электронейтральности: закон, гласящий, что у любого объекта акроскопических размеров в любой момент времени общее число положительных арядов равно общему числу отрицательных зарядов. Даже весьма незначительное арушение этого баланса зарядов привело ы к возникновению электростатического отенциала. Убедимся в этом на видоизмененном примере, приведенном Гугенгеймом 97, p. 330—331]. Представьте себе живую летку сферической формы радиусом ,1 мкм (10^{-6} м). Удалим из нее небольшое количество K^+ — 10^{-18} моль. В результате, внутри клетки появится избыток отрицательных зарядов, составляющий 10^{-18} от числа Фарадея, или $0{,}965 \times 10^5 \times 10^{-18} = 9{,}65 \times 10^{-14}$ кулонов. Электрический потенциал ψ заряженной сферы радиуса r в водной среде определяется формулой $\psi = Q/\varepsilon r$, где Q — электрический заряд, а ε — диэлектрическая проницаемость воды, равная $78{,}5 \times 1{,}11 \times 10^{-10}$ Кл/В·м $= 8{,}72 \times 10^{-9}$ Кл/В·м при 25 °С. Подставив полученные значения, мы получаем $\psi = (9{,}65 \times 10^{-14})/(8{,}72 \times 10^{-9} \times \times 10^{-6}) = 11$ вольт. При этом разность электрических потенциалов, фактически регистрирующаяся в животных клетках, не превышает 0,1 вольт. Если предположить, что в нашей сферической клетке *K^+ содержится в обычной концентрации 100 ммоль/кг, его количество в нашей клетке должно составить* $(4/3)\,\pi\, r^3 \times 10^{-4} = 4{,}19 \times (10^{-4})^3 \times \times 10^{-4} = 4{,}19 \times 10^{-16}$ моль. Удаленное в нашем мысленном эксперименте количество калия (10^{-18} моль) составляет $10^{-18}/(4{,}19 \times 10^{-16}) = 2{,}39 \times 10^{-3}$, или всего лишь 0,239% от общего количества K^+ в клетке. Как видим, стремление системы к электронейтральности не позволит нам удалить из клетки даже ничтожное, казалось бы, количество зарядов.

Закон экономии мысли: см. Лезвие Оккама.

Золи: коллоидные системы с жидкой дисперсионной средой. Золи с водной средой называются гидрозолями, с органической средой — органозолями. Частицы дисперсной фазы золя (мицеллы) находятся в броуновском движении. При коагуляции лиофобные золи (то есть такие, для которых характерно слабое взаимодействие частиц со средой) превращаются в гели.

Зона высокой ассоциативной плотности: если взглянуть на кусочек сахара спустя некоторое время после того, как его обнаружат муравьи, то мы обнаружим, что чем ближе к сахару, тем плотнее территория вокруг него «заселена» муравьями. Сходная картина складывается и вокруг фиксированных анионов — чем ближе к аниону, тем плотнее пространство вокруг него заселено противоионами, например, K^+. Ближайшую к фиксированному заряду область назовем зоной высокой ассоциативной плотности.

Изомерия: явление, заключающееся в существовании веществ, одинаковых по составу и молекулярной массе, но различающихся по строению или расположению атомов в пространстве и вследствие этого — по физическим и химическим свойствам. Такие вещества называются изомерами.

Изотерма: закон связи между физическими величинами в равновесных процессах адсорбции при постоянной температуре.

Изотерма адсорбции: см. Изотерма адсорбции Ленгмюра.

Изотерма адсорбции Ленгмюра: изотермы адсорбции — кривые зависимости равновесного количества адсорбированного вещества от его давления или концентрации в объемной фазе при постоянной температуре. При адсорбции на твердых поверхностях часто рассматривают полное содержание адсорбированного вещества в поверхностном слое толщиной в одну молекулу (мономолекулярная адсорбция) или несколько (полимолекулярная адсорбция). Мономолекулярная адсорбция на однородных поверхностях из газовой фазы или раствора описывается уравнением Ирвинга Ленгмюра (Irving Langmuir, 1881—1957), предложенным в 1918 г. Для неоднородных поверхностей используют эмпирическое уравнение Фрейндлиха. Оба уравнения учитывают взаимодействие адсорбированных молекул между собой.

Изотерма многослойной адсорбции Брэдли: уравнение, предложенное Р. Брэдли в 1936 году и связывающее адсорбционную емкость мультислоя атомов или молекул газа (с неизменными дипольными моментами — например, водяного пара), сформировавшегося на полярных поверхностях, с изменениями парциального давления пара при постоянной температуре (уравнение А2 в приложении).

Иминогруппа: группа =N–H или =N–R, где R — радикал, не обладающий свойствами кислоты. Иминогруппа входит в состав пролина — единственной иминокислоты.

Индуктивный (индукционный) эффект: вид взаимного влияния атомов в молекуле, заключается в перераспределении электронной плотности в молекуле, при котором плотность электронов (плотность заряда) может измениться у ковалентной связи, на функциональной группе, на активном центре или на каком-либо рассматриваемом атоме. Наиболее сильное и медленно затухающее влияние оказывают заряженные заместители, например NR_3^+, SO_3-, O-. Индуктивное влияние заместителей на константы равновесия или скорости реакций выражается в изменении разностей свободных энергий $\delta\Delta G$ продуктов (или переходного состояния) и исходных веществ для замещенного соединения по сравнению со стандартным. Например, при диссоциации кислот RCOOH появляется отрицательный заряд *e* на атоме кислорода карбоксильной группы (–COO). Он взаимодействует с заместителем, несущим электрический заряд, на расстоянии *r* с энергией $\delta\Delta G = e^2 r^{-1}$. При наличии в молекуле полярного заместителя X, $\delta\Delta G$ зависит от величины электрического дипольного момента *m*, связи C—X, расстояния *r* между точкой локализации диполя связи (обычно в центре тяжести суммарного заряда валентных электронов) и реакционным центром, и угла Θ между направлениями *m* и *r*: $\delta\Delta G = -em\cos\Theta\, r^{-2}$. Индукционный эффект проявляется также в сдвиге электронов химических связей под действием внутримолекулярного электрического поля. Количественно он выражается величиной индуцированного дипольного момента m_i, которая пропорциональна поляризуемости связи σ при напряженности поля E: $m_i = \sigma E$. Индукционный эффект ведет к изменению полярности химических связей. В ряду CH_3Cl, CH_2Cl_2, $CHCl_3$ дипольные моменты соединений равны соответственно (в Кл • м): $6{,}23 \cdot 10^{-30}$; $4{,}63 \cdot 10^{-30}$; $3{,}50 \cdot 10^{-36}$. Увеличение размера легко поляризуемого углеводородного радикала обусловливает возрастание дипольного момента молекулы (в скобках приведены значения $m \cdot 10^{-30}$ в Кл • м): CH_3Cl (6,23), C_2H_5Cl (6,30), изо-C_3H_7Cl (6,68), трет-C_4H_9Cl (7,71). В результате индукционного эффекта электронная плотность на реакционном центре или индикаторном атоме может увеличиваться (положительный И. э., +I) или уменьшаться (отрицательный И. э., –I). Индукционный эффект заряженного заместителя определяется знаком заряда, положительно заряженный является акцептором электронов, то есть проявляет –I-эффект; отрицательно заряженный – донор (+I-эффект). Электроотрицательные группы обычно проявляют –I-эффект, а алкильные радикалы, Si–, Ge– и оловосодержащие группы и т. п. – +I-эффект. Однако при малых углах Θ возможен «обратный» индукционный эффект. Важную роль играют взаимодействия зарядов с индуцируемыми ими в углеводородных радикалах диполями. Они стабилизируют заряды любого знака и проявляются главным образом в газофазных реакциях протонирования и кислотной диссоциации. Возникновение дипольного момента молекулы под воздействием электрического поля реагента называется индуктомерным эффектом. В рамках формального подхода индуктивный эффект

количественно описывается индуктивными константами заместителей. Индуктивные константы положительны для электроноакцепторных заместителей, отрицательны для электронодонорных по сравнению со стандартом. При введении дополнительной метиленовой группы между заместителем (X) и реакционным центром индукционный эффект ослабляется приблизительно в 2,5 раза. На этом основаны представления о передаче индукционного эффекта по цепи атомов с равномерным ослаблением на каждом из них, что обозначается обычно стрелками на связях, указывающими направление сдвига электронов: $X \leftarrow CH_2 \leftarrow \leftarrow CH_2 \leftarrow CH_3$. Индукционный эффект — наиболее универсальный вид внутримолекулярных электронных взаимодействий. Учет его является необходимым при анализе мезомерных, стерических и других эффектов.

Индуктивный индекс Чиан-Тая: на первый взгляд, индуктивный индекс Чиан-Тая ничем не отличается от других постоянных индукции — констант индукции Гаммета (σ) или констант индукции Тафта (σ_I), так как тоже отражает относительную энергию индукции отдельных атомов в составе молекулы или функциональных групп. Однако на этом сходство заканчивается. Если параметры Гаммета и Тафта имеют исключительно эмпирическое происхождение (что существенно ограничивает их применение на практике), то Чиан и Тай предложили уравнения, которые позволяют рассчитывать индексы индукции, не прибегая к эксперименту. К примеру, получить опытным путем результаты исследований, сведенных в табл. 4, было бы затруднительно, даже невозможно, если бы не выдающееся достижение Чиан и Тая. Подробности см. в работе [509].

Интровертная модель белка: глобулярный белок, все или почти все карбонильные группы полипептидного остова которого участвуют в образовании водородных связей внутри молекулы (α-спирали, другие элементы вторичной структуры) и/или в межмолекулярных взаимодействиях с другими белками. Как правило, такой белок слабо взаимодействует с водой, так как именно пептидный остов с его способностью образовывать водородные связи является структурой, во многом определяющей сродство воды к белку.

Ионная связь, электровалентная связь: тип химической связи, энергия которой определяется почти исключительно кулоновскими силами притяжения противоположно заряженных ионов. Ионную связь можно рассматривать как предельный случай полярной ковалентной связи, образуемой атомами с сильно различающимися электроотрицательностями, что обуславливает почти полное смещение электронной пары связи в сторону одного из атомов (например, K^+Cl^-, Na^+Cl^-). В отличие от ковалентной связи, для ионной связи, вследствие ее электростатической природы, не характерны такие свойства, как направленность в пространстве и насыщаемость. Ненасыщенность ионной связи наиболее ярко проявляется в склонности соединений с этой связью к образованию кристаллических решеток, в узлах которых каждый ион окружен максимально возможным числом ионов противоположного заряда. Наиболее важное химическое отличие соединений с ионной связью от соединений с ковалентными связями — способность к диссоциации на ионы в растворах в полярных растворителях, обусловленная тем, что энергия сольватации ионов молекулами растворителя превышает энергию ионной связи в кристалле.

Ионная сила (I): интегральная характеристика раствора, учитывающая как концентрацию растворенных веществ, так и их заряд. Определяется как полусумма произведений моляльных (или молярных) концентраций всех ионов в растворе на квадрат их заряда. Предложена в 1921 году G. N. Lewis и M. Randall.

Искусственная модель: препарат клетки или ее органелл, или какие-либо структуры, воссозданные из искусственных материалов, неспособные к жизнедеятельности, но обладающие некоторыми свойствами «живых» структур, являющихся предметом изучения. Реальность того или иного свойства живой системы считается доказанной, если его удается получить на модельной системе.

Истинный активный транспорт: активный транспорт через биполярные слои клеток и другие похожие системы как он понимается в теории ассоциации-индукции (см. раздел 15.4).

Карбоксильная группа (карбоксил): $-COOH$ — функциональная одновалентная группировка, входящая в состав карбоновых кислот и определяющая их кислотные свойства (см. также β- и γ-карбоксильные группы).

Карбонильная группа: группа C=O, одна из двух составляющих пептидной связи (CO-NH). Линейная последовательность этих связей образует пептидный остов белков; также встречается в более простых соединениях (альдегиды, кетоны, карбоновые кислоты, амиды).

Карбонильный кислород: атом кислорода, входящий в состав карбонильной группы (C=O).

Кардинальный адсорбат: адсорбат (лиганд), связывающийся с тем или иным белком клетки и оказывающий ключевое влияние на характер метастабильного кооперативного состояния всех групп данного белка, на их функциональную активность.

Клеточная мембрана: согласно мембранной теории, каждая клетка покрыта фосфолипидным бислоем, в который встроены островки частично или полностью пронизывающих его белков, в числе которых и так называемые мембранные насосы. Новую версию этого понятия см. в гл. 13.

Коацерват: в определенных условиях (например, при повышении температуры, добавлении солей, гуммиарабика) растворенный коллоид самопроизвольно или в связи с другими полярными макромолекулами выходит из коллоидной системы с образованием отдельных капель, обогащенных коллоидом, четко отделенных от растворителя, в котором содержание рассматриваемого коллоида снижено. Фаза, обогащенная коллоидом, была названа коацерватом, а сам феномен — коацервацией в 1929 году Бунгенберг-де-Йонгом (H. G. Bungenber de Jong) и Крюйтом (H. R. Kruyt).

Коацервация: процесс, приводящий к образованию коацервата (см. Коацерват). Заключается в разделении гомогенного водного раствора на две несмешивающиеся фазы.

Колеблющаяся структура: пептидная группа в белках ($-CO-NH-$) находится в состоянии кето-енольной таутомерии (см. Таутомерия): кето-форма ($-CO-NH-$) и енольная форма ($-COH=N-$) с более короткой связью C=N по сравнению с C–N. Равновесие между формами устанавливается таким образом, что в каждый данный момент в кето-форме находится 60% пептидных связей, а в енольной форме — 40%. Таким образом, цепочка пептидных связей белков, остов молекулы, представляет собой колеблющуюся (резонансную) структуру.

Коллоид: термин, предложенный в 1861 году Томасом Грэмом (Thomas Graham) и происходящий от греческого слова, означающего клей или желатин. Был введен для обозначения желатиноподобных веществ, которым присуща медленная диффузия и отсутствие способности к кристаллообразованию (в отличие от кристаллоидов). Теперь термин «коллоиды» — синоним высокодисперсных (микрогетерогенных) систем, то есть дисперсных систем с наиболее развитой поверхностью раздела фаз. В этой связи, «коллоид» стали употреблять как синоним понятия «макромолекула», и потому он утратил самостоятельное значение, однако вновь приобрел его, когда Линг предложил новое определение коллоида (раздел 11.3, п. 2).

Коллоидная химия: традиционное название физической химии дисперсных систем и поверхностных явлений. Она изучает процессы и явления, обусловленные особенностями высокодисперсного состояния тел.

Комплексионы, Ω: количество равновероятных микросостояний молекулярного ансамбля. Диапазон равновероятных микросостояний определяется числом частиц в системе, их суммарной энергией и числом возможных квантованных энергетических уровней (более доступное описание см. в [98], p. 4–12).

Комплексный коацерват: коацерват, возникновение которого сопряжено с образованием солевых связей между входящими в его состав макромолекулами.

Конгруэнтный анион: анион, который преимущественно адсорбируется фиксированными катионами протоплазмы (см. Протоплазма) и играет вспомогательную роль в связывании других ионов.

Константа адсорбции: физическая адсорбция является обратимым процессом, равновесное состояние которого определяется равными скоростями адсорбции молекул адсорбтива (см. Адсорбат) и их десорбции, количеством и свойствами вакантных центров на поверхности адсорбента. Константа адсорбции характеризует равновесие, указывая на концентрацию адсорбтива в равновесных условиях: чем эта концентрация меньше, тем выше сродство адсорбента к адсорбтиву. Константа адсорбции — величина, обратная концентрации адсорбтива; единица измерения — $моль^{-1}$. К примеру, константа адсорбции АТФ миозином, одним из основных сократительных белков, составляет 10^{10}–10^{11} $моль^{-1}$ (то есть в условиях равновесия лишь ничтожная часть АТФ остается в свободном состоянии).

Константа Гаммета σ: эмпирическая константа, характеризующая относительную способность того или иного радикала, входящего в состав ароматического соединения, оказывать индуктивный эффект на другую функциональную группу той же молекулы, находящуюся на некотором удалении. Существует список таких констант для каждого конкретного случая индуктивного взаимодействия.

ественно описывается индуктивными антами заместителей. Индуктивные анты положительны для электроно-торных заместителей, отрицательны электронодонорных по сравнению со артом. При введении дополнительной еновой группы между заместителем реакционным центром индукцион-ффект ослабляется приблизительно в аза. На этом основаны представле-передаче индукционного эффекта по атомов с равномерным ослаблением ждом из них, что обозначается обычно ками на связях, указывающими на-ление сдвига электронов: $X \leftarrow CH_2 \leftarrow H_2 \leftarrow CH_3$. Индукционный эффект — олее универсальный вид внутримолеку-ых электронных взаимодействий. Учет вляется необходимым при анализе ме-рных, стерических и других эффектов.

вный индекс Чиан-Тая: на первый д, индуктивный индекс Чиан-Тая ни-не отличается от других постоянных кции — константы индукции Гаммета ли констант индукции Тафта (σ_I), так оже отражает относительную энергию кции отдельных атомов в составе моле-или функциональных групп. Однако ом сходство заканчивается. Если па-тры Гаммета и Тафта имеют исклю-льно эмпирическое происхождение (что ственно ограничивает их применение рактике), то Чиан и Тай предложили нения, которые позволяют рассчи-ть индексы индукции, не прибегая к ерименту. К примеру, получить опыт-путем результаты исследований, све-ых в табл. 4, было бы затруднительно, невозможно, если бы не выдающееся ижение Чиан и Тая. Подробности см. боте [509].

отная модель белка: глобулярный бе-все или почти все карбонильные груп-олипептидного остова которого уча-от в образовании водородных связей ри молекулы (α-спирали, другие эле-ы вторичной структуры) и/или в меж-кулярных взаимодействиях с другими ами. Как правило, такой белок слабо модействует с водой, так как именно идный остов с его способностью обра-вать водородные связи является струк-й, во многом определяющей сродство к белку.

связь, электровалентная связь: тип ческой связи, энергия которой опреде-ся почти исключительно кулоновскими ми притяжения противоположно за-ряженных ионов. Ионную связь можно рассматривать как предельный случай полярной ковалентной связи, образуемой атомами с сильно различащимися электроотрицательностями, что обуславливает почти полное смещение электронной пары связи в сторону одного из атомов (например, K^+Cl^-, Na^+Cl^-). В отличие от ковалентной связи, для ионной связи, вследствие ее электростатической природы, не характерны такие свойства, как направленность в пространстве и насыщаемость. Ненасыщенность ионной связи наиболее ярко проявляется в склонности соединений с этой связью к образованию кристаллических решеток, в узлах которых каждый ион окружен максимально возможным числом ионов противоположного заряда. Наиболее важное химическое отличие соединений с ионной связью от соединений с ковалентными связями — способность к диссоциации на ионы в растворах в полярных растворителях, обусловленная тем, что энергия сольватации ионов молекулами растворителя превышает энергию ионной связи в кристалле.

Ионная сила (I): интегральная характеристика раствора, учитывающая как концентрацию растворенных веществ, так и их заряд. Определяется как полусумма произведений моляльных (или молярных) концентраций всех ионов в растворе на квадрат их заряда. Предложена в 1921 году G. N. Lewis и M. Randall.

Искусственная модель: препарат клетки или ее органелл, или какие-либо структуры, воссозданные из искусственных материалов, неспособные к жизнедеятельности, но обладающие некоторыми свойствами «живых» структур, являющихся предметом изучения. Реальность того или иного свойства живой системы считается доказанной, если его удается получить на модельной системе.

Истинный активный транспорт: активный транспорт через биполярные слои клеток и другие похожие системы как он понимается в теории ассоциации-индукции (см. раздел 15.4).

Карбоксильная группа (карбоксил): $-COOH$ — функциональная одновалентная группировка, входящая в состав карбоновых кислот и определяющая их кислотные свойства (см. также β- и γ-карбоксильные группы).

Карбонильная группа: группа C=O, одна из двух составляющих пептидной связи (CO-NH). Линейная последовательность этих связей образует пептидный остов белков; также встречается в более простых соединениях (альдегиды, кетоны, карбоновые кислоты, амиды).

Карбонильный кислород: атом кислорода, входящий в состав карбонильной группы (C=O).

Кардинальный адсорбат: адсорбат (лиганд), связывающийся с тем или иным белком клетки и оказывающий ключевое влияние на характер метастабильного кооперативного состояния всех групп данного белка, на их функциональную активность.

Клеточная мембрана: согласно мембранной теории, каждая клетка покрыта фосфолипидным бислоем, в который встроены островки частично или полностью пронизывающих его белков, в числе которых и так называемые мембранные насосы. Новую версию этого понятия см. в гл. 13.

Коацерват: в определенных условиях (например, при повышении температуры, добавлении солей, гуммиарабика) растворенный коллоид самопроизвольно или в связи с другими полярными макромолекулами выходит из коллоидной системы с образованием отдельных капель, обогащенных коллоидом, четко отделенных от растворителя, в котором содержание рассматриваемого коллоида снижено. Фаза, обогащенная коллоидом, была названа коацерватом, а сам феномен — коацервацией в 1929 году Бунгенберг-де-Йонгом (H. G. Bungenber de Jong) и Крюйтом (H. R. Kruyt).

Коацервация: процесс, приводящий к образованию коацервата (см. Коацерват). Заключается в разделении гомогенного водного раствора на две несмешивающиеся фазы.

Колеблющаяся структура: пептидная группа в белках ($-CO-NH-$) находится в состоянии кето-енольной таутомерии (см. Таутомерия): кето-форма ($-CO-NH-$) и енольная форма ($-COH=N-$) с более короткой связью C=N по сравнению с C–N. Равновесие между формами устанавливается таким образом, что в каждый данный момент в кето-форме находится 60% пептидных связей, а в енольной форме — 40%. Таким образом, цепочка пептидных связей белков, остов молекулы, представляет собой колеблющуюся (резонансную) структуру.

Коллоид: термин, предложенный в 1861 году Томасом Грэмом (Thomas Graham) и происходящий от греческого слова, означающего клей или желатин. Был введен для обозначения желатиноподобных веществ, которым присуща медленная диффузия и отсутствие способности к кристаллообразованию (в отличие от кристаллоидов). Теперь термин «коллоиды» — синоним высокодисперсных (микрогетерогенных) систем, то есть дисперсных систем с наиболее развитой поверхностью раздела фаз. В этой связи, «коллоид» стали употреблять как синоним понятию «макромолекула», и потому он утратил самостоятельное значение, однако вновь приобрел его, когда Линг предложил новое определение коллоида (раздел 11.3, п. 2).

Коллоидная химия: традиционное название физической химии дисперсных систем и поверхностных явлений. Она изучает процессы и явления, обусловленные особенностями высокодисперсного состояния тел.

Комплексионы, Ω: количество равновероятных микросостояний молекулярного ансамбля. Диапазон равновероятных микросостояний определяется числом частиц в системе, их суммарной энергией и числом возможных квантованных энергетических уровней (более доступное описание см. в [98], p. 4–12).

Комплексный коацерват: коацерват, возникновение которого сопряжено с образованием солевых связей между входящими в его состав макромолекулами.

Конгруэнтный анион: анион, который преимущественно адсорбируется фиксированными катионами протоплазмы (см. Протоплазма) и играет вспомогательную роль в связывании других ионов.

Константа адсорбции: физическая адсорбция является обратимым процессом, равновесное состояние которого определяется равными скоростями адсорбции молекул адсорбтива (см. Адсорбат) и их десорбции, количеством и свойствами вакантных центров на поверхности адсорбента. Константа адсорбции характеризует равновесие, указывая на концентрацию адсорбтива в равновесных условиях: чем эта концентрация меньше, тем выше сродство адсорбента к адсорбтиву. Константа адсорбции — величина, обратная концентрации адсорбтива; единица измерения — $моль^{-1}$. К примеру, константа адсорбции АТФ миозином, одним из основных сократительных белков, составляет 10^{10}–10^{11} $моль^{-1}$ (то есть в условиях равновесия лишь ничтожная часть АТФ остается в свободном состоянии).

Константа Гаммета σ: эмпирическая константа, характеризующая относительную способность того или иного радикала, входящего в состав ароматического соединения, оказывать индуктивный эффект на другую функциональную группу той же молекулы, находящуюся на некотором удалении. Существует список таких констант для каждого конкретного случая индуктивного взаимодействия.

Константа индукции Тафта (индуктивные константы Тафта): список эмпирически определенных констант радикалов алифатических соединений, представленный Робертом Тафтом (R. W. Taft) в 1953 году. Индуктивные константы Тафта вычисляют из констант скорости гидролиза сложных эфиров XCOOR, где X — полярный заместитель, R — углеводородный радикал, COO — карбоксилатная группа.

Константа связывания: постоянная, характеризующая интенсивность связывания лиганда с центром связывания. Равна обратной концентрации свободного лиганда, когда в условиях равновесия занята половина всех имеющихся на поверхности сорбента центров связывания. Чем выше константа связывания, тем ниже концентрация лиганда, при которой сорбент способен его связывать, то есть тем выше сродство центров связывания к данному лиганду.

Конформация «клубок»: предельное конформационное состояние белка, наблюдаемое при полном разворачивании белковой глобулы в результате действия денатурирующих факторов. В состоянии клубка отсутствуют внутримолекулярные и межмолекулярные водородные связи, следовательно, клубок не содержит элементов вторичной структуры и не образует агрегатов с другими клубками.

Кооперативная система белок-ион-вода: комплекс молекулы белка с ионами и водой, состояние каждого компонента в котором определяется состоянием остальных элементов по кооперативному механизму.

Кооперативная система: система, свойства которой определяются всей совокупностью входящих в нее элементов (атомов и молекул), взаимодействующих по определенному закону. Система взаимодействий и закон их организации исключает возможность объяснения свойств системы суммой свойств отдельных компонентов.

Кооперативно связанные: элементы системы, взаимодействующие друг с другом таким образом, что активно влияют на свойства друг друга, усиливая или ослабляя взаимодействие между собой.

Кооперативный адсорбционно-десорбционный насос: предложенная Лингом в 1965 году теоретическая модель, согласно которой автокооперативная адсорбция и десорбция, протекающая по закону «все или ничего», играет определяющую роль в активном транспорте ионов и других растворенных веществ через бифациальные клеточные пласты.

Коэффициент вращательной диффузии: вращательная диффузия — вращательное движение атомов, молекул или их фрагментов, обусловленное тепловым движением. Зависит от микровязкости среды и от взаимодействий различных типов с другими атомами и молекулами. Методы измерения и расчетов коэффициента вращательной диффузии см. в работе [166, p. 929].

Коэффициент диффузии: количество вещества (*кг*), проходящего в единицу времени (*с*) через участок площадью 1 м^2 при градиенте концентрации, равном единице (1 М → 0 М). Коэффициент диффузии является мерой ее скорости, которая, в свою очередь, определяется свойствами среды.

Коэффициент затухания индуктивного эффекта: число (в долях 1, или в %), отражающее затухание индуктивного эффекта, вызываемое отдельным атомом (или функциональной группой) в молекуле.

Коэффициент пропорциональности в уравнении Трошина: коэффициент K в ур. A1 (приложение), предложенный А. С. Трошиным и соответствующий *коэффициенту распределения* в законе распределения Бертло-Нернста, а также *равновесному коэффициенту распределения*, или *величине q*, в теории ассоциации-индукции. См. Величина *q*.

Коэффициент равновесного распределения веществ между клеткой (моделью) и средой: истинным коэффициентом равновесного распределения (q) называется отношение концентрации вещества, растворенного во внутриклеточной воде (или в воде модельной системы), к его концентрации в окружающей среде после достижения диффузионного равновесия и при условии, что это вещество находится в клетке в свободном состоянии. Если же часть вещества адсорбируется на внутриклеточных структурах, концентрируется в везикулах или в других компартментах, пользуются понятием «кажущийся коэффициент равновесного распределения» (ρ). Он может быть равен q по величине или превышать его, но не может быть меньше его.

Коэффициент распределения в системе оливковое масло/вода: вещество, помещенное в двухфазную систему растворяется неодинаково в водной и в масляной фазах. Отношение концентрации вещества в верхней фазе (масло), C_1, к его концентрации в нижней фазе, C_2, называется коэффициентом распределения вещества между фазами: $P = C_1/C_2$.

Кристаллоид: введенное в 1861 году Томасом Грэмом (Thomas Graham) собирательное название сахаров, солей и других молекул, для которых характерна быстрая диффузия в водных растворах, а также способность при определенных условиях образовывать кристаллы.

КС-электрод: стеклянный электрод, покрытый окисленным коллодием.

Лезвие Оккама: философский принцип, согласно которому из множества возможных объяснений естественно-научного явления следует выбирать наиболее простое (не нагромождай сущностей). Так, из нескольких альтернативных теорий следует выбирать наиболее простую. А также: неизвестное следует пытаться объяснить в первую очередь известным.

Лиганд: атом, ион, молекула или ее функциональная группа, взаимодействующая с комплементарным участком определенной структуры, обычно макромолекулы или макромолекулярного комплекса. Например, кислород является лигандом для гемоглобина. Чаще всего такое связывание происходит с образованием так называемой «координационной» донорно-акцепторной связи, где лиганды выступают в роли основания Льюиса, то есть являются донорами электронной пары. При присоединении лигандов химические свойства комплексообразователя и самих лигандов часто претерпевают значительные изменения. Лиганды могут быть и антагонистами и агонистами (или ни тем ни другим).

Линейная конформация: полноразвернутая конформация полимерной цепи, лишенная элементов вторичной структуры. Обычно относится к белкам и другим макромолекулам, способным к разнообразным конформационным состояниям. См. Полноразвернутая конформация.

Линейная модель: цепь пептидных групп белка, комплементарных молекуле воды, является структурной основой линейной модели. См. Теория многослойной организации поляризованной воды (теория МОПВ).

Линейный белок: белок с полностью развернутой конформацией, не содержащий элементов вторичной структуры. Значение такой конформации см. Теория многослойной организации поляризованной воды (теория МОПВ).

Линейный полимер: макромолекула, неспособная принимать никаких конформаций, кроме линейной, не содержит элементов вторичной структуры. Значение такой конформации см. Теория многослойной организации поляризованной воды (теория МОПВ).

Локализованная адсорбция: связывание ионов или незаряженных молекул конкретной функциональной группой белка (или какого-либо другого адсорбента) при непосредственном физическом взаимодействии между ними. Идея, предложенная Ирвингом Ленгмюром (Irving Langmuir) в 1916—1918 годах, согласно которой адсорбируемое вещество не просто оседает на однородную поверхность адсорбента. Напротив, поверхность адсорбента обладает структурой, элементы которой отличаются по свойствам. Поэтому адсорбция происходит лишь на особых участках поверхности твердых тел.

Макроэргическая фосфатная связь: представление, согласно которому некоторые фосфорорганические соединения, например, АТФ, содержат в фосфатных связях особенно большое количество энергии, высвобождаемое при их гидролизе (от −12 до −16 ккал/моль), и используемое во всех биохимических процессах, протекающих в живых системах. Однако в 1956 году Подольский (Podolsky) и Моралес (Morales) показали, что энтальпия фосфатной связи в АТФ составляет всего лишь −4,7 ккал/моль, что сводит на нет различие между макроэргическими и обычными фосфатными связями, такими, как в АМФ (см. гл. 12).

Межклеточное пространство: пространство, отделяющее клетки друг от друга. Обычно заполнено тканевой жидкостью, а в эксперименте — раствором Рингера или другими экспериментальными средами.

Межфазный потенциал: устойчивая разность электрических потенциалов между граничащими между собой фазами.

Мембранная теория: теория, объясняющая четыре фундаментальных свойства клетки свойствами плазматической мембраны. К этим фундаментальным свойствам относятся следующие: 1) полупроницаемость клетки (одни вещества легко проникают в клетку, другие труднее, третьи практически в нее не проникают); 2) неравномерное распределение веществ, ионов, например, K^+ и Na^+, между клеткой и средой: одних больше в клетке, чем в среде, других — наоборот меньше (свойство избирательности); 3) способность клетки генерировать электрические потенциалы (потенциал покоя и действия); и 4) способность клетки поддерживать осмотическое равновесие со средой (осмотические свойства). Принципиальные положения этой теории были заложены в XIX веке.

Метод «нулевой точки»: способ определения количества воды, адсорбированной на белке

анта индукции Тафта (индуктивные кон-анты Тафта): список эмпирически опре-ленных констант радикалов алифатиче-их соединений, представленный Робертом афтом (R. W. Taft) в 1953 году. Индуктивные онстанты Тафта вычисляют из констант орости гидролиза сложных эфиров COOR, где X — полярный заместитель, — углеводородный радикал, COO — рбоксилатная группа.

анта связывания: постоянная, характери-ующая интенсивность связывания лиган-с центром связывания. Равна обратной онцентрации свободного лиганда, когда условиях равновесия занята половина ех имеющихся на поверхности сорбента ентров связывания. Чем выше константа язывания, тем ниже концентрация лиган-, при которой сорбент способен его свя-ывать, то есть тем выше сродство центров язывания к данному лиганду.

ормация «клубок»: предельное конформа-ионное состояние белка, наблюдаемое при олном разворачивании белковой глобулы результате действия денатурирующих акторов. В состоянии клубка отсутствуют нутримолекулярные и межмолекулярные одородные связи, следовательно, клубок е содержит элементов вторичной струк-уры и не образует агрегатов с другими лубками.

ративная система белок-ион-вода: ком-лекс молекулы белка с ионами и водой, остояние каждого компонента в котором пределяется состоянием остальных эле-ентов по кооперативному механизму.

ративная система: система, свойства кото-ой определяются всей совокупностью вхо-ящих в нее элементов (атомов и молекул), заимодействующих по определенному за-ону. Система взаимодействий и закон их рганизации исключает возможность объ-снения свойств системы суммой свойств тдельных компонентов.

ративно связанные: элементы системы, заимодействующие друг с другом таким бразом, что активно влияют на свойства руг друга, усиливая или ослабляя взаимо-ействие между собой.

ративный адсорбционно-десорбционный асос: предложенная Лингом в 1965 году еоретическая модель, согласно которой втокооперативная адсорбция и десорбция, ротекающая по закону «все или ничего», играет определяющую роль в активном ранспорте ионов и других растворенных еществ через бифациальные клеточные ласты.

Коэффициент вращательной диффузии: вращательная диффузия — вращательное движение атомов, молекул или их фрагментов, обусловленное тепловым движением. Зависит от микровязкости среды и от взаимодействий различных типов с другими атомами и молекулами. Методы измерения и расчетов коэффициента вращательной диффузии см. в работе [166, p. 929].

Коэффициент диффузии: количество вещества (*кг*), проходящего в единицу времени (*с*) через участок площадью 1 м^2 при градиенте концентрации, равном единице (1 М → 0 М). Коэффициент диффузии является мерой ее скорости, которая, в свою очередь, определяется свойствами среды.

Коэффициент затухания индуктивного эффекта: число (в долях 1, или в %), отражающее затухание индуктивного эффекта, вызываемое отдельным атомом (или функциональной группой) в молекуле.

Коэффициент пропорциональности в уравнении Трошина: коэффициент K в ур. A1 (приложение), предложенный А. С. Трошиным и соответствующий *коэффициенту распределения* в законе распределения Бертло-Нернста, а также *равновесному коэффициенту распределения*, или *величине q*, в теории ассоциации-индукции. См. Величина *q*.

Коэффициент равновесного распределения веществ между клеткой (моделью) и средой: истинным коэффициентом равновесного распределения (q) называется отношение концентрации вещества, растворенного во внутриклеточной воде (или в воде модельной системы), к его концентрации в окружающей среде после достижения диффузионного равновесия и при условии, что это вещество находится в клетке в свободном состоянии. Если же часть вещества адсорбируется на внутриклеточных структурах, концентрируется в везикулах или в других компартментах, пользуются понятием «кажущийся коэффициент равновесного распределения» (ρ). Он может быть равен q по величине или превышать его, но не может быть меньше его.

Коэффициент распределения в системе оливковое масло/вода: вещество, помещенное в двухфазную систему растворяется неодинаково в водной и в масляной фазах. Отношение концентрации вещества в верхней фазе (масло), C_1, к его концентрации в нижней фазе, C_2, называется коэффициентом распределения вещества между фазами: $P = C_1/C_2$.

Кристаллоид: введенное в 1861 году Томасом Грэмом (Thomas Graham) собирательное название сахаров, солей и других молекул, для которых характерна быстрая диффузия в водных растворах, а также способность при определенных условиях образовывать кристаллы.

КС-электрод: стеклянный электрод, покрытый окисленным коллодием.

Лезвие Оккама: философский принцип, согласно которому из множества возможных объяснений естественно-научного явления следует выбирать наиболее простое (не нагромождай сущностей). Так, из нескольких альтернативных теорий следует выбирать наиболее простую. А также: неизвестное следует пытаться объяснить в первую очередь известным.

Лиганд: атом, ион, молекула или ее функциональная группа, взаимодействующая с комплементарным участком определенной структуры, обычно макромолекулы или макромолекулярного комплекса. Например, кислород является лигандом для гемоглобина. Чаще всего такое связывание происходит с образованием так называемой «координационной» донорно-акцепторной связи, где лиганды выступают в роли основания Льюиса, то есть являются донорами электронной пары. При присоединении лигандов химические свойства комплексообразователя и самих лигандов часто претерпевают значительные изменения. Лиганды могут быть и антагонистами и агонистами (или ни тем ни другим).

Линейная конформация: полноразвернутая конформация полимерной цепи, лишенная элементов вторичной структуры. Обычно относится к белкам и другим макромолекулам, способным к разнообразным конформационным состояниям. См. Полноразвернутая конформация.

Линейная модель: цепь пептидных групп белка, комплементарных молекуле воды, является структурной основой линейной модели. См. Теория многослойной организации поляризованной воды (теория МОПВ).

Линейный белок: белок с полностью развернутой конформацией, не содержащий элементов вторичной структуры. Значение такой конформации см. Теория многослойной организации поляризованной воды (теория МОПВ).

Линейный полимер: макромолекула, неспособная принимать никаких конформаций, кроме линейной, не содержит элементов вторичной структуры. Значение такой конформации см. Теория многослойной организации поляризованной воды (теория МОПВ).

Локализованная адсорбция: связывание ионов или незаряженных молекул конкретной функциональной группой белка (или какого-либо другого адсорбента) при непосредственном физическом взаимодействии между ними. Идея, предложенная Ирвингом Ленгмюром (Irving Langmuir) в 1916—1918 годах, согласно которой адсорбируемое вещество не просто оседает на однородную поверхность адсорбента. Напротив, поверхность адсорбента обладает структурой, элементы которой отличаются по свойствам. Поэтому адсорбция происходит лишь на особых участках поверхности твердых тел.

Макроэргическая фосфатная связь: представление, согласно которому некоторые фосфорорганические соединения, например, АТФ, содержат в фосфатных связях особенно большое количество энергии, высвобождаемое при их гидролизе (от −12 до −16 ккал/моль), и используемое во всех биохимических процессах, протекающих в живых системах. Однако в 1956 году Подольский (Podolsky) и Моралес (Morales) показали, что энтальпия фосфатной связи в АТФ составляет всего лишь −4,7 ккал/моль, что сводит на нет различие между макроэргическими и обычными фосфатными связями, такими, как в АМФ (см. гл. 12).

Межклеточное пространство: пространство, отделяющее клетки друг от друга. Обычно заполнено тканевой жидкостью, а в эксперименте — раствором Рингера или другими экспериментальными средами.

Межфазный потенциал: устойчивая разность электрических потенциалов между граничащими между собой фазами.

Мембранная теория: теория, объясняющая четыре фундаментальных свойства клетки свойствами плазматической мембраны. К этим фундаментальным свойствам относятся следующие: 1) полупроницаемость клетки (одни вещества легко проникают в клетку, другие труднее, третьи практически в нее не проникают); 2) неравномерное распределение веществ, ионов, например, K^+ и Na^+, между клеткой и средой: одних больше в клетке, чем в среде, других — наоборот меньше (свойство избирательности); 3) способность клетки генерировать электрические потенциалы (потенциал покоя и действия); и 4) способность клетки поддерживать осмотическое равновесие со средой (осмотические свойства). Принципиальные положения этой теории были заложены в XIX веке.

Метод «нулевой точки»: способ определения количества воды, адсорбированной на белке

или полимере при давлении водяного пара, близком к насыщению. Предложен Лингом и Ху в 1987 году [163].

Метод зарядов Борна: способ оценки энергии связывания фиксированного иона со свободным противоионом, предложенный физиком Максом Борном (M. Born) в 1920 г. и заключающийся в измерении работы, необходимой для перемещения противоиона из бесконечности в точку пространства, в которой взаимодействие с фиксированным зарядом реализуется в полной мере.

Метод центрифугирования по Лингу-Уолтон: метод, предложенный Лингом и Уолтон в 1975 году, который позволяет быстро и просто удалить межклеточную жидкость из портняжной мышцы или иного пучка мышечных волокон. Мышца центрифугируется в специальной герметичной капсуле в течение 4 минут с ускорением 1000 g.

Микроэлектрод Джерарда-Грэхем-Линга: стеклянный капиллярный микроэлектрод, ранее также известный под названием микроэлектрода Линга-Джерарда. Джудит Грэхем (Judit Graham), Карлсон (G. R. Carlson) и Ральф Джерард (R. W. Gerard) в 1942 году первыми описали измерение потенциала покоя мышечных клеток лягушки при помощи стеклянного капиллярного микроэлектрода. Однако война помешала усовершенствовать этот метод. Еще в 1946 году, по данным диссертации Грэхем, величина потенциала покоя оценивалась на этом объекте в широких пределах: от 41 до 80 мВ, что свидетельствовало о качественном, а не количественном характере измерений. Задача усовершенствования техники изготовления микроэлектродов и их заполнения растворами солей была поручена Гильберту Лингу, начинающему аспиранту профессора Ральфа Джерарда. В результате его исследований микроэлектродная техника стала количественным методом уже в 1947 году. Согласно сообщениям Линга и Джерарда в 1949 году, величина потенциала покоя упомянутых клеток составила 78,4 $\pm$ 5,3 мВ (1350 измерений электродами, заполненными раствором Рингера), и 97,6 $\pm$ 5,7 мВ (207 измерений электродами, заполненными трехмолярным раствором KCl). Разработанный метод позволял проводить точные измерения электрических потенциалов различных клеток, и даже клеточных органелл. (Подробности см. [88], p. 441—443).

Миозин: фибриллярный белок, один из главных компонентов сократительных волокон мышц — миофибрилл; составляет 40–60% общего количества мышечных белков. При соединении М. с другим белком миофибрилл — актином — образуется актомиозин — основной структурный элемент сократительной системы мышц. Другое важное свойство М. — способность расщеплять аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ) (В. А. Энгельгардт и М. Н. Любимова, 1939). Благодаря АТФ-азной активности М. химическая энергия макроэргических связей АТФ превращается в механическую энергию мышечного сокращения (см. Макроэргическая фосфатная связь). Молекулярная масса М. около 500 000. При действии протеолитических ферментов М. распадается на фрагменты — тяжёлый меромизоин и лёгкий меромиозин (молекулярная масса около 350 000 и около 150 000). На электронных микрофотографиях молекулы М. имеют вид палочек (1600 $\times$ 25 Å) с двумя глобулярными образованиями на одном из концов. Полагают, что 2 полипептидные цепи, образующие М., скручены в спираль. Белки, аналогичные М., обнаружены в жгутиках, ресничках и других двигательных структурах у многих простейших и бактерий, сперматозоидов животных и некоторых растений.

Миозин В: устаревшее название актомиозина. При экстрагировании сократительных белков растворами с высокой ионной силой, первым экстрагируется миозин (устаревшее название – миозин А). При более длительной экстракции, в экстрагирующем растворе появляется актин, который начинает соединяться с ранее вышедшим в раствор миозином в комплекс актомиозин (миозин В).

Миофибриллы: сократимые нити в цитоплазме поперечнополосатых мышечных волокон скелетной мускулатуры, сердечной мышцы и мышц с двойной косой исчерченностью. Диаметр М. от 0,5 до нескольких мкм. В поперечном сечении М. округлы, угловаты или овальны. Основную массу М. составляют тончайшие белковые нити — миофиламенты двух типов — толстые миозиновые (состоят главным образом из миозина, длина их около 1500 нм, диаметр 10–15 нм) и тонкие актиновые (состоят в основном из актина, длина их 1000–1100 нм, диаметр 5–8 нм). Имеются в М. и другие белки: тропомиозин В (в тонких миофиламентах мышц всех типов) и тропомиозин А, или парамиозин (в толстых миофиламентах мышц с двойной косой исчерченностью), а также α- и β-актинины, тропонин и др. Тонкие миофиламенты прикрепляются к т. н. Z-мембране, являющейся границей между саркомерами. Толстые миофиламенты образуют плотный, обладающий двойным лучепреломлением участок, называемый диском А. Толстые и тонкие миофиламенты частично перекрываются («зона перекрывания»). Участок саркомера по обе стороны от Z-мембраны, содержащий лишь тонкие миофиламенты, называется I-диском. Центральная зона А-диска, не содержащая тонких миофиламентов, называется Н-диском; в его центре обычно видна М-полоса, состоящая из коротких (40 нм) М-нитей; длина их соответствует ширине М-полосы. С обеих сторон от М-полосы расположен субдиск Н — узкая зона (~130 нм), более светлая, чем остальной Н-диск. Толстые миофиламенты имеют по всей длине равномерно расположенные отростки, представляющие собой головки миозиновых молекул. Середина толстых миофибрилл лишена отростков, чем и обусловлено возникновение светлой зоны (Н-субдиска). Предполагается существование миофиламентов третьего типа — сверхтонких нитей, напрямую соединяющих между собой Z-мембраны и придающие саркомеру механическую целостность, независящую от того, взаимодействуют между собой сократительные филаменты или нет.

Многоатомный ион де факто: ион Na^+ сам по себе представляет один атом. Однако в растворе он подвергается гидратации, в результате которой вокруг него образуется относительно устойчивая гидратная оболочка, всегда следующая за ионом и существенно влияющая на его поведение в растворе. В результате можно говорить о новой реальности – о многоатомном ионе.

Модель Изинга (одномерная): предельно упрощенная модель магнетика в виде системы магнитных диполей (спинов), расположенных на одной линии, подобно бусинкам в ожерелье. Каждый диполь в этой модели взаимодействует только с соседним диполем. Магнитные моменты в такой системе ориентируются параллельно (вдоль нити ожерелья), согласно ориентации одного (закрепленного) диполя. В системе наблюдаются кооперативные явления и фазовые переходы. Инверсия ориентации закрепленного диполя приводит к ее инверсии для всех диполей системы (кооперативный эффект). При превышении некоторой критической температуры (называемой точкой Кюри), параллельная ориентация утрачивается и происходит фазовый переход (второго рода): от упорядоченного (намагниченного) состояния к беспорядочному (парамагнитному). Модель впервые была предложена Эрнстом Изингом (1900–1998) в 1925 году [353].

Модельные ионы для K^+: катионы, обладающие свойствами, близкими к K^+, например Rb^+ и Cs^+, а также Tl^+.

Молекулярный объем: см. Молярный объем.

Молярный объем: парциальный молярный объем — часть объема, занятого веществом, входящим в состав смеси веществ. В смеси объемом V, содержащей n_1 моль вещества 1 и n_2 молей вещества 2, $V = n_1V_1 + n_2V_2$, где V_1 – парциальный молярный объем вещества 1, а V_2 – парциальный молярный объем вещества 2. Молярный объём — объём одного моля вещества, величина, получающаяся от деления молярной массы (масса, выраженная в граммах, численно равная атомной или молекулярной массе вещества) на плотность. Характеризует плотность упаковки атомов. Для идеального газа, при нормальных условиях, эта величина имеет универсальное значение 22,4 л/моль, однако молярный объем реальных газов всегда отличается от этой величины. Поэтому вся информация о молярном объёме химических элементов относится к их твердой фазе, если не оговорено иное.

Моноволоконный сахарозный метод определения межклеточного пространства: предложен Лингом, Уилл и Шеннон. Заключается в сравнении количества меченной радиоизотопом сахарозы, «прилепающей» к одиночным мышечным волокнам, к которым неприменимо понятие межклеточного пространства, с количеством сахарозы, удерживаемой целой мышцей. Размер межклеточного пространства получаем вычитанием первой величины из второй.

Напряжение вытеснения (U_{vp}): величина, отражающая интегральную способность поляризованной воды вытеснять растворенные в ней вещества. Равна сумме объемных компонентов свободной энергии и энтропии [168, p. 152—157]. Физический смысл параметра в том, что работа, совершаемая для перемещения молекулы растворенного вещества из бесконечности в структурированную воду клетки больше, чем в объемную, неструктурированную.

Нативный белок: белок, находящийся в природном состоянии, не модифицированный, сохранивший структуру, присущую ему в живой клетке. Однако часто (видимо, для большей определенности) под нативным белком стали понимать белок в его кристаллическом состоянии. Тем не менее, существуют данные, согласно которым основная часть белков в интактных клетках отличается своей конформацией от конфор-

полимере при давлении водяного пара, ком к насыщению. Предложен Лингом в 1987 году [163].

арядов Борна: способ оценки энергии ывания фиксированного иона со сво- ым противоионом, предложенный фи- ом Максом Борном (M. Born) в 1920 г. ключающийся в измерении работы, не- одимой для перемещения противоиона бесконечности в точку пространства, в рой взаимодействие с фиксированным дом реализуется в полной мере.

ентрифугирования по Лингу-Уолтон: од, предложенный Лингом и Уолтон 975 году, который позволяет быстро и сто удалить межклеточную жидкость портняжной мышцы или иного пучка шечных волокон. Мышца центрифугиру- в специальной герметичной капсуле в ение 4 минут с ускорением 1000 g.

лектрод Джерарда-Грэхем-Линга: стек- ный капиллярный микроэлектрод, ранее же известный под названием микроэлек- да Линга-Джерарда. Джудит Грэхем lit Graham), Карлсон (G. R. Carlson) и ьф Джерард (R. W. Gerard) в 1942 году выми описали измерение потенциала оя мышечных клеток лягушки при помо- стеклянного капиллярного микроэлект- а. Однако война помешала усовершен- овать этот метод. Еще в 1946 году, по ным диссертации Грэхем, величина по- циала покоя оценивалась на этом объек- широких пределах: от 41 до 80 мВ, что детельствовало о качественном, а не ко- ественном характере измерений. Задача вершенствования техники изготовления кроэлектродов и их заполнения раство- ли солей была поручена Гильберту Лингу, инающему аспиранту профессора Раль- Джерарда. В результате его исследо- ий микроэлектродная техника стала ичественным методом уже в 1947 году. гласно сообщениям Линга и Джерарда 949 году, величина потенциала покоя мянутых клеток составила 78,4 ± 5,3 мВ 50 измерений электродами, заполнен- ми раствором Рингера), и 97,6 ± 5,7 мВ 7 измерений электродами, заполненными хмолярным раствором KCl). Разрабо- ный метод позволял проводить точные ерения электрических потенциалов раз- ных клеток, и даже клеточных органелл. дробности см. [88], p. 441—443).

: фибриллярный белок, один из глав- компонентов сократительных волокон шц — миофибрилл; составляет 40–60% его количества мышечных белков. При соединении М. с другим белком миофибрилл — актином — образуется актомиозин — основной структурный элемент сократительной системы мышц. Другое важное свойство М. — способность расщеплять аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ) (В. А. Энгельгардт и М. Н. Любимова, 1939). Благодаря АТФ-азной активности М. химическая энергия макроэргических связей АТФ превращается в механическую энергию мышечного сокращения (см. Макроэргическая фосфатная связь). Молекулярная масса М. около 500 000. При действии протеолитических ферментов М. распадается на фрагменты — тяжёлый меромизоин и лёгкий миромиозин (молекулярная масса около 350 000 и около 150 000). На электронных микрофотографиях молекулы М. имеют вид палочек (1600 × 25 Å) с двумя глобулярными образованиями на одном из концов. Полагают, что 2 полипептидные цепи, образующие М., скручены в спираль. Белки, аналогичные М., обнаружены в жгутиках, ресничках и других двигательных структурах у многих простейших и бактерий, сперматозоидов животных и некоторых растений.

Миозин В: устаревшее название актомиозина. При экстрагировании сократительных белков растворами с высокой ионной силой, первым экстрагируется миозин (устаревшее название – миозин А). При более длительной экстракции, в экстрагирующем растворе появляется актин, который начинает соединяться с ранее вышедшим в раствор миозином в комплекс актомиозин (миозин В).

Миофибриллы: сократимые нити в цитоплазме поперечнополосатых мышечных волокон скелетной мускулатуры, сердечной мышцы и мышц с двойной косой исчерченностью. Диаметр М. от 0,5 до нескольких мкм. В поперечном сечении М. округлы, угловаты или овальны. Основную массу М. составляют тончайшие белковые нити — миофиламенты двух типов — толстые миозиновые (состоят главным образом из миозина, длина их около 1500 нм, диаметр 10–15 нм) и тонкие актиновые (состоят в основном из актина, длина их 1000–1100 нм, диаметр 5–8 нм). Имеются в М. и другие белки: тропомиозин В (в тонких миофиламентах мышц всех типов) и тропомиозин А, или парамиозин (в толстых миофиламентах мышц с двойной косой исчерченностью), а также α- и β-актинины, тропонин и др. Тонкие миофиламенты прикрепляются к т. н. Z-мембране, являющейся границей между саркомерами. Толстые миофиламенты образуют плотный, обладающий двойным лучепреломлением участок, называемый диском А. Толстые и тонкие миофиламенты частично перекрываются («зона перекрывания»). Участок саркомера по обе стороны от Z-мембраны, содержащий лишь тонкие миофиламенты, называется I-диском. Центральная зона А-диска, не содержащая тонких миофиламентов, называется Н-диском; в его центре обычно видна М-полоса, состоящая из коротких (40 нм) М-нитей; длина их соответствует ширине М-полосы. С обеих сторон от М-полосы расположен субдиск Н — узкая зона (~130 нм), более светлая, чем остальной Н-диск. Толстые миофиламенты имеют по всей длине равномерно расположенные отростки, представляющие собой головки миозиновых молекул. Середина толстых миофибрилл лишена отростков, чем и обусловлено возникновение светлой зоны (Н-субдиска). Предполагается существование миофиламентов третьего типа — сверхтонких нитей, напрямую соединяющих между собой Z-мембраны и придающие саркомеру механическую целостность, независящую от того, взаимодействуют между собой сократительные филаменты или нет.

Многоатомный ион де факто: ион Na^+ сам по себе представляет один атом. Однако в растворе он подвергается гидратации, в результате которой вокруг него образуется относительно устойчивая гидратная оболочка, всегда следующая за ионом и существенно влияющая на его поведение в растворе. В результате можно говорить о новой реальности – о многоатомном ионе.

Модель Изинга (одномерная): предельно упрощенная модель магнетика в виде системы магнитных диполей (спинов), расположенных на одной линии, подобно бусинкам в ожерелье. Каждый диполь в этой модели взаимодействует только с соседним диполем. Магнитные моменты в такой системе ориентируются параллельно (вдоль нити ожерелья), согласно ориентации одного (закрепленного) диполя. В системе наблюдаются кооперативные явления и фазовые переходы. Инверсия ориентации закрепленного диполя приводит к ее инверсии для всех диполей системы (кооперативный эффект). При превышении некоторой критической температуры (называемой точкой Кюри), параллельная ориентация утрачивается и происходит фазовый переход (второго рода): от упорядоченного (намагниченного) состояния к беспорядочному (парамагнитному). Модель впервые была предложена Эрнстом Изингом (1900–1998) в 1925 году [353].

Модельные ионы для K^+: катионы, обладающие свойствами, близкими к K^+, например Rb^+ и Cs^+, а также Tl^+.

Молекулярный объем: см. Молярный объем.

Молярный объем: парциальный молярный объем — часть объема, занятого веществом, входящим в состав смеси веществ. В смеси объемом V, содержащей n_1 моль вещества 1 и n_2 молей вещества 2, $V = n_1V_1 + n_2V_2$, где V_1 – парциальный молярный объем вещества 1, а V_2 – парциальный молярный объем вещества 2. Молярный объём — объём одного моля вещества, величина, получающаяся от деления молярной массы (масса, выраженная в граммах, численно равная атомной или молекулярной массе вещества) на плотность. Характеризует плотность упаковки атомов. Для идеального газа, при нормальных условиях, эта величина имеет универсальное значение 22,4 л/моль, однако молярный объем реальных газов всегда отличается от этой величины. Поэтому вся информация о молярном объёме химических элементов относится к их твердой фазе, если не оговорено иное.

Моноволоконный сахарозный метод определения межклеточного пространства: предложен Лингом, Уилл и Шеннон. Заключается в сравнении количества меченной радиоизотопом сахарозы, «прилепающей» к одиночным мышечным волокнам, к которым неприменимо понятие межклеточного пространства, с количеством сахарозы, удерживаемой целой мышцей. Размер межклеточного пространства получаем вычитанием первой величины из второй.

Напряжение вытеснения (U_{vp}): величина, отражающая интегральную способность поляризованной воды вытеснять растворенные в ней вещества. Равна сумме объемных компонентов свободной энергии и энтропии [168, p. 152—157]. Физический смысл параметра в том, что работа, совершаемая для перемещения молекулы растворенного вещества из бесконечности в структурированную воду клетки больше, чем в объемную, неструктурированную.

Нативный белок: белок, находящийся в природном состоянии, не модифицированный, сохранивший структуру, присущую ему в живой клетке. Однако часто (видимо, для большей определенности) под нативным белком стали понимать белок в его кристаллическом состоянии. Тем не менее, существуют данные, согласно которым основная часть белков в интактных клетках отличается своей конформацией от конфор-

мации тех же белков в кристалле (см. раздел 16.6, п. 1.3).

Натриевый насос, натриево-калиевый насос: мембранный механизм, поддерживающий определённое соотношение ионов Na^+ и K^+ в клетке путём их активного транспорта против электрохимического и концентрационного градиентов. Определённое количество ионов постоянно входит в клетку и покидает ее. Пассивный транспорт катионов (движение ионов через мембрану по системе специальных каналов вдоль электрохимического и концентрационного градиентов) в норме компенсируется активным транспортом ионов. Активный перенос Na^+ из клетки сопряжён с противоположно направленным транспортом K^+ в клетку и осуществляется особой ферментной системой — транспортной Na,K-активируемой аденозинтрифосфатазой (Na,K-АТФазой), локализованной в клеточной мембране. Этот фермент, гидролизуя аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ), высвобождает энергию макроэргических связей, которая затрачивается на активный перенос катионов. Работа натриевого насоса зависит от уровня метаболизма клетки. С позиций теории ассоциации-индукции, концепция мембранных насосов противоречит закону сохранения энергии (см. главу 12 и раздел 15.4).

Нерастворяющая вода: представление, возникшее на заре коллоидной химии, согласно которому вода, связанная коллоидами, теряет свойства растворителя и объем, занятый такой водой, не содержит веществ, растворимых в обычной воде.

Окклюзивная вода: по Бунгенбергу-де-Йонгу (Bungenberg de Jong), вода, захваченная сетью переплетающихся белковых цепей геля. Она заполняет пространство между переплетающимися макромолекулами, находясь как бы в клетке из прутьев, но не взаимодействует непосредственно с гелеобразующими молекулами.

Окклюзия: захват формирующимся осадком примесей из раствора. Наблюдается, например, при быстром росте кристаллов. При окклюзии, в отличие от поверхностной адсорбции, примеси захватываются вместе с растворителем и оказываются в объеме кристалла в качестве включений. К окклюзии относится также поглощение газов металлами.

Определение межклеточного пространства по Лингу–Кромаш: метод оценки объема межклеточного пространства в мышцах, предложенный в 1967 году Лингом и Кромаш [336].

Осмос: односторонняя диффузия растворителя через полупроницаемую мембрану, отделяющую раствор от чистого растворителя или от раствора более низкой концентрации. Осмос всегда направлен от чистого растворителя к раствору или от разбавленного раствора к концентрированному. Характеризуется осмос величиной осмотического давления. Осмос играет важную роль в физиологических процессах, обеспечивающих относительное постоянство осмотического давления внутренней среды организма и клетки.

Осмотическая активность: вещество называют осмотически активным, если оно создает осмотическое давление (см. Осмотическое давление). Осмотическое давление связано с парциальным давлением пара растворителя над раствором (уравнение (2) в тексте). Осмотическая активность растворенного вещества тем выше, чем сильнее оно снижает парциальное давление пара. Осмотической активностью обладает только та часть вещества, которая находится в свободном, а не в связанном состоянии.

Осмотическое давление: механическое давление, которое необходимо приложить к раствору с более высокой концентрацией осмотически активного вещества (например, сахарозы), чтобы остановить поток растворителя через полупроницаемую мембрану в этот раствор из объема с чистым растворителем (мембрана должна быть непроницаема для вещества, осмотическое давление раствора которого измеряется).

Пептидная группа: $-CO-NH-$, соединяет остатки аминокислот в молекулах пептидов и белков, которые представляют собой полимеры с общей формулой $(-CO-NH-CHR_i-)_n$, где R_i – боковая группа, характерная для аминокислот, входящих в состав белка. Таким образом, пептидная группа является закономерно повторяющимся элементом остова белка. Все атомы данной пептидной группы располагаются в пространстве в одной плоскости, и находятся в состоянии кето-енольной таутомерии. См. Колеблющаяся структура, Таутомерия.

Пептидная связь (CONH-группа): вид амидной связи, возникающей при образовании белков и пептидов в результате взаимодействия α-аминогруппы (-NH2) одной аминокислоты с α-карбоксильной группой (-COOH) другой аминокислоты. Связь C-N в пептидной связи частично имеет характер двойной (кето-енольная таутомерия); в случае двойной связи расстояние между атомами уменьшается до 1,32 ангстрема. Следует отметить следующие свойства ПС: 4 атома связи (C, N, O и H) и 2 α-углерода находятся в одной плоскости. R-группы аминокислот и водороды при α-углеродах находятся вне этой плоскости. H и O в пептидной связи, а также α-углероды двух аминокислот трансориентированы (трансизомер более устойчив). В случае L-аминокислот, что имеет место во всех природных белках и пептидах, R-группы также трансориентрованы. Вращение вокруг связи C-N невозможно, возможно вращение вокруг C-C связи.

ПКС-электрод — покрытый коллодием и обработанный полилизином стеклянный электрод, метод приготовления: стеклянный электрод покрывают коллодием (раствор нитроцеллюлозы в эфире) и, не дав высохнуть, оставляют на ночь погруженным в раствор полилизина гидрохлорида (3 мг/мл), а затем высушивают при влажности 43% (в эксикаторе над насыщенным раствором K_2CO_3).

Плазматическая мембрана: мембрана, окружающая каждую клетку и обеспечивающая сохранение существенных различий между клеточным содержимым и окружающей средой. Мембрана служит высокоизбирательным фильтром, который поддерживает разницу концентраций ионов по обе стороны мембраны и позволяет питательным веществам проникать внутрь клетки, а продуктам выделения выходить наружу. Все биологические мембраны представляют собой ансамбли липидных и белковых молекул, удерживаемых вместе с помощью нековалентных взаимодействий. Однако с позиций теории Линга, плазматическая мембрана — микроскопически тонкий поверхностный слой клетки, внутренняя граница которого не всегда четко выражена, поэтому говорить о «мембране» нет достаточных оснований и необходимости. По Лингу, роль «мембраны» выглядит иначе, чем это принято думать.

Поверхностная энергия: наличие поверхностной энергии подтверждается ее способностью совершать работу. Свободная энергия поверхности определяется как $G = \gamma A$, где γ — коэффициент поверхностного натяжения, а A — площадь поверхности. Если изменить либо площадь, либо коэффициент γ, то приращение или потеря энергии составит ΔG. Коэффициент поверхностного натяжения можно представить себе как работу, необходимую для увеличения поверхности на один квадратный сантиметр (размерность дин/см). С молекулярной точки зрения стремление поверхности к сокращению основано на том, что силы притяжения между молекулами внутри фазы превышают силы притяжения между молекулами, расположенными на поверхности. Баланс сил таков, что они стремятся «утопить» молекулы, «плывущие» по поверхности. Поверхность молекулы глобулярного белка очень неровная и содержит разного рода выступы и выемки независимо от того, насколько компактно молекула свернута в трехмерную глобулу. Поверхность белка не может быть гомогенной. Если поверхность коллоидной частицы не может быть уменьшена, то ее энергия тем не менее может стать меньше либо за счет адсорбции на ее поверхности веществ, понижающих величину поверхностного натяжения, либо благодаря преимущественной концентрации самих частиц на поверхности жидкости. Перенос веществ через мембраны с помощью механизмов, специально существующих для этой цели в клетке, также включают явление адсорбции.

Поверхностный компонент энергии поляризации (U_s): прирост энергии взаимодействия между молекулами воды в поляризованном, упорядоченном слое, вызванный увеличением дипольного момента молекулы воды под влиянием поверхности адсорбента. Параметр характеризует первый мономолекулярный слой воды, расположенный непосредственно у поверхности. В случае белка — это поверхность полипептидного остова (см. Полипептидный остов).

Полипептид (полипептидная цепь): полимер, мономерами которого являются α-аминокислоты, соединяющиеся между собой в полипептидную цепь в результате образования пептидных связей. На одном конце такой цепи находится свободная NH_2-группа (N-конец цепи), а на другом — COOH-группа (C-конец). В состав полипептидов, имеющих биологическое значение, входит около 20 аминокислот, различающихся боковыми цепями. Если полипептид состоит из многих десятков, сотен или тысяч аминокислотных остатков, то такие полимеры принято называть белками, в противоположность олигопептидам, состоящим из небольшого числа мономеров (не более 20). Грань между олигопептидами и полипептидами (тот размер, при котором полипептид перестаёт считаться олигопептидом и становится полипептидом или белком)

ии тех же белков в кристалле (см. раз-16.6, п. 1.3).

ый насос, натриево-калиевый насос: бранный механизм, поддерживающий деделённое соотношение ионов Na^+ и K^+ летке путём их активного транспорта ив электрохимического и концентра-ного градиентов. Определённое коли-во ионов постоянно входит в клетку и дает ее. Пассивный транспорт кати- (движение ионов через мембрану по еме специальных каналов вдоль элект-мического и концентрационного гради-в) в норме компенсируется активным спортом ионов. Активный перенос Na^+ летки сопряжён с противоположно на-вленным транспортом K^+ в клетку и ществляется особой ферментной систе- — транспортной Na,K-активируемой озинтрифосфатазой (Na,K-АТФазой), лизованной в клеточной мембране. фермент, гидролизуя аденозинтри-форную кислоту (АТФ), высвобождает гию макроэргических связей, которая чивается на активный перенос кати-. Работа натриевого насоса зависит ровня метаболизма клетки. С позиций ии ассоциации-индукции, концепция бранных насосов противоречит закону анения энергии (см. главу 12 и раздел).

оряющая вода: представление, возник- на заре коллоидной химии, согласно рому вода, связанная коллоидами, ет свойства растворителя и объем, за-ый такой водой, не содержит веществ, воримых в обычной воде.

ивная вода: по Бунгенбергу-де-Йонгу genberg de Jong), вода, захваченная ю переплетающихся белковых цепей . Она заполняет пространство между плетающимися макромолекулами, на-сь как бы в клетке из прутьев, но не модействует непосредственно с гелеоб-ующими молекулами.

ия: захват формирующимся осадком месей из раствора. Наблюдается, на-мер, при быстром росте кристаллов. окклюзии, в отличие от поверхностной рбции, примеси захватываются вместе створителем и оказываются в объеме сталла в качестве включений. К окклю- относится также поглощение газов ме-ами.

ение межклеточного пространства Лингу–Кромаш: метод оценки объ- межклеточного пространства в мыш-цах, предложенный в 1967 году Лингом и Кромаш [336].

Осмос: односторонняя диффузия растворителя через полупроницаемую мембрану, отделяющую раствор от чистого растворителя или от раствора более низкой концентрации. Осмос всегда направлен от чистого растворителя к раствору или от разбавленного раствора к концентрированному. Характеризуется осмос величиной осмотического давления. Осмос играет важную роль в физиологических процессах, обеспечивающих относительное постоянство осмотического давления внутренней среды организма и клетки.

Осмотическая активность: вещество называют осмотически активным, если оно создает осмотическое давление (см. Осмотическое давление). Осмотическое давление связано с парциальным давлением пара растворителя над раствором (уравнение (2) в тексте). Осмотическая активность растворенного вещества тем выше, чем сильнее оно снижает парциальное давление пара. Осмотической активностью обладает только та часть вещества, которая находится в свободном, а не в связанном состоянии.

Осмотическое давление: механическое давление, которое необходимо приложить к раствору с более высокой концентрацией осмотически активного вещества (например, сахарозы), чтобы остановить поток растворителя через полупроницаемую мембрану в этот раствор из объема с чистым растворителем (мембрана должна быть непроницаема для вещества, осмотическое давление раствора которого измеряется).

Пептидная группа: –CO-NH–, соединяет остатки аминокислот в молекулах пептидов и белков, которые представляют собой полимеры с общей формулой $(-CO-NH-CHR_i-)_n$, где R_i – боковая группа, характерная для аминокислот, входящих в состав белка. Таким образом, пептидная группа является закономерно повторяющимся элементом остова белка. Все атомы данной пептидной группы располагаются в пространстве в одной плоскости, и находятся в состоянии кето-енольной таутомерии. См. Колеблющаяся структура, Таутомерия.

Пептидная связь (CONH-группа): вид амидной связи, возникающей при образовании белков и пептидов в результате взаимодействия α-аминогруппы (-NH2) одной аминокислоты с α-карбоксильной группой (-COOH) другой аминокислоты. Связь C-N в пептидной связи частично имеет характер двойной (кето-енольная таутомерия); в случае двойной связи расстояние между атомами уменьшается до 1,32 ангстрема. Следует отметить следующие свойства ПС: 4 атома связи (C, N, O и H) и 2 α-углерода находятся в одной плоскости. R-группы аминокислот и водороды при α-углеродах находятся вне этой плоскости. H и O в пептидной связи, а также α-углероды двух аминокислот трансориентированы (трансизомер более устойчив). В случае L-аминокислот, что имеет место во всех природных белках и пептидах, R-группы также трансориентированы. Вращение вокруг связи C-N невозможно, возможно вращение вокруг C-C связи.

ПКС-электрод — покрытый коллодием и обработанный полилизином стеклянный электрод, метод приготовления: стеклянный электрод покрывают коллодием (раствор нитроцеллюлозы в эфире) и, не дав высохнуть, оставляют на ночь погруженным в раствор полилизина гидрохлорида (3 мг/мл), а затем высушивают при влажности 43% (в эксикаторе над насыщенным раствором K_2CO_3).

Плазматическая мембрана: мембрана, окружающая каждую клетку и обеспечивающая сохранение существенных различий между клеточным содержимым и окружающей средой. Мембрана служит высокоизбирательным фильтром, который поддерживает разницу концентраций ионов по обе стороны мембраны и позволяет питательным веществам проникать внутрь клетки, а продуктам выделения выходить наружу. Все биологические мембраны представляют собой ансамбли липидных и белковых молекул, удерживаемых вместе с помощью нековалентных взаимодействий. Однако с позиций теории Линга, плазматическая мембрана — микроскопически тонкий поверхностный слой клетки, внутренняя граница которого не всегда четко выражена, поэтому говорить о «мембране» нет достаточных оснований и необходимости. По Лингу, роль «мембраны» выглядит иначе, чем это принято думать.

Поверхностная энергия: наличие поверхностной энергии подтверждается ее способностью совершать работу. Свободная энергия поверхности определяется как $G = \gamma A$, где γ — коэффициент поверхностного натяжения, а A — площадь поверхности. Если изменить либо площадь, либо коэффициент γ, то приращение или потеря энергии составит ΔG. Коэффициент поверхностного натяжения можно представить себе как работу, необходимую для увеличения поверхности на один квадратный сантиметр (размерность дин/см). С молекулярной точки зрения стремление поверхности к сокращению основано на том, что силы притяжения между молекулами внутри фазы превышают силы притяжения между молекулами, расположенными на поверхности. Баланс сил таков, что они стремятся «утопить» молекулы, «плывущие» по поверхности. Поверхность молекулы глобулярного белка очень неровная и содержит разного рода выступы и выемки независимо от того, насколько компактно молекула свернута в трехмерную глобулу. Поверхность белка не может быть гомогенной. Если поверхность коллоидной частицы не может быть уменьшена, то ее энергия тем не менее может стать меньше либо за счет адсорбции на ее поверхности веществ, понижающих величину поверхностного натяжения, либо благодаря преимущественной концентрации самих частиц на поверхности жидкости. Перенос веществ через мембраны с помощью механизмов, специально существующих для этой цели в клетке, также включают явление адсорбции.

Поверхностный компонент энергии поляризации (U_s): прирост энергии взаимодействия между молекулами воды в поляризованном, упорядоченном слое, вызванный увеличением дипольного момента молекулы воды под влиянием поверхности адсорбента. Параметр характеризует первый мономолекулярный слой воды, расположенный непосредственно у поверхности. В случае белка — это поверхность полипептидного остова (см. Полипептидный остов).

Полипептид (полипептидная цепь): полимер, мономерами которого являются α-аминокислоты, соединяющиеся между собой в полипептидную цепь в результате образования пептидных связей. На одном конце такой цепи находится свободная NH_2-группа (N-конец цепи), а на другом — COOH-группа (C-конец). В состав полипептидов, имеющих биологическое значение, входит около 20 аминокислот, различающихся боковыми цепями. Если полипептид состоит из многих десятков, сотен или тысяч аминокислотных остатков, то такие полимеры принято называть белками, в противоположность олигопептидам, состоящим из небольшого числа мономеров (не более 20). Грань между олигопептидами и полипептидами (тот размер, при котором полипептид перестаёт считаться олигопептидом и становится полипептидом или белком)

достаточно условна. Во многих случаях эта грань в научной литературе не проводится. Полипептиды небольшого молекулярного веса чаще называют полипетидами, а не белками. Общую формулу полипептидов можно представить так: $(-NHCOCHR_i)_n$, R_i – боковая группа аминокислоты i (в случае глицина, R – это атом водорода). Полипептиды (белки) составляют более 50% сухого веса клетки и по своей массовой доле уступают только воде.

Полипептидный остов: цепь пептидных связей (–CO-NH–). Все атомы данной пептидной связи находятся в одной плоскости, то есть она является плоской. У всех белков полипептидный остов одинаков, поэтому одинаковы у них и геометрические характеристики вторичных структур (α-спиралей и β-структур): например, шаг спирали, угол наклона, диаметр и др. На один виток такой спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, шаг спирали составляет 0,54 нм, диаметр 1,0 нм. Пептидный остов несет на себе боковые группы (–CO-NH-CH(R1)-CO-NH-CH(R2)–), последовательность, количество и характер которых придает белкам индивидуальный характер.

Полноразвернутая конформация: конформация белка, при которой все его пептидные связи доступны воде, то есть полностью отсутствуют элементы вторичной структуры. Согласно теории многослойной организации поляризованной воды (МОПВ), группы NH и CO полипептидной цепи образуют водородные связи либо с такими же группами с образованием элементов вторичной структуры белка, либо с молекулами воды. В последнем случае, вода адсорбируется доступным ей полипептидным остовом или всей молекулой белка, если он имеет полноразвернутую конформацию, с образованием многослойной структуры поляризованных молекул воды. См. Теория многослойной организации поляризованной воды (теория МОПВ). Если небольшая доля пептидных связей включена в те или иные вторичные структуры и поэтому с водой не взаимодействуют, то такую конформацию белка лучше называть развернутой и не путать ее с полноразвернутой конформацией.

Полупроницаемая мембрана: мембрана, обладающая свойством полупроницаемости. См. Полупроницаемость.

Полупроницаемость: понятие, введенное Вант-Гоффом (Jacobus van't Hoff, 1852—1911) для обозначения свойства клеточной мембраны пропускать одни вещества и не пропускать другие. Позднее, на основе такого понимания, появились представления о селективности мембраны, получившей объяснение в теории сита и в идее специальных переносчиков. По Лингу, теория сита оказалась несостоятельной. Полупроницаемость, по Лингу, определяется свойствами связанной воды клетки (см. гл. 11).

Поляризация: полезно различать два вида поляризации — наведенную и ориентационную. Наведенная поляризация (внешним электрическим полем) превращает неполярную молекулу в диполь (на время действия поля), а у дипольных молекул (см. Постоянный дипольный момент) вызывает увеличение дипольного момента и искажение структуры диполя (поляризация искажения). В молекуле органического вещества изменение структуры диполя может быть вызвано химическими модификациями других частей молекулы (индуктивный эффект). Ориентационная поляризация — выстраивание дипольных молекул (воды, например) во внешнем электрическом поле с образованием упорядоченных надмолекулярных структур (см. Теория многослойной организации поляризованной воды — теория МОПВ).

Поляризуемость: дипольный момент, индуцированный электрическим полем с напряженностью E, равен $p = aE$, где a – поляризуемость, характеризующая способность электронного облака молекулы или группы атомов деформироваться в электрическом поле. См. Постоянный дипольный момент.

Постоянный дипольный момент: характеризует электрические свойства молекулы как системы заряженных частиц. В отсутствие внешнего электрического поля равен нулю, если молекула неполярна. У полярных молекул (воды, например) постоянный (собственный) дипольный момент p равен произведению расстояния r между центрами положительного и отрицательного зарядов на их величину q и направлен (условно) от отрицательного заряда к положительному: $p = qr$. Дипольный момент молекулы или атомной группы выражает асимметрию распределения электрических зарядов в электрически нейтральной системе.

Потенциал действия — теория Ходжкина–Хаксли: современные представления о генерации нервного импульса основаны на работах А. Ходжкина (Alan Lloyd Hodgkin, 1914—1998), А. Хаксли (Andrew Fielding Huxley) и Б. Катца (Bernard Katz, 1911—2003), выполненных на гигантских нервных волокнах кальмара (1952) и удостоенных Нобелевской премии. Механизм распространения электрического импульса вдоль мембраны аксона (толщина около 50—70 Å) объясняется тем, что проницаемость мембраны зависит от имеющихся токов и напряжений, и различна для разного сорта ионов. Главную роль в процессе играют ионы натрия. Важную роль в регуляции процессов играют также ионы кальция. Первая модель распространения электрического импульса вдоль аксона гигантского кальмара была предложена Ходжкиным и Хаксли в 1952 году, и до сих пор является базовой моделью для описания такого типа явлений. Теория ассоциации-индукции предложила другое объяснение потенциалу действия, основанному на сорбционных процессах на поверхности клетки.

Потенциал к образованию α-спирали: эмпирически определяемая склонность или способность какого-либо аминокислотного остатка участвовать в образовании α-спирали.

Потенциал локализованной адсорбции (ПЛА): теория, согласно которой потенциалы покоя и действия клеток (а также потенциалы на модельных объектах — стеклянном электроде, КС-электроде) обусловлены наличием фиксированных анионных групп на поверхности клеток (или модельных систем) и их способностью связывать (адсорбировать) противоионы. Теория впервые была представлена Лингом в 1955 и 1959 годах, и до последнего времени называлась потенциалом поверхностной адсорбции.

Потенциал покоя: разность потенциалов между цитоплазмой и внеклеточной средой, которую имеет каждая живая клетка, находящаяся в состоянии физиологического покоя. Цитоплазма клеток имеет отрицательный заряд. Потенциал покоя варьирует у разных клеток от –15 до –90 мВ. Согласно теории Линга потенциал покоя является потенциалом локализованной адсорбции (см. Потенциал локализованной адсорбции).

Потенциал стеклянного электрода: разность электрических потенциалов между внутренней поверхностью электрода и раствором, омывающим электрод снаружи.

Правило размера в распределении веществ между клеткой и средой: истинный коэффициент распределения вещества между клеточной водой (или водой модельной системы) и внеклеточной (q) обратно пропорционален молярному объему исследуемого вещества.

Праймер (затравка): в 1969 году Лингом, Уилл и Шеннон [480], в целях достижения более полной аккумуляции D-глюкозы мышцей лягушки при 0 °C, было предложено проводить предварительную инкубацию тканей при более высокой температуре (например, 25 °C) в среде, содержащей инсулин и какой-либо сахар (D-глюкозу, D-ксилозу или др.). D-глюкозу, D-ксилозу и еще пять сахаров, структурных аналогов D-глюкозы, назвали праймерами, т. к. предварительная обработка этими сахарами тканей усиливает аккумулирующую способность клеток по отношению к молекулам со структурой, сходной со структурой указанных сахаров.

Препарат безнасосной незамкнутой клетки (БНК): многоклеточный препарат, изготавливаемый обычно из портняжной мышцы лягушки, путем отсечения ее нижнего (дистального) конца. Мышечные волокна такого препарата оказываются открытыми, то есть лишенными плазматической мембраны. Оставшаяся часть мембраны не в состоянии функционировать, так как контактирует не с внешним раствором, а с воздухом, увлажненным для предотвращения высыхания препарата или с вазелиновым маслом. Движение ионов K^+, Na^+ и других веществ через плазматическую мембрану в таком препарате становится невозможным (рис. 7).

Принцип усиления ассоциации при фиксировании одного из взаимодействующих центров: См. Теория усиления ассоциации путем фиксации центра связывания или заряда.

Проксимальные функциональные группы (центры): функциональные группы белковой молекулы (или центры взаимодействия), локализованные в непосредственной близости к полипептидной цепи (к остову белка) или недалеко от нее. Точкой отсчета является полипептидная цепь.

Проницаемость: способность клеток и тканей поглощать и выделять химические вещества.

Протеиноидные микросферы: искусственные клеткоподобные образования (протоклетки), впервые полученные и исследованные американским ученым С. Фоксом (S. Fox) в 50-х годах прошлого века, путем термической обработки смеси аминокислот, в результате которой образовывались полипептиды — протеиноиды и микросферы из них (см. рис. 5Е). Протеиноидные микросферы обладают определенной стабильностью: не разрушаются при центрифугировании, в солевых растворах устойчивее многих коацерватных капель. Их стабильность позволила приготовить препараты для электронной микроскопии, на которых удалось рассмотреть некоторые детали ультраструктуры.

достаточно условна. Во многих случаях эта рань в научной литературе не проводится. Полипептиды небольшого молекулярного веса чаще называют полипетидами, а не белками. Общую формулу полипептидов можно представить так: $(-NHCOCHR_i)_n$, R_i — боковая группа аминокислоты i в случае глицина, R — это атом водорода). Полипептиды (белки) составляют более 0% сухого веса клетки и по своей массо-ой доле уступают только воде.

пептидный остов: цепь пептидных связей –CO-NH–). Все атомы данной пептид-ой связи находятся в одной плоскости, то сть она является плоской. У всех белков олипептидный остов одинаков, поэтому динаковы у них и геометрические харак-еристики вторичных структур (α-спиралей β-структур): например, шаг спирали, угол аклона, диаметр и др. На один виток такой пирали приходится 3,6 аминокислотных статка, шаг спирали составляет 0,54 нм, иаметр 1,0 нм. Пептидный остов несет на ебе боковые группы (–CO-NH-CH(R1)-CO-NH-CH(R2)–), последовательность, ко-ичество и характер которых придает бел-ам индивидуальный характер.

оразвернутая конформация: конформа-ия белка, при которой все его пептидные вязи доступны воде, то есть полностью от-утствуют элементы вторичной структуры. Согласно теории многослойной организа-ии поляризованной воды (МОПВ), группы NH и CO полипептидной цепи образуют одородные связи либо с такими же груп-ами с образованием элементов вторичной труктуры белка, либо с молекулами воды. последнем случае, вода адсорбируется оступным ей полипептидным остовом или сей молекулой белка, если он имеет полно-азвернутую конформацию, с образованием ногослойной структуры поляризованных олекул воды. См. Теория многослойной рганизации поляризованной воды (теория МОПВ). Если небольшая доля пептидных вязей включена в те или иные вторичные труктуры и поэтому с водой не взаимо-ействуют, то такую конформацию белка учше называть развернутой и не путать ее полноразвернутой конформацией.

ронцаемая мембрана: мембрана, об-адающая свойством полупроницаемости. м. Полупроницаемость.

ронцаемость: понятие, введенное Вант-оффом (Jacobus van't Hoff, 1852—1911) тя обозначения свойства клеточной мем-раны пропускать одни вещества и не про-ускать другие. Позднее, на основе такого понимания, появились представления о селективности мембраны, получившей объяснение в теории сита и в идее специальных переносчиков. По Лингу, теория сита оказалась несостоятельной. Полупроницаемость, по Лингу, определяется свойствами связанной воды клетки (см. гл. 11).

Поляризация: полезно различать два вида поляризации — наведенную и ориентационную. Наведенная поляризация (внешним электрическим полем) превращает недипольную молекулу в диполь (на время действия поля), а у дипольных молекул (см. Постоянный дипольный момент) вызывает увеличение дипольного момента и искажение структуры диполя (поляризация искажения). В молекуле органического вещества изменение структуры диполя может быть вызвано химическими модификациями других частей молекулы (индуктивный эффект). Ориентационная поляризация — выстраивание дипольных молекул (воды, например) во внешнем электрическом поле с образованием упорядоченных надмолекулярных структур (см. Теория многослойной организации поляризованной воды — теория МОПВ).

Поляризуемость: дипольный момент, индуцированный электрическим полем с напряженностью E, равен $p = aE$, где a — поляризуемость, характеризующая способность электронного облака молекулы или группы атомов деформироваться в электрическом поле. См. Постоянный дипольный момент.

Постоянный дипольный момент: характеризует электрические свойства молекулы как системы заряженных частиц. В отсутствие внешнего электрического поля равен нулю, если молекула неполярна. У полярных молекул (воды, например) постоянный (собственный) дипольный момент p равен произведению расстояния r между центрами положительного и отрицательного зарядов на их величину q и направлен (условно) от отрицательного заряда к положительному: $p = qr$. Дипольный момент молекулы или атомной группы выражает асимметрию распределения электрических зарядов в электрически нейтральной системе.

Потенциал действия — теория Ходжкина–Хаксли: современные представления о генерации нервного импульса основаны на работах А. Ходжкина (Alan Lloyd Hodgkin, 1914—1998), А. Хаксли (Andrew Fielding Huxley) и Б. Катца (Bernard Katz, 1911—2003), выполненных на гигантских нервных волокнах кальмара (1952) и удостоенных Нобелевской премии. Механизм распространения электрического импульса вдоль мембраны аксона (толщина около 50—70 Å) объясняется тем, что проницаемость мембраны зависит от имеющихся токов и напряжений, и различна для разного сорта ионов. Главную роль в процессе играют ионы натрия. Важную роль в регуляции процессов играют также ионы кальция. Первая модель распространения электрического импульса вдоль аксона гигантского кальмара была предложена Ходжкиным и Хаксли в 1952 году, и до сих пор является базовой моделью для описания такого типа явлений. Теория ассоциации-индукции предложила другое объяснение потенциалу действия, основанному на сорбционных процессах на поверхности клетки.

Потенциал к образованию α-спирали: эмпирически определяемая склонность или способность какого-либо аминокислотного остатка участвовать в образовании α-спирали.

Потенциал локализованной адсорбции (ПЛА): теория, согласно которой потенциалы покоя и действия клеток (а также потенциалы на модельных объектах — стеклянном электроде, КС-электроде) обусловлены наличием фиксированных анионных групп на поверхности клеток (или модельных систем) и их способностью связывать (адсорбировать) противоионы. Теория впервые была представлена Лингом в 1955 и 1959 годах, и до последнего времени называлась потенциалом поверхностной адсорбции.

Потенциал покоя: разность потенциалов между цитоплазмой и внеклеточной средой, которую имеет каждая живая клетка, находящаяся в состоянии физиологического покоя. Цитоплазма клеток имеет отрицательный заряд. Потенциал покоя варьирует у разных клеток от −15 до −90 мВ. Согласно теории Линга потенциал покоя является потенциалом локализованной адсорбции (см. Потенциал локализованной адсорбции).

Потенциал стеклянного электрода: разность электрических потенциалов между внутренней поверхностью электрода и раствором, омывающим электрод снаружи.

Правило размера в распределении веществ между клеткой и средой: истинный коэффициент распределения вещества между клеточной водой (или водой модельной системы) и внеклеточной (q) обратно пропорционален молярному объему исследуемого вещества.

Праймер (затравка): в 1969 году Лингом, Уилл и Шеннон [480], в целях достижения более полной аккумуляции D-глюкозы мышцей лягушки при 0 °C, было предложено проводить предварительную инкубацию тканей при более высокой температуре (например, 25 °C) в среде, содержащей инсулин и какой-либо сахар (D-глюкозу, D-ксилозу или др.). D-глюкозу, D-ксилозу и еще пять сахаров, структурных аналогов D-глюкозы, назвали праймерами, т. к. предварительная обработка этими сахарами тканей усиливает аккумулирующую способность клеток по отношению к молекулам со структурой, сходной со структурой указанных сахаров.

Препарат безнасосной незамкнутой клетки (БНК): многоклеточный препарат, изготавливаемый обычно из портняжной мышцы лягушки, путем отсечения ее нижнего (дистального) конца. Мышечные волокна такого препарата оказываются открытыми, то есть лишенными плазматической мембраны. Оставшаяся часть мембраны не в состоянии функционировать, так как контактирует не с внешним раствором, а с воздухом, увлажненным для предотвращения высыхания препарата или с вазелиновым маслом. Движение ионов K^+, Na^+ и других веществ через плазматическую мембрану в таком препарате становится невозможным (рис. 7).

Принцип усиления ассоциации при фиксировании одного из взаимодействующих центров: См. Теория усиления ассоциации путем фиксации центра связывания или заряда.

Проксимальные функциональные группы (центры): функциональные группы белковой молекулы (или центры взаимодействия), локализованные в непосредственной близости к полипептидной цепи (к остову белка) или недалеко от нее. Точкой отсчета является полипептидная цепь.

Проницаемость: способность клеток и тканей поглощать и выделять химические вещества.

Протеиноидные микросферы: искусственные клеткоподобные образования (протоклетки), впервые полученные и исследованные американским ученым С. Фоксом (S. Fox) в 50-х годах прошлого века, путем термической обработки смеси аминокислот, в результате которой образовывались полипептиды — протеиноиды и микросферы из них (см. рис. 5Е). Протеиноидные микросферы обладают определенной стабильностью: не разрушаются при центрифугировании, в солевых растворах устойчивее многих коацерватных капель. Их стабильность позволила приготовить препараты для электронной микроскопии, на которых удалось рассмотреть некоторые детали ультраструктуры.

При изменении условий внешней среды наблюдали движение материала внутри частицы от центра к периферии, деление микрочастицы и образование двойного пограничного слоя. Окрашивание по Грамму обнаружило, что микросферы, образованные из кислых протеиноидов, грамотрицательны; микросферы, в состав которых входят в достаточном количестве основные протеиноиды, грамположительны. Из других свойств, присущих микросферам и представляющих интерес с эволюционной точки зрения, можно указать на существование у них барьеров с избирательной проницаемостью; способность к делению и почкованию; подвижность, возрастающую после добавления к суспензии микросфер АТФ; способность к наращиванию массы микрочастицы; тенденцию к контактированию друг с другом. В протеиноидных микросферах найдена ферментоподобная активность, которой обладали образующие их протеиноиды.

Протоплазма: в изначальном смысле — живая материя. В наше время — содержимое живой клетки, включая ядро и цитоплазму (у эукариот). В протоплазме осуществляются все жизненные процессы. В отличие от протоплазмы, цитоплазма — внеядерная часть протоплазмы эукариотических клеток. Цитоплазма состоит из гиалоплазмы и «взвешенных» в ней органоидов и различных клеточных включений.

Протоплазматическая доктрина: клетки являются желеподобными комками протоплазмы, внутри которых расположено ядро. Сформулирована Максом Шульце (Max Schultze) в 1861 году. Этой доктрине противостоит мембранная доктрина, согласно которой клетка — это раствор различных веществ, отграниченный от внешнего раствора липидной мембраной.

Прочная адсорбция: адсорбция, которая характеризуется прочной, устойчивой связью между адсорбирующим центром и адсорбированной молекулой (ионом), что делает возможным стехиометрическое соотношение: один центр связывания — один ион.

Равновесие термодинамическое: состояние термодинамической системы, в которое она самопроизвольно приходит через достаточной большой промежуток времени в условиях изоляции от окружающей среды. При термодинамическом равновесии в системе прекращаются все необратимые процессы, связанные с диссипацией энергии: теплопроводность, диффузия, химические реакции и др. В состоянии термодинамического равновесия параметры системы не меняются со временем.

Равновесная конфигурация молекулы: расположение атомов в молекуле, соответствующее минимуму потенциальной поверхности. Равновесная конфигурация относительно устойчива и характеризуется определенной внутренней энергией молекулы. Переход из одной равновесной конфигурации в другую осуществляется при квантовых переходах. В случае двухатомной молекулы равновесная конфигурация характеризуется равновесным межатомным расстоянием (равновесной длиной связи). В различных электронных состояниях молекула может иметь различные равновесные конфигурации. В данном состоянии многоатомная молекула может иметь одну или несколько равновесных конфигураций. При наличии нескольких эквивалентных (то есть получаемых друг из друга при операциях симметрии) равновесных конфигураций возможно туннелирование между ними, приводящее к туннельному расщеплению уровней энергии молекулы. Неэквивалентные равновесные конфигурации называются конформерами или конформациями молекул. Равновесные конфигурации определяются совокупностью равновесных координат атомных ядер или длин связей и валентных углов, которые называются структурными параметрами молекулы.

Равновесное состояние (состояние равновесия): состояние, в которое приходит термодинамическая система при постоянных внешних условиях. Характеризуется постоянством во времени термодинамических параметров и отсутствием в системе потоков вещества и энергии. При этом внутри равновесной системы продолжаются микроскопические процессы: изменяются положения молекул и их скорости при столкновениях. Примером устойчивого состояния является форма пламени горящей свечи. В большинстве случаев устойчивое состояние требует непрерывного притока энергии.

Равновесные явления: явления, характерные для систем, находящихся в состоянии термодинамического равновесия.

Равновесный потенциал калиевый: понятие, введенное мембранной теорией потенциала покоя и действия Ходжкина (A. Hodgkin) и Хаксли (A. Huxley). Калиевый равновесный потенциал в упрощенной форме: $E_K = 58 \lg [K]_{ex}/[K]_{in}$ (формула Нернста). Разность между текущим значением мембранного потенциала и E_K называют электрохимическим градиентом для K^+. Электрохимический градиент — причина пассивного движения K^+ (и любого другого иона) через мембрану. Уравнение Нернста означает, что равновесный потенциал возникает в результате значительно большей концентрации K^+ внутри клетки, чем в окружающей среде, при этом в обеих этих средах K^+ должен быть свободным, то есть представлен водными растворами. Доказательства тому, что K^+ внутри клеток на самом деле не свободен, а связан, см. в разделе 10.2. Связанное состояние K^+ в клетке резко противоречит мембранной теории потенциалов покоя и действия.

Равновесный потенциал натриевый: принципиальную сторону вопроса см. Равновесный потенциал калиевый. Особенность для Na^+ состоит в том, что внутриклеточная вода не является, согласно теории ассоциации-индукции, обычной водой, а структурирована, связана белками клетки и потому является плохим растворителем в том числе и для Na^+ (см. гл. 11). Таким образом, по обе стороны клеточной поверхности свойства воды, ее состояние различаются, что никак не учитывается теорией потенциала покоя Ходжкина (A. Hodgkin) и Хаксли (A. Huxley).

Равновесный процесс: процесс перехода термодинамической системы из одного равновесного состояния в другое, столь медленный, что все промежуточные состояния можно рассматривать как равновесные, то есть характеризующиеся очень медленным (в пределе — бесконечно медленным) изменением термодинамических параметров состояния. Всякий равновесный процесс является обратимым процессом, и наоборот, любой обратимый процесс является равновесным.

Развернутая конформация: см. Полноразвернутая конформация.

Раствор 731: раствор Рингера, обогащенный питательными добавками. Содержит витамины, свободные аминокислоты, другие биологически активные вещества, а также антибиотики. В таком растворе изолированная мышца лягушки может прожить до 9 дней при комнатной температуре [381].

Рецептор: молекула (обычно белок) на поверхности клетки, клеточного органоида или в цитоплазме клетки, специфически реагирующая изменением своей пространственной конфигурации на присоединение к ней молекулы определенного химического вещества, обычно гормона или медиатора — то есть на гормональный сигнал, и передающая этот сигнал внутрь клетки или клеточной органеллы, обычно при помощи механизма так называемых вторичных посредников. Химическое вещество, специфически соединяющееся с рецептором, называется лигандом этого рецептора. Однако под рецептором можно понимать и участок белковой молекулы, который непосредственно взаимодействует с лигандом.

Саркода: термин, предложенный Феликсом Дюжарденом (Felix Dujardin, 1801—1860) для обозначения живой материи клетки, но прижился термин «протоплазма».

Саркомер: см. Миофибриллы.

Свойства ближнего действия: свойства, проявляющиеся лишь при непосредственном контакте, в противоположность свойствам, проявляющимся при удаленном действии.

Связанная вода: вода, связанная коллоидами посредством различных механизмов, и приобретшая в результате свойства, отличные от свойств обычной воды (историю вопроса и подробности см. в работе [64, p. 278—306]).

Система фиксированных зарядов: трехмерный матрикс, несущий большое количество групп, обладающих каким-либо зарядом. См. Теория фиксированных зарядов Линга

Скачкообразный путь: вариант движения ионов в системе фиксированных зарядов, при котором ион проходит через слои упорядоченной внутриклеточной воды между заряженными группами, не вступая с ними в непосредственное взаимодействие. Скачкообразность обусловлена динамикой структурных перестроек поляризованной воды.

Сорбционная теория А. С. Трошина: теория распределения веществ между клеткой и средой, согласно которой характер их распределения определяется двумя основными факторами: сорбцией веществ на внутриклеточных структурах и их растворимостью во внутриклеточной воде. Благодаря сорбционным процессам происходит аккумуляция веществ в клетке. Концентрация веществ, растворенных в клеточной воде, как правило, ниже, чем в объемной воде внеклеточной среды, так как растворяющая способность внутриклеточной воды ниже [90, 91, 92]. Теория относится к равновесным процессам и сохраняет свое значение по сей день (см. гл. 9).

Сорбция: поглощение твердым телом или жидкостью (сорбентом) жидкости или газа, или растворенного в жидкости вещества (сорбата), из окружающей среды. Поглощение вещества из газовой фазы всем объемом жидкого сорбента называется абсорбцией.

и изменении условий внешней среды
людали движение материала внутри
тицы от центра к периферии, деление
рочастицы и образование двойного пог-
ичного слоя. Окрашивание по Грамму
аружило, что микросферы, образован-
из кислых протеиноидов, грамотри-
ельны; микросферы, в состав которых
дят в достаточном количестве основ-
протеиноиды, грамположительны. Из
гих свойств, присущих микросферам и
дставляющих интерес с эволюционной
ки зрения, можно указать на сущест-
ание у них барьеров с избирательной
ницаемостью; способность к делению и
кованию; подвижность, возрастающую
ле добавления к суспензии микросфер
Ф; способность к наращиванию массы
рочастицы; тенденцию к контактиро-
ию друг с другом. В протеиноидных
росферах найдена ферментоподобная
ивность, которой обладали образующие
протеиноиды.

лазма: в изначальном смысле — жи-
материя. В наше время — содержимое
вой клетки, включая ядро и цитоплазму
укариот). В протоплазме осуществляют-
все жизненные процессы. В отличие от
топлазмы, цитоплазма — внеядерная
ть протоплазмы эукариотических кле-
Цитоплазма состоит из гиалоплазмы и
вешенных» в ней органоидов и различ-
клеточных включений.

лазматическая доктрина: клетки яв-
тся желеподобными комками прото-
змы, внутри которых расположено ядро.
ормулирована Максом Шульце (Max
ultze) в 1861 году. Этой доктрине про-
остоит мембранная доктрина, согласно
орой клетка — это раствор различных
еств, отграниченный от внешнего рас-
ра липидной мембраной.

адсорбция: адсорбция, которая ха-
теризуется прочной, устойчивой связью
жду адсорбирующим центром и адсор-
ованной молекулой (ионом), что делает
можным стехиометрическое соотноше-
один центр связывания – один ион.

сие термодинамическое: состояние тер-
инамической системы, в которое она
опроизвольно приходит через достаточ-
большой промежуток времени в усло-
изоляции от окружающей среды. При
модинамическом равновесии в системе
кращаются все необратимые процессы,
занные с диссипацией энергии: тепло-
водность, диффузия, химические реак-
ции и др. В состоянии термодинамического равновесия параметры системы не меняются со временем.

Равновесная конфигурация молекулы: расположение атомов в молекуле, соответствующее минимуму потенциальной поверхности. Равновесная конфигурация относительно устойчива и характеризуется определенной внутренней энергией молекулы. Переход из одной равновесной конфигурации в другую осуществляется при квантовых переходах. В случае двухатомной молекулы равновесная конфигурация характеризуется равновесным межатомным расстоянием (равновесной длиной связи). В различных электронных состояниях молекула может иметь различные равновесные конфигурации. В данном состоянии многоатомная молекула может иметь одну или несколько равновесных конфигураций. При наличии нескольких эквивалентных (то есть получаемых друг из друга при операциях симметрии) равновесных конфигураций возможно туннелирование между ними, приводящее к туннельному расщеплению уровней энергии молекулы. Неэквивалентные равновесные конфигурации называются конформерами или конформациями молекул. Равновесные конфигурации определяются совокупностью равновесных координат атомных ядер или длин связей и валентных углов, которые называются структурными параметрами молекулы.

Равновесное состояние (состояние равновесия): состояние, в которое приходит термодинамическая система при постоянных внешних условиях. Характеризуется постоянством во времени термодинамических параметров и отсутствием в системе потоков вещества и энергии. При этом внутри равновесной системы продолжаются микроскопические процессы: изменяются положения молекул и их скорости при столкновениях. Примером устойчивого состояния является форма пламени горящей свечи. В большинстве случаев устойчивое состояние требует непрерывного притока энергии.

Равновесные явления: явления, характерные для систем, находящихся в состоянии термодинамического равновесия.

Равновесный потенциал калиевый: понятие, введенное мембранной теорией потенциала покоя и действия Ходжкина (A. Hodgkin) и Хаксли (A. Huxley). Калиевый равновесный потенциал в упрощенной форме: $E_K = 58 \lg [K]_{ex}/[K]_{in}$ (формула Нернста). Разность между текущим значением мембранного потенциала и E_K называют электрохимическим градиентом для K^+. Электрохимический градиент — причина пассивного движения K^+ (и любого другого иона) через мембрану. Уравнение Нернста означает, что равновесный потенциал возникает в результате значительно большей концентрации K^+ внутри клетки, чем в окружающей среде, при этом в обеих этих средах K^+ должен быть свободным, то есть представлен водными растворами. Доказательства тому, что K^+ внутри клеток на самом деле не свободен, а связан, см. в разделе 10.2. Связанное состояние K^+ в клетке резко противоречит мембранной теории потенциалов покоя и действия.

Равновесный потенциал натриевый: принципиальную сторону вопроса см. Равновесный потенциал калиевый. Особенность для Na^+ состоит в том, что внутриклеточная вода не является, согласно теории ассоциации-индукции, обычной водой, а структурирована, связана белками клетки и потому является плохим растворителем в том числе и для Na^+ (см. гл. 11). Таким образом, по обе стороны клеточной поверхности свойства воды, ее состояние различаются, что никак не учитывается теорией потенциала покоя Ходжкина (A. Hodgkin) и Хаксли (A. Huxley).

Равновесный процесс: процесс перехода термодинамической системы из одного равновесного состояния в другое, столь медленный, что все промежуточные состояния можно рассматривать как равновесные, то есть характеризующиеся очень медленным (в пределе — бесконечно медленным) изменением термодинамических параметров состояния. Всякий равновесный процесс является обратимым процессом, и наоборот, любой обратимый процесс является равновесным.

Развернутая конформация: см. Полноразвернутая конформация.

Раствор 731: раствор Рингера, обогащенный питательными добавками. Содержит витамины, свободные аминокислоты, другие биологически активные вещества, а также антибиотики. В таком растворе изолированная мышца лягушки может прожить до 9 дней при комнатной температуре [381].

Рецептор: молекула (обычно белок) на поверхности клетки, клеточного органоида или в цитоплазме клетки, специфически реагирующая изменением своей пространственной конфигурации на присоединение к ней молекулы определенного химического вещества, обычно гормона или медиатора — то есть на гормональный сигнал, и передающая этот сигнал внутрь клетки или клеточной органеллы, обычно при помощи механизма так называемых вторичных посредников. Химическое вещество, специфически соединяющееся с рецептором, называется лигандом этого рецептора. Однако под рецептором можно понимать и участок белковой молекулы, который непосредственно взаимодействует с лигандом.

Саркода: термин, предложенный Феликсом Дюжарденом (Felix Dujardin, 1801—1860) для обозначения живой материи клетки, но прижился термин «протоплазма».

Саркомер: см. Миофибриллы.

Свойства ближнего действия: свойства, проявляющиеся лишь при непосредственном контакте, в противоположность свойствам, проявляющимся при удаленном действии.

Связанная вода: вода, связанная коллоидами посредством различных механизмов, и приобретшая в результате свойства, отличные от свойств обычной воды (историю вопроса и подробности см. в работе [64, p. 278—306]).

Система фиксированных зарядов: трехмерный матрикс, несущий большое количество групп, обладающих каким-либо зарядом. См. Теория фиксированных зарядов Линга

Скачкообразный путь: вариант движения ионов в системе фиксированных зарядов, при котором ион проходит через слои упорядоченной внутриклеточной воды между заряженными группами, не вступая с ними в непосредственное взаимодействие. Скачкообразность обусловлена динамикой структурных перестроек поляризованной воды.

Сорбционная теория А. С. Трошина: теория распределения веществ между клеткой и средой, согласно которой характер их распределения определяется двумя основными факторами: сорбцией веществ на внутриклеточных структурах и их растворимостью во внутриклеточной воде. Благодаря сорбционным процессам происходит аккумуляция веществ в клетке. Концентрация веществ, растворенных в клеточной воде, как правило, ниже, чем в объемной воде внеклеточной среды, так как растворяющая способность внутриклеточной воды ниже [90, 91, 92]. Теория относится к равновесным процессам и сохраняет свое значение по сей день (см. гл. 9).

Сорбция: поглощение твердым телом или жидкостью (сорбентом) жидкости или газа, или растворенного в жидкости вещества (сорбата), из окружающей среды. Поглощение вещества из газовой фазы всем объемом жидкого сорбента называется абсорбцией.

Извлечение жидкостью какого-либо компонента из другой жидкости называется экстракцией. При сорбции паров пористыми телами происходит капиллярная конденсация. Обычно одновременно протекает несколько сорбционных процессов.

Состояние полного насыщения водородных связей: состояние молекулы воды, в котором она участвует в максимально возможном для нее количестве водородных связей с соответствующими группами макромолекул или с другими молекулами воды, включенными в многослойную поляризованную водную структуру (см. Теория многослойной организации поляризованной воды (теория МОПВ)).

Стандартная свободная энергия адсорбции: адсорбция — один из важнейших типов поверхностных явлений. Явление адсорбции связано с тем, что силы межкмолекулярного взаимодействия на границе раздела фаз не скомпенсированы, и, следовательно, пограничный слой обладает избытком энергии — свободной поверхностной энергией. В результате притяжения поверхностью раздела фаз находящихся вблизи нее молекул адсорбата свободная поверхностная энергия уменьшается, то есть процессы адсорбции энергетически выгодны. Изменение свободной энергии (ΔF°) в результате адсорбции иона, молекулы или другого растворенного вещества на адсорбционный центр связано с константой равновесия адсорбции K уравнением $\Delta F^\circ = -RT \ln K$, где R — газовая постоянная, а T — абсолютная температура.

Стандартная свободная энергия распределения растворенного вещества, ΔF°: изменение стандартной свободной энергии системы (ΔF°) при распределении растворенного вещества между двумя фазами (от момента добавления вещества в систему и до установления диффузионного равновесия), подчиняется уравнению $\Delta F^\circ = -RT \ln q$ (которое может быть выведено из уравнения Вант-Гоффа), где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, а q — истинный равновесный коэффициент распределения растворенного вещества, то есть коэффициент распределения вещества в системе, в которой оно не сорбируется.

Стехиометрия: соотношение между количествами вступающих в реакцию реагентов и образующихся продуктов. Стехиометрия может выполняться в течение всей реакции. Если в течение реакции образуются в заметной концентрации промежуточные продукты, стехиометрическое соотношение между реагентами и продуктами меняется, и мы имеем дело с реакцией, стехиометрия которой меняется во времени. Для элементарных реакций стехиометрия не зависит от времени. В физических процессах также может иметь место определенное соотношение между взаимодействующими атомами и молекулами.

Стиль мышления: устойчивая, целостная система особенностей теоретического объяснения исследуемого объекта, характеризующаяся спецификой методологических принципов построения знания. В основании каждого стиля мышления лежит парадигма (от греч. paradeigma — пример, образец) — совокупность теоретических и методологических предпосылок, определяющих конкретное научное исследование, — которая воплощается в научной практике на данном историческом этапе. Стиль мышления — это тип мышления, свойственный данной исторической эпохе. Смена стиля мышления связана с научными революциями, со «сменой понятийной сетки, через которую ученые рассматривают мир» (T. Кун, Thomas Samuel Kuhn, 1922—1996). История физиологии показала, что стиль мышления не может быть моноцентричным (молекулярным, клеточным, тканевым, органным, организменным, популяционным, биосферным); в современной физиологии он должен быть системным, многоуровневым.

Структурообразующий белковый матрикс (СБМ): гипотетическая кооперативная система взаимосвязанных преимущественно или полностью нативно развернутых белков, пронизывающая весь объем клетки, предложенная Лингом. Одной из важнейших функций этой системы является поддержание большей части клеточной воды в упорядоченном (поляризованном) метастабильном состоянии, обеспечивающим основные характеристики проницаемости клетки в покое. При физиологической активности (возбуждении) и повреждении клетки, или ее части, СБМ обратимо утрачивает свои свойства. Поляризованная вода превращается в воду с обычными свойствами. Ее растворяющая способность возрастает. При переходе клетки в нормальное состояние, свойства СБМ восстанавливаются.

Суррогатный (модельный) ион: ион, служащий заменой другому иону, близкому к нему по свойствам. Например, Rb^+ используется в качестве иона, «моделирующего» поведение K^+. К ним же относится Cs^+ и Tl^+.

Таутомерия: быстрая обратимая структурная изомеризация; способные к таутомерии вещества при установившемся равновесии представляют собой смеси двух (или нескольких) взаимопревращающихся изомеров — таутомеров (см. Изомерия). Наиболее распространена прототропная триадная таутомерия (миграция протона между крайними атомами триады — системы трёх атомов, два из которых связаны двойной связью; миграция сопровождается перемещением двойной связи). К этому виду таутомерии относятся кето-енольная, имино-енаминная, амидная, в том числе лактим-лактамная, трёхуглеродная, кольчато-цепная и некоторые др.

Теория ассоциации-индукции (АИ): в 1962 году Гильберт Линг предложил первую физико-химическую теорию, объясняющую жизнь на молекулярном и электронном уровне. Эта теория связывает воедино три основных компонента живых клеток — белки, воду и ионы, — а также указывает на индукцию (вызванные изменения электронной плотности в молекулах), как на основной механизм, координирующий и регулирующий свойства функциональных групп белка и различные клеточные функции.

Теория: систематизация знания, схема, обладающая предсказательной силой в отношении какого-либо явления. Теории формулируются, разрабатываются и проверяются в соответствии с научным методом. Стандартный метод проверки теорий — прямая экспериментальная проверка («эксперимент — критерий истины»). Однако часто теорию нельзя проверить прямым экспериментом (например, теорию о возникновении жизни на Земле), либо такая проверка слишком сложна или затратна (макроэкономические и социальные теории), и поэтому теории часто проверяются не прямым экспериментом, а по наличию предсказательной силы — то есть если из неё следуют неизвестные/незамеченные ранее события, и при пристальном наблюдении эти события обнаруживаются, то предсказательная сила присутствует. Обобщая, цель науки — предсказывать будущее; как в наблюдательном (аналитическом) смысле — описывать ход событий, на который мы не можем повлиять, так и в синтетическом — создание посредством технологии желаемого будущего. Образно говоря, существо теории в том, чтобы связывать воедино «косвенные улики» и вынести вердикт прошлым событиям и указать, что будет происходить в будущем при соблюдении определённых условий. При появлении более общей, более точной или более удобной в практическом плане теории, старая теория уступает дорогу новой. Научные теории не имеют ничего общего с религией. Теории, которые всё объясняют при помощи введения понятия бога, используют показания «очевидцев» в качестве доказательства своей истинности, не являются научными по причине отсутствия объективных процедур проверки своей состоятельности и предсказательной силы. Теория может быть как исходным пунктом научных исследований, так и их результатом. Поскольку «факты» воспринимаются и осмысляются посредством теоретического знания, они всегда теоретически нагружены. Поэтому «объективных» фактов, стоящих вне теоретических представлений, не существует.

Теория липидного строения биомембран: согласно этой теории липидный бислой — это основная структура мембраны, которая создает относительно непроницаемый барьер для большинства водорастворимых молекул. Впервые в 1925 году было показано, что липиды из мембран эритроцитов, экстрагированные ацетоном, образуют на поверхности воды пленку. При уменьшении площади пленки до образования сплошного мономолекулярного слоя оказалось, что площадь образовавшегося пятна в два раза больше площади поверхности эритроцита. Поскольку единственной мембраной эритроцитов является плазматическая мембрана, был сделан вывод, что липидные молекулы в ней должны быть организованы в виде непрерывного бислоя. Этот вывод оказался верным и оказал глубокое влияние на клеточную биологию. Доказательством того, что все биологические мембраны — это липидные бислои, было получено позднее при исследовании высокоупорядоченных биологических мембран с помощью дифракции рентгеновских лучей. Другим доказательством служит возможность механического расщепления их замороженных образцов на два липидных монослоя, как следует из данных, полученных с помощью электронной микроскопии методом замораживания-скалывания. Однако сторонники этого взгляда упускают из виду, что на поверхности протеиноидных микросфер, не содержащих липидов, также наблюдается под электронным микроскопом бислой, морфологически неотличимый от липидного бислоя (см. рис. 5E и Протеиноидные микросферы). Следовательно, бислой, видимый в электронный микроскоп, не доказывает, что он липидный. Кроме того, эритроцит —

высокоспециализированная клетка, состав мембраны которого сильно отличается от состава мембраны типичной клетки.

ория мембранного насоса: идея, изменившая представление о мембране, как о пассивной структуре, работающей по принципу сита. Насос стал активным элементом мембраны, который работает с использованием химической энергии. Результатом работы насоса является перемещение иона или молекулы против градиента концентрации. Наиболее известным из этих насосов является натриевый насос.

ория многослойной организации поляризованной воды (теория МОПВ): согласно этой теории Линга (предложенной в 1965 г.), последовательность диполей (групп NH и CO) полипептидной цепи комплементарна структуре молекулы воды. Это создает благоприятные стерические условия для адсорбции воды белком, при которой молекула воды поляризуется (возрастает ее дипольный момент) и, соответственно, возрастает прочность образуемых ею водородных связей. Увеличение стабильности водородных связей приводит к формированию устойчивых многослойных ассоциатов из молекул воды вокруг белка с развернутой конформацией. Регулярная структура полипептидной связи определяет и регулярную структуру слоев связанной воды. Долю структурированной воды в клетке определяет уровень АТФ. В клетке в состоянии покоя большая часть воды находится в связанном состоянии. Этой особенностью определяется концентрация свободных веществ в клетке: они вытесняются из клетки в среду. Структурированная вода выполняет барьерную функцию на поверхности клетки, ограничивает диффузию свободных веществ, включая саму воду, внутри ее. При активации клетки связанная вода десорбируется, увеличивая ее проницаемость. Десорбция воды может быть локальной (например, при потенциале действия) или охватывать всю клетку. Группы пептидной связи, освободившись от взаимодействия с водой, могут включаться в элементы вторичной структуры белка. Комплементарными воде могут быть цепи и других полимеров. Они также будут способны связывать и структурировать воду.

ория поляризации де Бура–Цвиккера (de Boer–Zwikker): физические свойства пленок существенно отличаются от свойств объемных образцов из того же вещества, что связано с влиянием как свободной поверхности, так и границы между пленкой и подложкой на процесс формирования пленки. Поверхностные и граничные слои часто характеризуются дальним порядком расположения ориентированных молекул, что ведет к образованию ориентированных квазикристаллических макроструктур. Экспериментально было установлено еще в 1930 г., что формирование ориентированных граничных слоев происходит в случае контакта поверхностно-активных веществ с поверхностью твердого тела. Исследования в этой области показали, что силовое поле твердого тела не экранируется первым слоем молекул жидкости. Но ориентация молекул полярной жидкости в первом приграничном к твердой поверхности слое играет роль «затравки», организующей ориентацию последующих слоев. Механизмом, реализующим этот эффект, может являться взаимодействие молекулярных диполей с образованием нейтральных в целом «цепочек», перпендикулярных к поверхности контакта. Подобные соображения стали основой эмпирической поляризационной теории де Бура и Цвиккера, показавшей, как локальное короткодействие, распространяясь в жидкости путем индуцирования дипольных моментов в соседних слоях, порождает дальнодействующие силы, упорядочивающие большие объемы вещества. Поэтому в граничных слоях структура жидкостей изменяется по сравнению с объемной, и тем сильнее, чем выше ее полярность и размер молекул растворенного в ней вещества. В то же время, граничные слои переходят по мере удаления от твердой подложки в объемную жидкость. Твердая поверхность рассматривается в теории де Бура и Цвиккера как подобие шахматной доски, ячейки которой представляют собой положительно и отрицательно заряженные центры (см. раздел 11.2).

Теория предсуществования потенциала покоя: одна из фундаментальных теорий клеточной физиологии, выдвинутая Эмилем Дюбуа-Реймоном (Emil DuBois-Reymond, 1818–1896), согласно которой электропотенциал между разными сторонами мембраны нервной или мышечной клетки существует у клетки и в состоянии покоя (потенциал покоя), а не возникает лишь в результате ее повреждения, как утверждал в своей теории альтерации ученик Дюбуа-Реймона Лудимар Герман (Ludimar Hermann) и названный им потенциалом повреждения или демаркационным потенциалом.

Теория сильных электролитов Дебая–Хюккеля: предложенная Питером Дебаем (P. Debye) и Эрихом Хюккелем (E. Hückel) в 1923 году статистическая теория разбавленных растворов сильных электролитов, согласно которой каждый ион действием своего электрического заряда поляризует окружение и образует вокруг себя некоторое преобладание ионов противоположного знака – так называемую ионную атмосферу. В отсутствие внешнего электрического поля ионная атмосфера имеет сферическую симметрию, и ее заряд равен по величине и противоположен по знаку заряду создающего ее центрального иона. В этой теории не уделено почти никакого внимания образованию пар противоположно заряженных ионов путем непосредственного взаимодействия между ними.

Теория усиления ассоциации противоионов при фиксации одного из них: одно из ключевых положений взглядов Линга, согласно которому фиксация в пространстве заряда или центра адсорбции значительно повышает прочность комплекса адсорбент-адсорбат (фиксированный анион-K^+, например) по причинам кинетического и электростатического характера. Кинетическая составляющая эффекта стабилизации состоит в том, что подвижность такого комплекса в пространстве будет значительно ограничена или даже равна нулю, что приведет к резкому снижению кинетической энергии молекулярных столкновений. (Подробности см. в разделе 10.1, п. 1). См. также Энтропийная составляющая усиления ассоциации противоионов в системе фиксированных зарядов.

Теория ферментативной реакции Михаэлиса-Ментен: центральным положением теории является утверждение, что для протекания ферментативной реакции необходимо образование фермент-субстратного комплекса. При этом, между свободным ферментом, свободным субстратом и фермент-субстратным комплексом устанавливается равновесие. Скорость реакции намного меньше скорости образования фермент-субтратного комплекса, поэтому расщепление субстрата практически не влияет на указанное равновесие. Зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса от концентраций фермента и субстрата соответствует изотерме адсорбции Ленгмюра. Это доказывает, что фермент действует как гетерогенный катализатор и реакция достигает максимальной скорости, когда весь фермент находится в комплексе с субстратом. Это условие выполняется, если реакция протекает при избыточной концентрации субстрата.

Теория фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ): количественная статистическая теория избирательного накопления в клетках и их моделях калия в присутствии натрия. Она основана на механизме усиленной ассоциации противоионов с фиксированными зарядами. В случае живой клетки и некоторых моделей фиксированным анионам присуща избирательность к калию, обусловленная более сильным электростатическим взаимодействием с ним, чем с Na^+. Это объясняется меньшими размерами гидратированного K^+ по сравнению с гидратированным Na^+ и *другими различиями* в характере ближнего взаимодействия этих катионов с фиксированными анионами. На основе теории фиксированных зарядов Линга возникла теория ассоциации-индукции.

Теория электролитической диссоциации Аррениуса: в 1887 году шведский физико-химик Сванте Аррениус (1859–1927) предложил теорию, согласно которой при растворении в воде многие кислоты, соли и основания самопроизвольно диссоциируют на положительные и отрицательные ионы, способные перемещаться независимо друг от друга. Удостоен за эту теорию Нобелевской премии по химии в 1903 году.

Триплетный адсорбционно-десорбционный путь (биллиардный и ротационный): если входящий катион (к примеру, Rb^+) прочно связывается с фиксированными анионами на поверхности клетки, то его диффузия в клетку будет медленной. Но проникновение в клетку Rb^+ существенно ускорится в результате взаимодействия с другими катионами, например, с K^+. Приближение K^+ к паре фиксированный анион-Rb^+ снизит энергию активации десорбции Rb^+ и его движение «по головам» фиксированных анионов станет более динамичным. Подобный триплетный путь называется ротационным, если активирующий катион (K^+) перемещается изнутри клетки навстречу Rb^+. Если же активирующий ион перемещается снаружи внутрь, как и входящий Rb^+, то такой триплетный путь называется биллиардным (см. рис. 36).

ТФЗЛ: см. Теория фиксированных зарядов Линга.

Унифациальные клетки: клетки, мембрана которых одинакова на всем своем протяжении (мышечные, нервные клетки, эритроциты).

Уравнение Трошина: уравнение А1 в приложении.

Уравнение химических реакций Вант-Гоффа: в 1884 году Якоб Хендрик Вант-Гофф (Vant-

Hoff, Jacobus Henricus, 1852–1911) вывел одно из основных уравнений химической термодинамики — уравнение изохоры, выражающее зависимость константы равновесия от температуры и теплового эффекта, а также уравнение химической изотермы, выражающее зависимость химического сродства от константы равновесия реакции при постоянной температуре. Изобара и изохора Вант-Гоффа связывают изменение константы химического равновесия с тепловым эффектом реакции в изобарных и изохорных условиях соответственно. Очевидно, что чем больше по абсолютной величине тепловой эффект химической реакции, тем сильнее влияет температура на величину константы равновесия. Если реакция не сопровождается тепловым эффектом, то константа равновесия не зависит от температуры.

Усиление ассоциации противоионов при перекрытии электрических полей: катионообменная смола как типичная система фиксированных зарядов содержит только фиксированные анионные центры. Каждый катион при этом испытывает электростатическое притяжение не только ближайшего фиксированного аниона, но и других фиксированных анионов. Такие перекрывающиеся взаимодействия лучше удерживают катион. Этот вывод подтверждается характером взаимодействий в такой совершенной системе фиксированных зарядов, как кристалл NaCl, в котором каждый ион Na^+ окружен шестью ионами Cl^- и наоборот. В этом случае сила перекрывающихся взаимодействий Na^+ с противоионами выше, чем между двумя ионами Na^+ и Cl^- (что описывается константой Маделунга — потенциалом иона в поле других ионов). В отличие от рассмотренных систем, клетка (протоплазма) в состоянии покоя представляет собой, как правило, амфотерную систему фиксированных зарядов, так как содержит фиксированные заряды обоих знаков. В результате поле, действующее на свободный катион со стороны фиксированного аниона, может ослабляться ближайшими фиксированными катионами. Однако в клетке фиксированные анионы и катионы распределены, как правило, неравномерно [15, Fig. 15.5]. Даже на протяжении одной молекулы белка плотность распределения фиксированных зарядов может сильно различаться [180, Fig. 3.5]. Это означает, что в клетке существуют реальные условия для перекрытия полей взаимодействия фиксированных анионов с K^+, например, что усиливает его связывание.

Фазовый переход (фазовое превращение): в термодинамике — переход вещества из одной термодинамической фазы в другую при изменении внешних условий. С точки зрения движения системы по фазовой диаграмме при изменении её интенсивных параметров (температуры, давления и т. п.), фазовый переход происходит, когда система пересекает линию, разделяющую две фазы. Поскольку разные термодинамические фазы описываются различными уравнениями состояния, всегда можно найти величину, которая скачкообразно меняется при фазовом переходе. Поскольку разделение на термодинамические фазы — более мелкая классификация состояний, чем разделение по агрегатным состояниям вещества, то далеко не каждый фазовый переход сопровождается сменой агрегатного состояния. Однако любая смена агрегатного состояния есть фазовый переход. Наиболее часто рассматриваются фазовые переходы при изменении температуры, но при постоянном давлении (как правило, равном 1 атмосфере). Именно поэтому часто употребляют термины «точка» (а не линия) фазового перехода, температура плавления и т. д.

Физиология клетки: наука, изучающая функционирование клеток, регуляцию клеточных функций, реакцию клеток на внешние воздействия, адаптацию клеток к условиям окружающей среды, взаимодействие клеток друг с другом.

Физическая природа живого состояния: согласно теории ассоциации-индукции, физической основой жизни является протоплазма в высокоэнергетическом (с запасом энергии) состоянии и с низкой энтропией. В состоянии функциональной активности запас энергии протоплазмы уменьшается, а энтропия возрастает. Энергия, выделившаяся при переходе клетки в активное состояние, идет на совершение биологической работы.

Фиксированный анион: отрицательно заряженная функциональная группа, являющаяся частью белка, другой макромолекулы или системы фиксированных зарядов.

Фиксированный заряд: химическая группа, фиксированная в пространстве и несущая положительный или отрицательный заряд.

Фиксированный катион: положительно заряженная функциональная группа, являющаяся частью белка, другой макромолекулы или системы фиксированных зарядов.

Центр адсорбции: участок твердого тела или макромолекулы, способный адсорбировать ион или молекулу.

Цитоплазма: часть протоплазмы эукариотических клеток без ядра.

ЭАКА: электроноакцепторный кардинальный адсорбат.

ЭДКА: электронодонорный кардинальный адсорбат.

ЭИКА: электроноиндифферентный кардинальный адсорбат.

Экстравертные модели: развернутые или полноразвернутые белки или линейные полимеры с доступными для непосредственного взаимодействия с водой атомами кислорода или азота, несущими по свободной паре электронов. Последовательность диполей в полипептидной цепи белка комплементарна структуре молекулы воды. Требование комплементарности должно соблюдаться и при выборе линейных полимеров.

Электрогенный насос: гипотеза, согласно которой в состав поверхностной мембраны входят молекулярные насосы (натриевая помпа — исторически первая), способные вместе и по отдельности осуществлять асимметричный транспорт заряженных частиц (ионов) внутрь клетки и из клетки в окружающую среду. В результате неравномерного распределения зарядов между клеткой и средой, поддерживаемого энергией метаболизма, на границе раздела, — то есть на мембране, — возникает разность электрических потенциалов.

Электронная плотность: плотность вероятности обнаружения электрона в данной точке пространства. Атом водорода — наименьший из всех атомов. В состав его ядра входит лишь один протон, несущий единичный положительный заряд. Такой атом является системой из двух зарядов: положительно заряженного ядра, окруженного симметричной *сферой отрицательного электричества* — электроном, который из-за быстрого перемещения изображается в виде облака (у атома водорода электронная плотность одинакова в любой точке сферы). В достаточно сложных молекулах электронная плотность, как правило, несимметрична, а форма «облака» может меняться. Например, при замещении трех атомов водорода метильной группы уксусной кислоты на чрезвычайно электроотрицательные атомы хлора, ее константа диссоциации (pK) снижается с 4,76 почти до 1 в результате индуктивно вызванного снижения силы притяжения H^+ к карбоксильной группе; сила кислоты при этом возрастает. Существуют две простые, но логичные точки зрения на это явление. По одной из них, увеличение силы кислоты отражает смещение плотности распределения единственного избыточного электрона карбоксильного кислорода в сторону от H^+, и в результате сила притяжения протона ослабевает. В этом смещении состоит физический смысл величины *c*, измеряемой в единицах расстояния (Å). Согласно другой точке зрения, причиной этого явления служит не смещение, а «разжижение» «облака отрицательного электричества», то есть снижение *электронной плотности* вокруг однозарядного атома кислорода.

Электронная поляризация-деполяризация химической связи: поляризация—асимметрия (смещение) электронной плотности ковалентной связи. Величина смещения (поляризация-деполяризация) может меняться в зависимости от взаимодействий, в которые вступает молекула. Поляризация связей вносит существенный вклад в электрический дипольный момент молекулы. Дипольный момент поляризованной связи может вызывать поляризацию соседних связей в молекуле (индуктивный эффект). Такие взаимодействия могут носить циклический, повторяющийся характер.

Электроноакцепторный кардинальный адсорбат (ЭАКА): кардинальный адсорбат, выступающий в роли акцептора электрона при взаимодействии с кардинальным центром адсорбции.

Электронодонорная способность: легкость, с которой радикал отдает электрон связавшей его молекуле. Метильная группа CH_3 обладает более высокой электронодонорной способностью по сравнению с атомом водорода. По этой причине уксусная кислота CH_3-COOH обладает большим сродством к H^+ и диссоциирует слабее (pK = 4,76), чем муравьиная кислота H-COOH (pK = 3,75), у которой в качестве донора электрона выступает атом водорода.

Электронодонорный кардинальный адсорбат (ЭДКА): кардинальный адсорбат, отдающий электроны (кардинальному) центру адсорбции при связывании с ним.

Электроноиндифферентный кардинальный адсорбат (ЭИКА): кардинальный адсорбат, который не обладает ни электронодонорными, ни электроноакцепторными свойствами при взаимодействии с центром связывания (адсорбции).

Электроотрицательность атома: количественная характеристика способности атома в молекуле притягивать к себе электроны. К примеру, хлор более электроотрицателен,

чем водород. Понятие электроотрицательности атомов было введено Л. Полингом.

Элементарная живая машина: минимальный молекулярный комплекс (белок–вода–K^+–АТФ), обладающий, согласно теории ассоциации-индукции, основными физическими свойствами живой клетки.

Энтропийная составляющая усиления ассоциации противоионов в системе фиксированных зарядов: закон макроскопической электронейтральности исключает выход сколько-нибудь значительного количества противоионов из системы фиксированных зарядов. В связи с этим противоионы остаются в ограниченном объеме системы фиксированных зарядов вместо того, чтобы рассеиваться в гораздо большем объеме окружающей среды. Иначе говоря, свободные ионы ассоциируются с системой фиксированных зарядов. Поскольку энтропия системы, особенно ее изменение, напрямую зависит от объема, доступного противоионам, то высокая степень ассоциации свободных ионов с фиксированными означает снижение энтропии системы. См. Теория усиления ассоциации противоионов при фиксации одного из них.

Энтропия диссоциации: диссоциация адсорбированного вещества, распад ассоциата ионов и молекул сопровождается ростом энтропии системы.

Энтропия: термодинамическая функция состояния системы, представляющая собой меру ее неупорядоченности. Является мерой количества энергии в физической системе, которая не может быть использована для выполнения работы. Энтропия S прямо пропорциональна теплосодержанию H (или H_{rev}) и обратно пропорциональна абсолютной температуре T. Таким образом, $S = H_{rev}/T$. В статистической механике энтропия связана с количеством комплексионов Ω (числом возможных микросостояний системы) соотношением $S = kT \cdot \ln \Omega$, где k – постоянная Больцмана.

Эффективное столкновение: в водном растворе, к примеру, при комнатной температуре молекулы воды и других веществ постоянно перемещаются вследствие теплового движения, сталкиваясь друг с другом. Если молекулы (частицы) находятся в ассоциированном состоянии, и столкновение с ними других молекул (частиц) разрушает эти ассоциаты, то такие столкновения мы будем называть эффективными.

Эффекторный центр: один из группы реактивных центров, физиологически значимое изменение которого происходит при связывании (адсорбции) определенной молекулы с рецептором, пространственно удаленным от эффекторного центра.

Явление кооперативности: Ральф Фаулер (Ralph Fowler) впервые применил термин «кооперативные переходы» к изменениям состояния системы, взаимодействие элементов которой усиливается с течением процесса изменения так, что существенно ускоряет его ход в целом (положительная кооперативность). Таким образом, сила взаимодействия атомов или молекул возрастает по мере нарастания изменений в системе, делая их коллективно согласованными. Кооперативность нельзя объяснить простым сложением свойств отдельных атомов и молекул, ее природа — в кооперации элементов системы, в результате которой система ведет себя как единый ансамбль, подчиняющийся определенному закону изменения.

ЯМР, ядерно-магнитный резонанс: был открыт в 1946 г. Ф. Блохом (F. Bloch) и Э. М. Парселлом (E. M. Purcell), за что они были удостоены Нобелевской премии по физике в 1952 г. Суть явления заключается в том, что при определенных условиях вещество, состоящее из атомов, обладающих ненулевым спином, может резонансно поглощать/испускать электромагнитную энергию в радиочастотном диапазоне. Эффект наблюдается в скрещенных магнитных полях, одно из которых является сильным постоянным полем, а второе — слабым переменным, изменяющимся с частотой в радиодиапазоне. Поскольку частота, на которой наблюдается ядерно-магнитный резонанс, определяется свойствами ядра и его ближайшего окружения, то ЯМР может использоваться для идентификации атомов/групп атомов и химических связей. Как правило, для наблюдения резонанса используются атомы водорода H^1 и группы атомов, содержащие его. Начиная с 1950-х гг. ядерно-магнитный резонанс широко используется для физического и химического молекулярного анализа, а с конца 1970-х ЯМР стал одним из основных методов структурного анализа сложных биологических макромолекул, в том числе белков (например, можно определить в свободном состоянии находятся исследуемые молекулы или в связанном). Вначале ЯМР использовали физики для измерения ядерного момента различных элементов. Затем химики приспособили его для исследования строения молекул и т. д. А после создания теории поляризованных полимолекулярных слоев клеточной воды (в рамках теории ассоциации-индукции), ЯМР помог проверить эту теорию. Кроме того, методы ядерного магнитного резонанса используются в магнитно-резонансной томографии для визуализации внутренних органов человека с диагностической целью.

Использованная литература

1. Биологический энциклопедический словарь. Гл. ред. М. С. Гиляров. М., «Советская энциклопедия», 1986.

2. Словарь физиологических терминов. Гл. ред. О. Г. Газенко. М., «Наука», 1987.

3. Киреев В. А. Курс физической химии. М., Государственное научно-техническое издательство химической литературы. 1955.

4. Химический энциклопедический словарь. Гл. ред. И. Л. Кнунянц. М., «Советская энциклопедия», 1983.

5. Физическая энциклопедия. Гл. ред. А. М. Прохоров. М., «Большая Российская энциклопедия», 1988—1999. Т. 1—5.

Кроме того, были использованы Интернет-ресурсы.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

(работы Г. Линга, опубликованные в журналах Physiological Chemistry and Physics и Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR, доступны для скачивания с веб-сайтов http://gilbertling.com или http://www.physiologicalchemistryandphysics.com)

(1) Schwann, T. 1839 *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimung in der Struktur and dem Wachstum der Thiere und Pflanzen* (Berlin); republished in Ostwald's "Kassiker" (Leipzig, 1910), pp, 60–158. See also Ref. 3 for valuable review in English on Schwann's work.
(2) Dujardin, F. 1835 Annales des sciences naturrelles; partie zoologique, 2d sér., 4:364.
(3) Hall, T.S. 1969 *Ideas of Life and Matter; Studies in the History of General Physiology 600 B.C.–1900 A.D.,* Vol 2, The University of Chicago Press, Chicago.
(4) Ledbetter, M.C. and Porter, K.R. 1970 *Introduction to the Fine Structure of Plant Cells,* Springer, New York.
Dodge, J.D. 1973 *The Fine Structure of Algal Cells*, Academic Press, New York.
(5) Oken, L. 1805 Die Zeugung (cited by C. Singer in his *A History of Biology to About the Year 1900: A General Introduction to the Study of Living Things*, Abelard-Schuman, London.)
———. 1810 *Lehrbuch der Naturphilosophie*, Jena.
(6) von Nägeli, K. 1844 Zeitschr. wiss. Bot. 1: 34.
(7) von Mohl, H. 1846 Bot. Z. 4:73, 84.
(8) Cohn, F. 1847 *Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae* [of Halle] 22: 605. For partial English transl. See Huxley, T.H., 1872, The Contemporary Review 19: 34.
(9) Remak, R. 1852 Müller's Arch f. Anatomie, Physiologie, und wissenschaftlische Medizin (Berlin) p. 49.
(10) Leydig, F. 1857 *Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Thiere*, (Frankfurt) pp. 14–15.
(11) Schultze, M. 1861 Müller's Archiv f. Anatomie. Physiologie und wissenschftliche Medicin (Berlin) p. 1. For transl. [of a part], see M. and V. Hamburger and T.S. Hall, in T.S. Hall, *A Source Book in Animal Biology* (New York, 1951, 1964), p. 449.
(12) Wilson, E.B. 1928 *The Cell in Development and Heredity*, 3rd ed.Macmillan, New York.
(13) Glasstone, S. 1946 *Textbook of Physical Chemistry*, 2nd ed., D. Van Nostrand, New York.
(14) van't Hoff, J.H. 1887 Z. phys. Chem. 1: 481.
———. 1888 Phil. Mag. 26: 81.
(15) Ling, G.N. 1984 *In Search of the Physical Basis of Life*, Plenum Publ. Co., New York.
(16) Dutrochet, R.J.H.1824 *Recherche anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux et sur la motilité*, (Paris).
———. 1827 Ann. Chim et Physique. 34:393; 35: 393.
(17) Traube, M. 1867 Arch. Anat. Physiol. u. wiss. Med. 87–128; 129–165.
(18) Pfeffer, M. F. 1877 (1st ed.) 1921 (2nd ed.) *Osmotische Untersuchungen: Studien zur Zell-Mechanik*, Engelmann, Leipzig.
———. 1985 *Osmotic Invesigations: Studies on Cell Mechanics* (Eng. Transl. by G.R. Kepner and Ed. J. Stadelmann), Van Nostrand Reinhold, New York.
(19) Bernstein, J. 1902 Pflügers Arch. ges. Physiol. 92: 521.
(20) Donnan, F. 1911 Z. Elektrochem. 17: 572.
———. 1924 Chem. Rev, 1: 73.
(21) Overton, E. 1899 Vierteljahrschr. Naturforsch. Ges. Zürich 44: 88.
(22) Chambers, R. and Chambers, E.L. 1961 *Explorations into the Nature of the Living Cell*, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass. p. 9.
(23) Ling, G.N. 1973 Physiol. Chem. Phys. 5: 295.
(24) de Vries, H. 1871 Arch. néerl. sci. 6: 117.
(25) Overton, E. 1902 Pflügers Arch ges Physiol. 92: 115.

(26) Hamburger, H, J. 1887 Arch. für Anatomie und Physiologie S 41.
———. 1889 Z. Biol. 26: 414.
(27) von Hanstein, J. 1880 *Das Protoplasm als Träger des pflanzlichen und thierischen Lebensverrichtungen*, Sammlung von Vorträgen für das deutsche Volk, Heidelberg, p. 169.
(28) de Vries, H. 1884 Jahrb. wiss. Bot. 14: 427.
(29) Höfler, K. 1918 Ber. deutsch. bot. Ges. 36: 414.
(30) Lucké, B. and McCutcheon, M. 1932 Physiol. Rev. 12: 68.
(31) Höfler, K. 1926 Planta 2: 454.
———. 1930 Jahrb. wiss. Bot. 73: 300.
———. 1931 Ber. dtsch. bot. Ges. 49: 19.
———. 1932 Protoplasma 15: 462.
(32) Plowe, J. Q. 1931 Protoplasma 12: 196, 221.
Strugger, S. 1932 Ber. dtsch. bot. Ges. 50: 24.
Ullrich, H. 1939 Arch. exp. Zellforsch. 22: 496.
(33) Nasonov, D. N. and Aizenberg, E. I. 1937 Biol. zh. (In Russian) 6: 165, see also Ref. 92, p. 48 and Ref. 86, p. 111.
(34) Камнев И. Е. 1938. Проницаемость поперечнополосатых мышц лягушки для сахаров. Арх. анат., гистол. и эмбр., 19 (1—2): 145—160., Изд-во Академии наук СССР, 426 с.
(35) Ling, G.N., Neville, M.C., Will, S. and Shannon, P. 1969 Physiol. Chem. Phys. 1:85.
Ling, G.N., Walton, C.L. and Ochsenfeld, M.M. 1981 J. Cell. Physiol. 106: 385.
(36) Gérard, P. 1912 C.R. 154: 1305.
Wu, H. and Yang, E.F. 1931 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 29: 248.
Kaplanskii, S. Ya. and Boldyreva, N. 1934 Fisiol. Zh. 17: 96.
Cohn, W. and Cohn, E. F. 1939 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 41: 445.
Heppel, L. A. 1939 Amer. J. Physiol. 127: 385.
Steinbach, B. 1940 J. Biol. Chem. 133: 695.
(37) von Nägeli, K. 1855 *Pflanzenphysiol. Untersuchungen* (C. Nägeli and C. Cramer, eds.) Hefl. I, Schulthese, Zürich.
(38) Kühne, W. 1864 *Untersuchungen über das Protoplasma*, Engelmann, Leipzig.
(39) Pfeffer, Wilh. 1897 *Pflanzenphysiologie*, 2te Aufl., 2 vols., Engelmann, Leipzig.
(40) Kite, G.L. 1913 Biol. Bull. 25: 1.
(41) Lillie, R. S. 1923 *Protoplasmic Action and Nervous Action*, 1st ed., Univ. of Chicago Press, Chicago.
(42) Cameron, I. L. 1988 Physiol. Chem. Phys. and Med. NMR 20: 221.
(43) Ostwald, Wilh. 1890 Z. physik. Chem. 6: 71.
(44) Boyle, P.J. and Conway, E.J. 1941 J. Physiol.(London) 100: 1.
(45) Hutter, O. F. and Padsha, S. M. 1959 J. Physiol. (London) 146: 117.
(46) Lorkovic, H. and Tomanek, R.J. 1977 Amer. J. Physiol. 232: C109.
(47) Hodgkin, A.L. 1951 Biol. Rev. 26: 339.
———. 1971 *The Conduction of the Nervous Impulse*. Liverpool Univ. Press, Liverpool.
(48) Ling, G. N. 1982 Physiol. Chem. Phys. 14: 47.
(49) Ling, G. N. 1997 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 29:123.
(50) Netter, H. 1928 Pflüger's Arch. ges. Physiol. 220: 107.
(51) Mond, R. and Amson, K. 1928 Pflüger's Arch. Ges. Physiol. 220: 69.
(52) Skou, S.C. 1957 Biochem. Biophys. Acta 23: 394.
———. 1965 Physiol. Rev. 45: 596.
———. 1988 Methods of Enzymol. 156: 1.
———. 1989 Biochem. Biophys. Acta 1000: 435.
(53) Graham, T. 1861 Philos. Trans. Roy. Soc. (London) 151: 183.
(54) Williams, L. P. 1965 *Michael Faraday: A Biography*, Da Capa Press, Plenum Publ. Co., New York.
(55) Bigelow, S. L. and Bartell, F. E. 1909 J. Amer. Chem. Soc. 31: 1194.
Bigelow, S.L. and Hunter, F. W. 1911 J. Phys. Chem. 15: 367.
Bartell, F.E. 1911 J. Phys. Chem. 15: 318.
(56) Findlay, A. 1919 *Osmotic Pressure*, Longmans, Green & Co., London.
(57) L'Hermite, M. 1855 Annales chim. phys. 43: 420.
(58) Pauli, W. and Rona, P. 1902 . Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 1902: 114.

(59) Bungenberg de Jong, H, G. and Kruyt, H. R. 1929 Proc. Koninkl. Nederland. Akad. Wetenschap., Amsterdam 32: 849.
(60) Glicksman, M. 1969 *Gum Technology in the Food Industry*, Academic Press, New York.
(61) Bungenberg de Jong, H. G. 1949 in *Colloid Science, Vol. II Reversible Systems* (H. R. Kruyt, ed.) Elsevier Publ. Co., New York.
(62) Lepeschkin, W.W. 1926 Ber. dtsch. bot. Ges. 44: 7.
———. 1930 Protoplasma 9: 269, p. 275.
(63) Kuroda, K. 1964 in *Primitive Motile Systems in Cell Biology* (R.D. Allen and N. Kamiya eds.), Academic Press, New York, p. 31.
(64) Gortner, R. A. 1938 *Outline of Biochemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York.
(65) Houwink, R. 1949 in *Colloid Science* Vol. II *Reversible Systems*, Elsevier Publ. Co., New York, pp. 19–45.
(66) Staudinger, H. 1940 *Organische Kolloidchemie*, Braunschweig.
(67) Staudinger, H. 1920 Ber. 53: 1073.
(68) Ling, G. N. 1994 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 26: 121.
(69) Negendank, W. and Shaller, C. 1982 Bioch. Biophys. Acta 688: 316.
(70) Holleman, L.W.J., Bungenberg de Jong, H. G. and Modderman, R.S.T. 1934 Kolloid Beih. 39: 334.
(71) Bungenbeg de Jong, H. G. 1932 Protoplasma 15: 110.
(72) Huxley, T.H. 1869 "On the Physical Basis of Life", Fortnightly Review 5: 129.
(73) Abderhalden, E. 1898 Z. physiol. Chem. 25: 65.
(74) Ponder, E. 1948 *Hemolysis and Related Phenomena*, Grune & Stratton, New York.
(75) Katz, J. 1896 Arch. ges. Physiol., 63: 1.
(76) Hamburger, H.J. 1904 *Osmotische Druck und Ionenlehre*, Vol. 3, Bergmann, Wiesbaden.
(77) Moore, B. 1906 *Recent Advances in Biochemistry* (L. Hill, ed.) Arnold, London, pp. 139–195.
Moore, B. and Roaf, H. E. 1908 Biochem. J. 3: 55.
(78) Fischer, M. H. 1909 *Oedema*, Trans. College Physicians, 3rd Ser. Vol. 31, Philadelphia, p. 457–657.
———. 1910 *Das Oedem*, Steinkopf, Dresden.
———. 1913 *Introduction to Colloidal Physiology* I. *Oedema* [in Russian], Moscow, pp. 1–331.
———. 1921 *Oedema and Nephritis*, 3rd ed., Wiley, New York.
(79) Ostwald, Wo. 1940 "Martin Fischer upon His Sixtieth Birthday" J. Med. 20: 436.
(80) Gortner, R. A. 1930 Trans. Faraday Soc. 26: 678.
(81) Hill, A. V. 1930 Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B. 106: 477.
Hill, A. V. and Kupalov, P. S. 1930 Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B. 106: 445.
(82) McLeod, J. and Ponders, E. 1936 J. Physiol. (London) 86: 147.
Hunter, F. R. and Parpart, A. K. 1938 J. Cell. Comp. Physiol. 12: 309.
(83) Ernst, E. 1963 *Biophysics of the Striated Muscle*, Hungar. Acad. Sci., 2nd ed., Budapest.
(84) Macallum, A.B. 1905 J. Physiol. (London) 32: 95.
Menten, M. L. 1908 Trans. Canad. Inst. 8: 403.
(85) Tigyi, J., Kellermayer, M. and Hazlewood C.F. 1991 *The Physical Aspect of the Living Cell*, Akad. Kiadó, Budapest.
(86) Насонов Д.Н. 1962. Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение. М.-Л., Изд-во Академии наук СССР. 426 с.
(87) Hermann, L. 1871 Pflügers Arch. ges. Physiol. 4: 163.
———. 1879 *Handbuch der Physiologie*, Vogel Verlag, Leipzig, Band II Theil I
(88) Graham, J. and Gerard, R.W. 1946 J. Cell. Comp. Physiol 28: 99.
Ling, G. N. and Gerard, R. W. 1949 J. Cell. Comp. Physiol. 34: 383.
Weidemann, S. 1971 in *Research in Physiology*, (F. F. Kao, K. Koizumi and M Vassale, eds.), Aulo Gaggi Publ., Bologna, pp. 3–25.
(89) DuBois-Reymond, E. 1848-1849 *Untersuchungen über Thierische Elektrizität*, Vol. I and II, Reimer, Berlin.
(90) Трошин А.С. 1956. Проблема клеточной проницаемости. М.-Л., Изд-во Академии наук СССР. 474 с.
(91) Troshin, A.S. 1958 *Das Problem der Zellpermeabilität*, Gustav. Fischer Verlag, Jena.

(92) Troshin, A.S. 1966 *Problems of Cell Permeability*, (English Transl. by M.G. Hell and N. D. Widdas), Pergamon Press, London.
(93) Трошин А.С. 1948. Биохимия 13: 253.
Трошин А.С. 1951a. Бюлл. эксп. биол. и мед., 31: 180.
Трошин А.С. 1951b. Бюлл. эксп. биол. и мед., 31: 285.
Трошин А.С. 1951c. Бюлл. эксп. биол. и мед., 32: 162.
Трошин А.С. 1951d. Бюлл. эксп. биол. и мед., 33: 228.
Трошин А.С. 1951e. Биохимия, 16: 164.
Трошин А.С. 1952. Бюлл. эксп. биол. и мед., 34: 59.
(94) Ling, G. N. 1951 Amer. J. Physiol. 167: 806.
(95) Ling, G. N. and Gerard, R. W. 1949a J. Cell. Comp. Physiol. 34: 383.
———. 1949b J. Cell. Comp. Physiol. 34: 397.
———. 1949c J. Cell. Comp. Physiol. 34: 413.
Ling, G.N. and Woodbury, J. W. 1949 J. Cell. Comp. Physiol. 34: 407.
(96) Ling, G. N. 1952 in *Phosphorus Metabolism*, Vol. II, (W.D. McElroy and B. Glass, eds.), The Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, p. 748.
(97) Guggenheim, E. A. 1950 *Thermodynamics, An Advanced Treatise for Chemists and Physicists*, Interscience Publ., Inc., 2nd ed., New York, pp. 330–331.
(98) Ling, G. N. 1962 *A Physical Theory of the Living State: the Association-Induction Hypothesis*, Blaisdell Publ. Co., Waltham, Mass.
(99) Bugarszky, S. and Liebermann, L.1898 Arch. ges. Physiol. 72: 51.
Michaelis, L. and Rona, P. 1908 Biochem. Z. 14: 476.
Pauli, W. and Samec, M. 1909 Biochem Z. 17: 235.
Erdös, T. 1946 Hung. Acta Physiol. 1: 33.
Beatley, E. H. and Klotz, I. M. 1951 Biol. Bull. 101: 215.
Carr, C.W. 1956 Arch. Biochem. Biophys. 62: 476.
Lewis, M. S. and Saroff, H. A. 1957 J. Amer. Chem. Soc. 79: 2112.
(100) Bethe, A. and Toropoff, T. 1914 Z. Phys. Chem. 88: 686.
———. 1915 Z. Phys. Chem. 89: 597.
Mond, R. 1927 Pflüger's Arch. Ges. Physiol. 217: 618.
Teorell, T. 1953 Progr. Biophys. Biophys. Chem. 3: 305.
Meyer, K. H. and Sievers, J. F. 1936 Helv. chim. Acta 19: 649, 665.
Sollner, K. 1949 J. Phys. Colloid. Chem. 53: 1211.
(101) Gunn, R. B. 1979 in *Membrane Transport in Biology*, Volume II (D. C. Tosteson, ed.), Springer-Verlag, New York, Chapt. 2, p. 61.
(102) Arrhenius, S. 1887 Z. physk. Chem. 1: 631.
(103) Debye, P. and Hückel, W. 1923 Phys. Z. 24: 185.
(104) Ives, D.J.G. and Janz, G. J. 1961 *Reference Electrodes* , Academic Press, New York.
(105) Sollner, K. 1949 J. Phys. Colloid. Chem. 53: 1211.
(106) Ling, G. N. 1960 J. Gen. Physiol. 43: 149.
(107) Ling, G. N. 1992 *A Revolution in the Physiology of the Living Cell*, Krieger Publ. Co., Malabar, Fl.
(108) Speakman, J. B. and Hirst, M. C. 1931 Nature 127: 665.
(109) Riseman, J. and Kirkwood, J. G. 1948 J. Amer. Chem. Soc. 70: 2820.
(110) Debye, P. and Pauling, L. 1925 J. Amer. Chem. Soc. 47: 2127.
(111) Gorin, M. 1939 J. Chem. Phys. 7: 405.
Ling, G.N. 1957 in *Metabolic Aspect of Transport across Cell Memebrane*, (Q.R. Murphy, ed.), Univ. Wisconsin Press, Madison, pp. 181–186.
(112) Ling, G. N. 1978 J. Physiol. (London) 280: 105.
(113) Ling, G. N. 1973 Physiol. Chem. Phys. 5: 295.
(114) Ling, G. N. and Zhang, Z. L. 1984 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 16: 221.
(115) Huang, H. W., Hunter, S.H., Warburton, W. K. and Moss, S.C. 1979 Science 204: 191.
(116) Ling, G. N. and Ochsenfeld, M. M. 1966 J. Gen. Physiol. 49: 819.
(117) Langmuir, I. 1916 J. Amer. Chem. Soc. 38: 2221.
———. 1918 J. Amer. Chem. Soc. 40: 1361.
(118) Hoare, D. G. and Koshland, D. E. 1967 J. Biol. Chem. 242: 2447.
Khorana, H. G. 1953 Chem. Rev. 53: 145.

(119) Ling, G. N. 1989 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 21: 13.
(120) Stecher, P. G., Windholz, M., Leahy, D. S., Bolton, D. M. and Eaton, L. G., (eds) 1968 *The Merck Index,* 8th ed. Merck and Co., Rahway, N.J.
(121) Tanford, C. 1962 Adv. Protein Chem. 17: 69.
(122) Ling, G.N. and Ochsenfeld, M.M. 1991 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 23: 133.
(123) Engelmann, T. W. 1873 Pflüger's Arch. Ges. Physiol. 7: 155.
Hanson, J. and Huxley, H. E. 1953 Nature 172: 530.
(124) Ling, G. N., 1977 Physiol. Chem. Phys. 9: 319.
(125) Edelmann L. Potassium adsorption sites in frog muscle visualized by cesium and thallium under the transmission electron microscope. Physiol Chem. Phys. 1977; 9(4—5): 313—317.
(126) Edelmann, L. 1978 Microsc. Acta Suppl. 2: 166.
———. 1980 Physiol. Chem. Phys. 12: 509.
———. 1980a Histochem. 67: 233.
———. 1980–1981 Intern. Cell Biol. (H. G. Schweiger, ed.) Springer, Berlin, p. 941.
———. 1983 Physiol. Chem Phys. & Med. NMR 15: 337.
———. 1984 Scanning Electron Microscopy II: 875.
———. 1986 in *Science of Biological Specimen Preparation*, (M. Müller, R. P. Becker, A. Boyde and J. J. Wolosewick, eds.) SEM Inc., AMF O'Hare, Chicago, Ill., p. 33.
———. 1986a Scanning Electron Microscopy, SEM Inc., Chicago, Ill. IV: 1337.
———. 1988 Scanning Microscopy 2: 851.
———. 1991 Scanning Microscopy 5: S-75.
———. 1994 Scanning Microscopy 8: 67.
———. 1996 Scanning Microscopy 10: 295.
———. 1998 Scanning Microscopy 12: 1.
(127) Gregor, H. 1948 J. Amer Chem. Soc. 70: 1293.
———. 1951 J. Amer. Chem.Soc. 73: 642.
(128) Fletcher, W.M. and Hopkins, F.G. 1907 J. Physiol.(London) 35: 247.
(129) Edelmann, L. 1989 Scanning Microscopy 3: 1219.
(130) Gulati, J., Ochsenfeld, M.M. and Ling, G. N., 1971 Biophys. J. 11: 973.
(131) Ling, G. N., Miller, C. and Ochsenfeld, M. M. 1973 Ann. N.Y. Acad. Sci. 204: 6.
(132) Lipmann, F. 1941 Adv. Enzymol. 1: 99.
(133) Podolsky, R. J. and Morales, M. F. 1956 J. Biol. Chem., 218: 945.
(134) George, P. and Rutman, R. J. 1960 Prog. Biophys. Biophys. Chem. 10: 1.
(135) Baker, P. F., Hodgkin, A. L. and Shaw, T. I. 1961 Nature 190: 885.
Oikawa, T., Spyropoulos, C. S., Tasaki, I. and Teorell, T. 1961 Acta Physiol. Scand. 52: 195.
(136) Ling, G. N., 1965 Persp. Biol. Med. 9: 87.
(137) Baker, P. F., Foster, R. F., Gilbert, D.S., and Shaw, T.I. 1971 J. Physiol. (London) 219: 487.
(138) Ling, G. N. and Negendank, W. 1980 Persp. Biol. Med. 23: 215.
(139) Ling, G. N., and Tucker, M. 1983 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 311.
(140) Ling, G. N., Zodda, D. and Sellers, M. 1984 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 16: 381.
(141) Cope, F. W. 1967 Bull. Math. Biophys. 29: 583.
(142) Murphy, Q. R. (Ed.) 1957 *Metabolic Aspects of Transport across Cell Membrane*, Univ. of Wisconsin Press, Madison.
(143) Bregman, J. I. 1953 Ann. N. Y. Acad. Sci. 57: 125.
(144) Teunissen, P. H., Rosenthal, S. and Zaayer, W. H., 1938 Rec. Trav. Chim. Pays Bas. 57: 929.
(145) Ling, G. N., 1955 Fed. Proc. 14: 93.
(146) Eisenman, G., Rudin, D. O. and Casby, J. U. 1957 Paper presented at the 10th Annual Conference on Electrical Techniques in Medicine and Biology of the A.I.E.E., I.S.A. and I.R.E., Boston, November 1957, not printed.
Rudin, D.O., and Eisenman, G. 1959 Abstract, 21st Intern. Congress Physiol. Sciences, p. 237.
(147) Ling, G. N. 1960 J. Gen. Physiol. 43 (Suppl).: 149.
(148) Eisenman, G. (ed.) 1967 *Glass Electrodes for Hydrogen and Other Cations; Principles and Practices*, Marcel Dekker, New York.
(149) Anfinson, C. B. 1962 Brookhaven Symp. Biol. 15: 184.
———. 1967 Harvey Lectures 61: 95.
(150) Ling, G. N. 1986 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 18: 3.
(151) Chou, P. Y. and Fasman, G. D. 1978 Adv. Enzymol. 47: 45.
(152) Tanaka, S. and Scheraga, H. A. 1976 Macromol. 9: 168.
(153) Garnier, J., Osguthorpe, D. J. and Robson, B. 1978 J. Mol. Biol. 120: 97.
(154) Ling, G. N. 1965 Ann. N. Y. Acad. Sci. 125: 401.
(155) Ling, G. N. 1972 in *Water and Aqueous Solutions, Structure, Thermodynamics, and Transport Processes* (A. Horne, ed.) Wiley-Interscience, New York, pp. 663–699.
(156) Ling, G. N., Niu, Z. and Ochsenfeld, M.M. 1993 Physiol. Chem Phys. & Med. NMR 25: 177.
(157) Veis, A. 1964 *The Macromolecular Chemistry of Gelatin*, Academic Press, New York.
(158) Ling, G. N. 1985 in *Water and Ions in Biological Systems* (A. Pullman, V. Vasilescu and L., Packer, eds.), Plenum Press, New York. (2nd Intern. Conf. Bucharest, Sept. 6–11,1982) pp. 79–94.
(159) Ling, G. N. and Negendank, W. 1970 Physiol. Chem. Phys. 2: 15.
(160) Ling, G. N. 1983 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 155.
(161) Ling, G. N. and Ochsenfeld, M. M. 1987 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 19: 177.
(162) Ling, G. N., and Zhang, Z. L. 1983 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 391.
(163) Ling, G. N. and Hu, W. H. 1987 Physiol. Chem Phys. & Med. NMR 19: 251.
(164) Ling, G. N. and Murphy, R. C. 1983 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 137.
(165) Clegg, J. S., Szwarnowski, S., McClean, V.E.R., Sheppard, R. J. and Grant, E. H. 1982 Bioch. Biophys. Acta 721: 458.
Clegg, J. S., McClean, V.E. R., Szwarnowski, S. and Sheppard, R. J. 1984 Phys. Med. Biol. 29: 1409.
(166) Trantham, E. C., Rorschach, H. E., Clegg, J. C., Hazlewood, C. F. Nicklow, R M. and Wakabayashi, N. 1984 Biophys. J. 45: 927.
Heidorn, D. B., Rorschach, H. E., Hazlewood, C. F., Ling, G. N. and Nicklow, R. M. 1986 Biophys. J. 49: 92A.
(167) Ludwig, C. 1849 Z. ration. Med. von Henle 8: 1.
(168) Ling, G. N. 1993 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 25: 145.
(169) Ling, G. N. 1987 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 19: 193.
(170) Ling, G. N. and Hu, W. 1988 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 20: 293.
(171) Ling, G. N. and Hu, W. (to be published).
(172) Ling, G. N. and Ochsenfeld, M. M. 1983 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 127.
(173) Ling, G. N. 1969 Intern. Rev. Cytology 26: 1.
(174) Ling, G. N. 1988 Physiol. Chem Phys. & Med. NMR 20: 281.
(175) Ling, G. N. and Ochsenfeld, M. M. 1989 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 21: 19.
(176) Luyet, B. J. and Hartung, M. C. 1941 Biodynamica 3: 353.
Polge, C., Smith, A. U. and Parks, A. S. 1949 Nature 164: 666.
Rall, W. F. 1987 Cryobiology 24: 387.
(177) Szent-Györgyi, A. 1978 *The Living State and Cancer*, Marcel Dekker Inc. New York.
(178) Rushbrooke, G. S. 1949 *Introduction to Statistical Mechanics*, Clarendon Press, Oxford.
Myers, J. E. and Meyer, M. G. 1940 *Statistical Mechanics*, John Wiley & Sons, New York.
Fowler, R. and Guggenheim, E. A. 1960 *Statistical Thermodynamics: A Version of Statistical Mechanics for Students of Physics and Chemistry*, Cambridge University Press, Cambridge.
(179) Ernst, E. and Hazlewood, C.F. 1979 Inorganic Perspectives in Biol and Med 2: 181.
(180) Pollack, G. H. 1990 *Muscle and Molecules: Uncovering the Principles of Biological Motion*, Ebner & Sons, Seattle.
———. 2001 *Cells, Gels and the Engine of Life, A New Unified Approach to Cell Function*, Ebner & Sons, Seattle, WA, USA.
(181) Barcroft, J. 1928 *The Respiratory Function of the Blood*, Part II. *Hemoglobin*, The Cambridge University Press, London.
(182) Forbes, W. H. and Roughton, F. J. W. 1931 J. Physiol. (London) 71: 229.
(183) Hill, A. V. 1910 J. Physiol. (London) 40: iv.
Hill, R. and Wolvekamp, H. P. 1936 Proc. Roy. Soc. (London) B120: 484.
(184) Wyman, J. 1964 Adv. Protein Chem. 19: 223.
(185) Ling G.N. Biopolymer Symp., 1964, 1, 91.
(186) Ling, G. N. 1970 Proc. Nat. Acad. Sci. 67: 296.
(187) Bohr, C. 1890 Z. physiol. Chem. 4: 249.
(188) Manwell, C. 1958 Science 127: 593.

(189) Chanutin, A. and Curlish, R. R. 1967 Arch, Biochem. Biophys. 121: 96.
Chanutin, A. and Hermann, E. 1969 Arch. Biochem. Biophys. 131: 180.
Klinger, R. G. , Zahn, D. P., Brox, D. H. and Frunder, H. E. 1971 Europ. J. Biochem 18: 171.
(190) Ling, G.N. and Bohr, G. 1971 Physiol. Chem. Phys. 3: 431.
(191) Miseta, A., Bogner, P., Berényi, E., Kellermayer, M., Galambos, S. and Wheatley, D. N. and Cameron, I. L. 1993 Biochem. Biophys. Acta 1175: 133.
(192) Bull, H. 1944 J. Amer. Chem. Soc. 66: 1499.
Dole, M. and Faller, I. L. 1950 J. Amer. Chem. Soc. 72: 414.
Katchman, D. and McLaren, A. D. 1951 J. Amer. Chem. Soc. 73: 2124.
McLaren, A. D. and Rowen, J. W. 1951 J. Polymer Sic. 7: 289.
Hnojewyj, W. S. and Reyerson, L. H. 1959 J. Phys. Chem. 63: 1653.
Eley, D. D. and Leslie, R. B. 1964 in *The Structure and Properties of Biomolecules and Biological Systems*, pp. 238–258.
D'Arcy, R. L. and Watt, I. C. 1970 Trans. Farad. Soc. 66: 1236.
Leeder, J. D. and Watt, I. C. 1974 J. Coll. Interfac. Sci. 48: 339.
(193) Speakman, J. B. 1944 Trans. Farad. Soc. 40: 6.
Leeder, J. D. and Watt, I. C. 1965 J. Phys. Chem. 69: 3280.
(194) Katz, J. R. 1919 Kolloidchem. Beih. 9: 1.
(195) Ling, G. N. 1987 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 19: 159.
(196) von Korösy, K. 1914-1915 Z. physiol. Chem. 93: 154.
(197) Hodgman, C. D., Weast, R.C. and Selby, S.M. (Ed.) 1961 *Handbook of Chemistry and Physics*, 43rd Ed., The Chemical Rubber Publ. Co., Cleveland, Ohio.
(198) Ling, G. N. and Peterson, K. 1977 Bull. Mathem. Biol. 39: 721.
(199) Ling, G. N. and Kwon, Y. 1983 Physiol.. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 239.
(200) Singer, S. J. and Nicolson, G. L. 1972 Science 175: 720.
(201) Ling, G. N., Ochsenfeld, M.M. and Karreman, G. 1967 J. Gen. Physiol. 50: 1807.
(202) Ling,. G. N. and Reisin, I. L. 1973 Physiol. Chem. Phys. 5: 183.
(203) Caillé, J. P. and Hinke, J. A. M. 1974 Canad. J. Physiol. Pharmacol. 52: 814.
(204) Abetsedarskaya, L. A., Miftakhutdinova, J. G. and Fedotov, V. D. 1968 Biofizika 13: 630; Biophysics (English Transl.) 13: 750.
(205) Finch, E. D. , Harmon, J. F. and Muller, B. H. 1971 Arch. Biochem. Biophys. 147: 299.
(206) Walter, J. A. and Hope, A. B. 1971 Austral. J. Biol. Sci. 24: 497.
(207) Bunch, W. H. and Kallsen, G. 1969 Science 164: 1178.
(208) Ling, G. N. 1987 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 19: 199.
(209) Miyamoto, V. K., and Thompson, T. E. 1967 J. Coll. Interf. Sci. 25: 16.
Miyamoto, V. K. 1966 *DC Electrical Properties of Lipid Bilayer Membranes*, Ph.D Thesis, The Johns Hopkins University, Baltimore.
(210) Andreoli, T. E., Bangham, J. A. and Tosteson, D. C. 1967 J. Gen. Physiol. 50: 1729.
Andreoli, T. E., Tiffenberg, M. and Tosteson, D. S. 1967 J. Gen. Physiol. 50: 2527.
(211) Ling G.N., Ochsenfeld M.M. Membrane lipid layers vs. polarized water dominated by fixed ions: a comparative study of the effects of three macrocyclic ionophores on the K+ permeability of frog skeletal muscle, frog ovarian eggs, and human erythrocytes. Physiol. Chem. Phys. Med. NMR. 1986; 18(2): 109—24.
(212) Stillman, I. M., Gilbert, D. L., and Robbins, M. 1970 Biochem. Biophys. Acta 203: 338.
(213) Maloff, B. L., Scordillis, S. P., Reynold, C. and Tedeschi, H. 1978 J. Cell Biol. 78: 199.
(214) Fleischer, S., Fleischer, B. and Stoeckenius, W. 1967 J. Cell Biol. 32: 193.
(215) Napoliano, L., Le Baron, F., and Scaletti, J. 1967 J. Cell Biol. 34: 817.
Morowitz, H. J., and Terry, T.M. 1969 Biochim. Biophys. Acta 183: 276.
(216) Fox, S. W. 1973 Naturwissenschaften. 60: 359.
(217) Ling, G. N. 1973 Biophys. J. 13: 807.
(218) Ling, G. N. 1953 Proc. 19th Intern. Physiol. Congr., Montreal, Canada, p. 566.
(219) Ling, G. N. 1955 Amer. J. Phys. Med. 34: 89.
(220) Epstein, E. and Hagen, C.E. 1952 Plant Physiol. 27: 457.
(221) Conway, E., J. and Duggan, F. 1958 Biochem. J. 69: 265.
(222) Ling, G.N. and Ochsenfeld, M.M. 1965 Biophysical J. 5: 777.
(223) Ling, G.N. and Ochsenfeld, M.M. 1970 Physiol. Chem. Phys. 2: 189.
(224) Müller, P. 1975 Ann. N.Y. Acad. Sci. 264: 97.
(225) Ling, G.N. 1981 Physiol. Chem. Phys. 13: 356.
Ling, G.N. 1990 Scanning Microscopy 4: 723.
(226) Koefoed-Johnson, V. and Ussing, H.H. 1958 Acta Physiol. Scand. 42: 298.
(227) Maddrell, S.H.P. in *Membrane Transport in Biology* Vol. 3, pp. 250–251 (G. Giebisch, ed.) Springer, New York, p. 239.
(228) Spring KR, Giebisch G. Kinetics of Na+ transport in Necturus proximal tubule. J. Gen. Physiol. 1977; 70(3): 307–328.
(229) Morel, F. 1961 in *Proc. Intern. Congr. Nephrology,* Karger, Basel, p. 16.
(230) Hodgkin, A.L. and Katz, B. 1949 J. Physiol (London) 108: 37.
(231) Goldman, D.E. 1943 J. Gen. Physiol. 27: 37.
(232) Bernstein, J. 1912 *Elektrobiologie*, F. Vieweg und Sons, Braunschweig.
(233) Hodgkin, A.L. and Katz, B. 1949 J. Physiol. (London) 109: 240.
(234) Adrian, R. H. 1956 J. Physiol. (London) 133: 631.
(235) Hodgkin, A. L. and Horowicz, P. 1960 J. Physiol. (London) 153: 404.
(236) Hodgkin, A.L. 1958 Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B 148: 1.
(237) Katz, B. 1966 *Nerve, Muscle and Synapse*, McGraw Hill, New York.
(238) Kernan, R.P. 1970 in *Membranes and Ion Transport*, Vol. 1 (E. E. Bittar ed.) Wiley-Interscience, New York, p. 395.
(239) Baur, E. 1913 Z. Elektrochem. 19: 590.
(240) Akaike, N. 1975 J. Physiol. (London) 245: 499.
(241) Baur, E. and Kronmann, S. 1917 Z. physik. Chem. 92: 81.
(242) Ehrensvard, G. and Sillen, L. G. 1938 Nature 141: 788.
(243) Colacicco, G. 1965 Nature 207: 936.
(244) Ling, G. N. 1966 Fed. Proc. (Symposium Issue) 25: 958.
(245) Ling, G. N. 1959 Fed. Proc. 18: 371.
(246) Edelmann, L.1973 Ann. N.Y. Acad. Sci. 204: 534.
(247) Ling, G.N. <http://www.gilbertling.org>
(248) Ling, G.N. 1979 Physiol. Chem. Phys. 11: 59.
(249) Armstrong, C. M. 1975 in *Membranes: A Series of Advances*. Vol. III (G. Eisenman ed.) Academic Press, New York, p. 325.
(250) Hille, B. 1975 in *Membranes: A Series of Advances*. Vol. III (G. Eisenman, ed.) Academic Press, New York, p. 255.
(251) Hodgkin, A.L. and Huxley, A. F. 1952 J. Physiol. (London) 116: 449.
(252) Hodgkin, A.L. , Huxley, A. F. and Katz, B., 1952 J. Physiol. (London) 116: 424.
(253) Hodgkin, A.L. and Huxley, A. F. 1945 J. Physiol. (London) 104: 176.
(254) Shores, L. 1961 *Collier's Encyclopedia* Vol. 16, p. 217 Cromwell-Collier Publ. Co., New York.
(255) Chandler WK, Meves H. Voltage clamp experiments on internally perfused giant axons. J. Physiol. 1965, 180(4): 788–820.
(256) Ling, G. N. 1957 Fed. Proc. 16: 81.
(257) Ling, G. N. 1982 Physiol. Chem. Phys. 14: 47.
(258) Hille, B. 1968 J. Gen. Physiol. 51: 221.
(259) Hille, B. 1975 Fed. Proc. 34: 1318.
(260) Stillman, I. M., Gilbert, D. L. and Lipidsy, R.J. 1971 Biophys. J. 11: 55a.
(261) Khodorov, B. I. 1978 in *Membrane Transport Process* Vol. 2 (D.T. Tosteson, A. Yu. Ovchinnikov and R. Latorre, eds.) Raven Press, New York, p. 153.
(262) Villegas, R., Blei, M. and Villegas, G. M., 1965 J. Gen. Physiol. 48: 35.
(263) Hodgkin, A. L. and Keynes, R. D. 1953 J. Physiol (London) 119: 513.
(264) Kushmerick, M. J. and Podolsky, R. J. 1969 Science 166: 1297.
(265) Höber, R. 1913 Pflüger's Arch. Ges. Physiol. 150: 15.
(266) Thomson, D. L. 1928 J. Physiol. (London) 65: 214.
Hartree, W. and Hill, A. V. 1921 Biochem. J. 15: 379.
(267) Edelmann, L. 1986 Science of Biological Specimen Preparation, SEM Inc., AMF O'Hare, Chicago, pp. 33–42, Fig. 4.
(268) Levi, H. and Ussing, H.H. 1948 Acta Physiol. Scand. 16: 232.
(269) Robertson, J. D. 1950 Progr. Biophys. Biophys. Chem. 10: 343.
Sjöstrand, F.S. 1990 *Deducing Function from Structure, Vol. 1: A Different View of Membranes,* Academic Press, San Diego, p. 224.

(270) Kushmerick, M. J. 1979 Trends Biochem. Sci. Lett. Ed. (TIBS) 3: N210.
(271) Ling, G.N. 1979 Trends Biochem. Sci. Lett. Ed. (TIBS) 4: N134.
(272) Lohmann, K. 1929 Naturwissenschaften 17: 624.
———. 1931 Biochem. Z. 233: 460.
(273) Lehninger, A. L. 1975 *Biochemistry*, 2nd ed. Worth Publishers, New York.
(274) Jones, A. W. 1965 Ph. D. Thesis, Univ.of Pennsylvania, Philadelphia.
(275) Minkoff, L. and Damadian, R.V. 1973 Biophys. J. 13: 167.
———. 1974 Biophys. J. 14: 69.
(276) Ling,. G. N. and Cope, F. W. 1969 Science 163: 1335.
(277) Crank, J. 1956 *The Mathematics of Diffusion*, Clarendon Press, Oxford.
(278) Bradley, R.S. 1936 J. Chem. Soc. 1936: 1799.
(279) Ling, G. N. and Bohr, G. 1970 Biophys. J. 10: 519 .
(280) Ling, G. N. and Bohr, G. 1971 Physiol. Chem. Phys. 3: 573.
(281) Skou, J. C. 1965 Physiol. Rev. 45: 596.
(282) Edelmann, L. 1991 Scan. Microsc. 5: S-75.
(283) Engelhardt, V. A. and Ljubimova, M.N. 1939 Nature 144: 668.
(284) Morales, M. and Botts, J. 1953 Disc. Farad. Soc. 13: 125.
(285) Terner, C., Eggleston, L. V. and Krebs, H.A. 1950 Biochem. J. 47: 139.
(286) Koechlin, B.A. 1955 J. Biophys. Biochem. Cytol. 1: 511.
(287) Goody, R.S., Hofmann, W. and Mannherz, H.G. 1977 Europ. J. Biochem. 78: 317.
Cardon, J. W. and Boyer, P.D. 1978 Europ. J. Biochem. 92: 443.
(288) Lowey, S. and Luck, S.M. 1969 Biochem. 8: 3195.
Marsh, D.J., De Bruin, S.H. and Gratzer, W. B. 1977 Biochem. 16: 1738.
(289) Ling,. G. N. 1981 Physiol. Chem. Phys. 13: 29.
(290) Ling, G.N. and Woodbury, W. 1949 J. Cell. Comp. Physiol. 34: 407.
Coraboeuf, E. and Weidemann, S. 1954 Helv. Physiol. Acta 12: 32.
(291) Hodgkin, A. L. and Katz, B. 1949 J. Physiol. (London) 109: 240.
(292) McDonald, J. S. 1900 Proc. Roy. Soc. (London) 67: 310.
Curtis, H. J. and Cole, K. S. 1942 J. Cell. Comp. Physiol. 19: 135.
Ling, G.N. and Gerard, R. W. 1950 Nature 165: 113.
(293) Huxley, A.E. and Stämpfli, R. 1951 J. Physiol. (London) 112: 496.
(294) Nastuk, W. L. and Hodgkin, A. L. 1950 J. Cell. Comp. Physiol. 35: 39.
(295) Ling, G. N. 1980 in *Cooperative Phenomena in Biology* (G. Karreman, ed.) Pergamon Press, New York.
(296) Ling, G. N. and Walton, C. L. 1976 Science 191: 295 .
(297) Miller, C. and Ling, G. N. 1970 Physiol. Chem. Phys. 2: 495.
(298) Luyet, B. and Rapatz, G. 1956 Biodynamica 8: 1.
(299) Odeblad, E., Bhar, B. N. and Lindstrom, G. 1956 Arch. Biochem. Biophys. 63: 221.
Bratton, C. B. Hopkins, A. L. and Weinberg, J. W. 1965 Science 147: 738.
(300) Cope, F. W. 1969 Biophys. J. 9: 303.
(301) Hazlewood, C.F., Nichols, B. L. and Chamberlain, N. F. 1969 Nature 222: 747.
Hazlewood, C. F. 1979 in *Cell Associated Water* (W. Drost-Hanson and J.S. Clegg, eds.) Acad. Press, New York, p. 165.
Hazlewood, C.F. 1973 Ann. N.Y. Acad. Sci. 204: 593.
(302) Damadian, R. 1971 Science 171: 1151.
(303) Kaatze, U. 1975 Adv. Molecular Relaxation Process 7: 71.
(304) Rorschach, H. E. 1984 in *Water, Ions in Biological Systems*, (V. Vasilescu Ed.) Plenum Press, New York.
(305) Kleinfield, S. 1985 *A Machine Called Indomitable*, Times Books, New York.
<http://www.fonar.com>.
(306) Ling, G. N., Ochsenfeld, M.M., Walton, C. and Bersinger, T. J. 1980 Physiol. Chem. Phys. 12: 3.
Ling, G. N., Walton, C. and Bersinger, T. J. 1980 Physiol. Chem. Phys. 12: 111.
(307) Ling, G. N., Walton, C.L. and Ochsenfeld, M.M. 1981 J. Cell. Physiol. 106: 385.
(308) Lamarck, J. B. 1830 *Philosophie zoologique au exposition des considérations relatives à l'histoire des animaux* (Paris, Nouvelle éd.) (First published in 1809). 1: 403.
Landrieu, M. 1797 *Lamarck* p. 161, excerpting his *Memoires de physique et d'histoire naturelle*.
(309) Hall, T. S. 1969 *Ideas of Life and Matter. Studies in the History of General Physiology: 600B.C.–1900 A.D.*, Univ. of Chicago Press, Chicago, Vol. 1.
(310) Hill, D. K. 1962 J. Physiol. (London) 164: 31.
(311) Renkin, E.M. 1954 J. Gen. Physiol. 38: 225.
(312) Ling, G.N. and Ochsenfeld, M.M. 1973 Science 181: 78.
(313) Ling, G. N. and Ochsenfeld, M.M. 1973 Ann. N. Y. Acad. Sci. 204: 325.
(314) Ling, G. N., Baxter, J. D. and Leitmann, M.I. 1984 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 16: 405.
(315) Chambers, R. 1922 J. Gen. Physiol. 5: 189.
(316) MacDonald, J.S. 1900 Proc. Roy. Soc. (London) 67: 310.
(317) Ling, G.N. 1981 *Die Zelle. Struktur und Funktion* (H, Metzner, ed.), 3rd ed., Wissenschft. Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 356–389.
(318) Meyerhof, O. and Lohman, K. 1932 Biochem. Z. 253: 431.
(319) Teunissen, P. H. and Bungenberg de Jong, H.G. 1949 Kolloid Beih. 48: 33.
(320) Collander, R. Cell membranes: Their resistance to penetration and their capacity for transport. In: Plant Physiology, A Treatise. Steward, F.C., ed., pp. 3—93. London, New York: Academic Press, 1959.
(321) Bungenberg de Jong, H. G. 1932 Protoplasma 15: 110.
(322) Perutz, M. 1978 Science 201: 1189.
(323) Müller, O. F. 1786 *Animalcula infusioria*, Hausiae.
(324) Lepeschkin, W.W. 1930 Protoplasma 9: 269.
Duclaux, J. 1934 *Actualités scientif.*, Herman édit., Paris, 127, pp. 1–43.
Guilliermond, A. 1941 Chron. Botan. Co., Mass., pp. 1–246.
Oparin, A. I. 1941 *The Origin of Life on the Earth* (in Russian), Moscow-Leningrad, pp. 1–268.
(325) Lepeschkin, W.W. 1936 Biodynamica 19: 1.
(326) Schneider, D. 1997 Scientific American 276: 3.
(327) Edelmann, L. 1989 Scan. Microsc. Suppement 3: 241.
(328) Page, L. and Adams, N.I. 1931 *Principles of Electricity. An Intemediate Text in Electricity and Magnetism*, D. Van Nostrand Co., Inc. New York.
(329) Perutz, M. F., Muirhead, H., Cox, J.M., Goaman, L.C.G., Mathews, F.S., McGandy, E.L., and Webb, L. E. 1968 Nature 219: 29.
Perutz, M.F. 1969 Proc. Roy. Soc. B173: 113.
(330) Sollner, K., Abrams, I. and Carr, C. W. 1941 J. Gen. Physiol. 24: 467; 25: 7.
(331) Neville M.C. Cellular accumulation of amino acids: adsorption revisited. Ann. N. Y. Acad Sci. 1973; 204: 538–563.
(332) Kizel', A.P. 1940 *The Chemistry of Protoplasm (Khimiya protoplasmy)*, Moscow-Leningrad, pp. 1–624.
Nasonov, D.N. and Alexandrov, V. Ya. 1940 *The Reaction of Living Matter to External Agencies*, Moscow pp. 1–252.
(333) Dean, R. 1941 Biol. Symp. 3: 331.
(334) Jacobson, B. 1955 J. Amer. Chem. Soc. 77: 2919.
(335) Mendelsohn, E. 1963 *Cell Theory and the Development of General Physiology*, Arch. intern. d'histoire de sciences 6: 419.
(336) Ling, G.N. and Kromash, M.H. 1967 J. Gen. Physiol. 50: 677.
(337) Lewis, G.N. 1923 *Valence and the Structure of Atoms and Molecules*, Chemical Catalogue, New York.
(338) Hammett, L.P. 1970 *Physical Organic Chemistry*, 2nd ed., McGraw Hill, New York.
Branch, G.E.K. and Calvin, M. 1941 *The Theory of Organic Chemistry, An Advanced Course*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
Dewar, M.J.S. 1949 *The Electronic Theory of Organic Chemistry*, Oxford University Press, London.
Smith, R.P., Rhee, T. Magee, J. L. and Eyring, H. 1951 J. Amer. Chem. Soc. 73: 2263.
Ingold, C.K. 1953 *Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, Cornell Univ. Press, Ithaca.
Taft, R.W. 1960 J. Phys. Chem. 64: 1805.
Chiang, M.C. and Tai, T. C. 1963 Scientia Sinica 12: 785.
Chiang, M. C. 1987 *The Role of Homologous Linearity of Organic Compounds*, Science Press, Beijing.

(339) Mattson, J. and Simon,. M. 1995 *The Pioneers of NMR and Magnetic Resonance in Medicine: The Story of MRI*, Bar-ilan Univer. Press and Dean Books Co., Jericho, NY.
(340) Ling, G.N. and Tucker, M. 1980 J. Nat. Cancer Inst. 64: 1199.
Ling, G. N. 1983 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 511.
Ling,. G.N., Kolebic, T. and Damadian, R.V. 1990 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 22: 1.
(341) Hodgkin, A. L. 1971 *The Conduction of the Nervous Impulse*, Liverpool Univ. Press, Liverpool.
(342) Baker, P. F. and Shaw, T. I. 1965 J. Physiol. (London) 180: 424.
(343) Schultz, R. D. and Asunmaa, S. K. 1969 Recent Progr. Surf. Sci. 3: 291.
(344) Jain, M. K. 1972 *The Bimolecular Lipid Membrane: A System*, Van Nostrand-Rheinhold, New York.
(345) Burger, A. 1960 *Medicinal Chemistry*, 2nd ed., Interscience Publishers, Inc., New York.
(346) Cohen, I.B. 1985 *Revolution in Science*, Harvard Univ. Press, Cambridge.
(347) Engelmann, T.W. 1873 Pflügers Arch.ges. Physiol. 7: 33, 155.
(348) <http://www.gilbertling.org/lp11.htm>
(349) <http://post.queensu.ca/ ~forsdyke/peerrev.htm>
(350) <http://www.gilbertling.org/lp12.htm>
(351) Gary-Bobo, C.M. and Lindenberg, A.B. 1969 J. Coll. Interf. Sci. 29: 702.
(352) Rothschuh, K.E. 1973 *History of Physiology*, (English transl. by G.B. Risse), Krieger Publ.Co., Malabar. Florida.
(353) Ising, E. 1925 Z. Phys. 31: 253.
(354) Landau, L.D. and Lifschitz, E.M. 1969 *Statistical Physics,* 2nd ed. Pergamon, London.
(355) Dyson, F.J. 1969 Commun. Math. Phys. 12: 91.
(356) Griffith, R.B. 1969 *Phase Transitions and Critical Phenomena*, vol 1, pp. 89–94, Academic Press., New York , p. 7.
(357) Hill, A.V. 1932 Physiol. Rev. 12: 56.
(358) Greenlee, R. T. 2000 *Cancer Statistics, 2000*, CA, Cancer Journal for Clinicians 50: 7.
(359) Overton, E. 1902 Pflügers Arch. Ges. Physiol. 92: 346.
(360) Nernst, W. 1892 Z. physik. Chem 9: 137.
(361) Bendall, J. R. 1969 *Muscles, Molecules and Movement: An Essay in the Contraction of Muscles*, Amer. Elsevier Publ. Co, New York.
(362) Lark-Horovitz, K. 1931 Nature 127: 440.
(363) Schrödinger, E. 1944 *What is Life? The Physical Aspect of the Living Cell,* Cambridge Univ. Press, Cambridge (Canto Edition 1992).
(364) Van Doren, C. 1991 *A History of Knowledge, Past Present and Future*, Bird Lane Press/Carol Publ. Group, New York.
(365) Einstein, A. 1956 *Out of My Later Years*, Wings Books, New York.
(366) Williams, L. P. 1965 *Michael Faraday, A Biography*, Da Capo Press, Inc., a Subsidiary of Plenum Publ. Co., New York.
(367) Singer, C. 1915 "The Dawn of Microscopic Discoveries", J. Roy. Microsc. Soc. pp. 317–340.
(368) Hooke, R. 1665 *Micrographia; or, Some Phyiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon*, London.
(369) Selye. H. 1978 *The Stress of Life*, McGraw-Hill, New York (paperback ed.).
(370) Nagy, S., Paál, M., Köszegi, T. Ludány and Kellermayer, M. 1998 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 30: 141.
(371) Infante, A.A., and Davies, R. C. 1962 Biochem. Biophys. Res. Comm. 9: 410.
(372) Lundsgaard, E. 1930 Biochem. Z. 227: 51.
(373) Nicolsky BP: Theory of the glass electrode. I. Acta Physiochem USSR 7: 597, 1937.
(374) Horovitz, K. 1923 Z. Physik. 15: 369.
(375) Horovitz, K. 1925 Z. physik. Chem. 115: 424.
———. 1925 Sitzb. Akad. wiss. Wien, Abt. IIa, 134, 335.
376) Ling, G. N. 1967 in *Glass Electrodes for Hydrogen and Other Cations* (G. Eisenman, Ed.) Marcel-Dekker, New York, pp. 284–292.
377) Ling, G. N. and Fisher, A. 1983 Physiol. Chem. Phys. 15: 369.
378) Menten, M. L. 1908 Trans. Canad. Inst. 8: 403.
(379) Priestley, J. 1767 *The History and Current State of Electricity*, 1st ed. 2 volumes, London.
(380) Horgan, J. 1996 *The End of Science: Facing the Limits of Knowledge in the Twilight of the Scientific Age*, Addison-Wesley, Reading, Mass.
(381) Ling, G.N. and Bohr, G. 1969 Physiol. Chem. Phys. 1: 591.
(382) Conway. E.J. 1957 in *Metabolic Aspects of Transport across Cell Membranes* (Q. R. Murphy, Ed.) Univ. Wisconsin Press, Madison, Wisc., pp. 107–111.
(383) Fick, A. 1882 *Mechanische Arbeit und Wärmeentwickelung bei der Muskelthätigkeit.*, Brockaus, Leipzig.
(384) Jacobson, B. 1953 Nature 172: 666.
(385) Bernal, J.D. and Fowler, R.H. 1933 J. Chem. Phys. 1: 515.
(386) Forslind, E. 1952 Acta Polytechnica 3 No. 5.
(387) Szent-Györgyi, A. 1957 *Bioenergetics*, Acad. Press, New York.
(388) Klotz, I.M. 1958 Science 128: 815.
(389) Chambers, R. and Hale, H.P. 1932 Proc. Roy. Soc (London) Ser. B 110: 336.
(390) Wilde, W.S. and O'Brien, J.M. 1953 Proc. 19th Intern. Physiol. Congr., Montreal, p. 889.
(391) Ernst, E. and Hazlewood, C.F. 1978 Inorg. Persp. Biol. & Med. 2: 27.
(392) Edelmann, L. 1984 Scann. Electron Microsc. II; 875.
———. 1989 Scann Microsc. Suppl. 3: 241.
———. 1991 J. Microsc. 161: 217–228, p. 219, p. 226.
(393) Cannon, C. G. 1955 Mikrochim Acta 2–3, 555.
(394) Mizushima, S., Tsuboi, M., Shimanouchi, T., and Tsuda, Y. 1955 Spectrochimica. Acta 7: 100.
(395) Bamford, C.H., Elliott, A. and Hanby, W.E. 1956 *Synthetic Polypeptides, Preparation, Structure and Properties,* Acad. Press, New York, pp. 197–199.
(396) Wolfenden, W. 1978 Biochem. 17: 201.
(397) Klotz, I. M. 1973 Ann. NY Acad. Sci. 226: 18.
Aizono, Y., Roberts, J.E., Sonnenberg, M. and Swislocki, N. I. 1974 Arch. Biochem. Biophys. 163: 634.
Imae, T., Fasman, G.D., Hinkle, P.M. and Tashjian, A.H. 1975 Bioch. Biophys, Res. Comm. 62: 923.
(398) Ling, G. N. and Fu, Y. 1988 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 20: 61.
(399) Ernst, E.., Tigyi, J. and Zahorcsek, A. 1950 Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 1: 5.
———. 1951 Acad. Physiol. Acad. Sci. Hung. 2: 78.
(400) Hagen, R.D. 1986 *Windows to the Origins*, Naval Research Reviews 38: 4.
(401) Michaelis, L. 1926 Naturwissenschaften 14: 33.
(402) Fujita, A. 1926 Biochem. Z. 179: 18.
(403) Collander, R. and Bärlund, H. 1933 Acta Botan. Fennica. 11: 1.
(404) Woolf, H. B. (Editor-in-Chief) 1977 *Webster's New Collegiate Dictionary*, G.C. Merriam Co., Springfield, Mass.
(405) Andreoli, T. E., Bangham, J. A. and Tosteson, D.C. 1967 J. Gen. Physiol. 50: 1729.
(406) Müller, P. Rudin, D.O., Tien, H. T. and Wescott, W.C. 1962 Nature 194: 979.
———. 1963 J. Phys. Chem 67: 534.
———. 1964 Rec. Prog. Surface Sci. 1: 379.
(407) Tien, H. T. 1967 J. Phys. Chem. 71: 3395.
Cherry, R. J. and Chapman, D. 1969 J. Mol. Biol. 40: 19.
(408) Cole, K.S. 1932 J. Cell. Comp. Physiol. 1: 1.
(409) Harvey, E. N. 1931 Biol. Bull. 60: 67.
(410) Ueda, T., Muratsugu, M., Inoue, I. and Kobatake, Y. 1974 J. Mol. Biol. 18: 177.
(411) Inoue, I., Ueda, T., and Kobatake, Y. 1973 Bioch. Biophy. Acta 298: 653.
(412) Wood, E.H., Collins, D.A. and Moe, G.K. 1940 Amer. J. ,Physiol. 128: 635.
(413) Miyake, M., Inoue, I. and Kobatake, Y. 1973 Bioch. Biophys. Acta 323: 367.
(414) Inoue, I., Ishida, N. and Kobatake, Y. 1973 Bioch. Biophys. Acta 330: 27.
(415) Inoue, I., Ishida, N. and Kobatake, Y. 1974 Bioch. Biophys. Acta 367: 24.
(416) Koppenhöfer, E. 1974 Pflügers Arch. ges. Physiol. 347: 71 (R36).
(417) Zwaal, R.A., Roelofson, B. and Colley, C.M. 1973 Bioch. Biophys. Acta 300: 159.
(418) Adrian, R.H. 1956 J. Physiol.(London) 133: 631.
Baker, P.F., Hodgkin, A.L. and Shaw,T.I. 1961 Nature 190: 885.

Hagiwara, S., Chichibu, S., Naka, K.I. 1964 J. Gen. Physiol. 48: 163.
Sato, M., Akaike, N. and Nishi, R. 1967 Kumamoto Med. J. 20: 39.
(419) Tobias, J. M. 1950 J. Cell. Comp. Physiol. 36: 1.
Falk, G. and Gerard, R.W. 1954 J. Cell. Comp. Physiol. 43: 393.
Grundfest, H., Kao, C.Y., and Altamirano, M. 1954 J. Gen. Physiol. 38: 245.
Kao, C.Y. 1956 Biol. Bull. 111: 292.
Shaw, F.H. and Simon, S.E. 1955 Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 33: 153.
Koketsu, K. and Kimura, Y., 1960 J. Cell. Comp. Physiol. 55: 239.
Tasaki, I., and Takenaka, T. 1964 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52: 804.
Hazlewood, C.F. and Nichols, B.L., 1969 Johns Hopkins Med. J. 125: 119.
Thomas, R.C. 1972 Physiol. Rev. 52: 563.
Ling, G.N. and Fisher, A. 1983 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 369.
(420) Berthelot, M. and Jungfleisch, H. 1872 Ann. Chim. Phys. 26: 396.
Nernst, W. 1891 Z. physik. Chem. 8: 110.
(421) Scheraga, H. A. 1974 Current Topics Biochem. 1973: 1.
Finkelstein, A.V. and Ptitsyn, O.B. 1971 J. Mol. Biol. 62: 613.
(422) Ruhland, W. 1909 Jahrb. wiss. Bot. 46: 1.
———. 1912 Jahrb. wiss. Bot. 51: 376.
Ruhland, W. and Hoffmann, C. 1925 Planta 1: 1.
(423) Ling, G.N., Will, S. and Shannon, P. 1969 Physiol. Chem. Phys. 1: 355.
(424) Fischer, E. 1906 Ber. dtsch chem. Ges. 39: 530.
———. 1907 Sitzb. kgl. preuss. Akad. Wiss. (1907): 35; (1916): 990.
(425) Ling, G.N., Walton, C., and Bersinger, T. J. 1980 Physiol. Chem. Phys. 12: 111.
(426) Watt, I.C. and Leeder, J. D. 1964 Trans. Farad. Soc. 60: 1335.
(427) Ling, G. N., Neville, M., Shannon, P. and Will, S. 1969 Physiol. Chem. Phys. 1: 42.
(428) Ling, G. N. and Will, S. 1969 Physiol. Chem. Phys. 1: 263.
(429) Ling, G. N. and Will, S. 1976 Physiol. Chem. Phys. 8: 115.
(430) Kolber, A. R. and Stein, N. D. 1966 Nature 209: 691.
(431) Trombitás, C. and Tigyi-Sebes, A. 1979 Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 14: 271.
(432) Edelmann, L. 1983 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 337.
(433) von Zglinicki, T. 1988 Gen. Physiol. Biophys. 7: 495.
(434) Somlyo, A. V., Gonzales-Serratos, H., Shuman, H., McClellan, G. and Somlyo, A.P. 1981 J.Cell. Biol. 90: 577.
(435) Wood, R.E., Wirth, F. P. and Morgan, H. E. 1968 Bioch. Biophys. Acta 163: 171.
(436) Rossini, F.D., Knowlton, J.W. and Johnston, H.L. 1940 J. Res. Nat. Bur. Stand. 24: 369.
(437) Woessner, D.E. and Snowden, B.S. 1973 Ann. N.Y. Acad. Sci. 204: 113.
(438) Nathanson, A. 1904 Jahrb. wiss. Bot. 39: 607; 40: 403.
(439) Ling, G.N. 1966 Fed. Proc. (Symposium) 25: 958.
(440) Eastman, Geiling and DeLawder 1961 quoted in *Function of the Blood* (Macfarlane, R.G. and Robb-Smith, A.H.T.) Academic Press, New York, Fig. 18 in Chapter 1.
(441) Hagiwara, S. 1960 in *Electrical Activity of Single Cells* (Y. Katsuki, ed.), Igaku Shoin Ltd, Tokyo, p. 145.
(442) Matsuda, K. 1960 in *Electrical Activity of Single Cells* (Y. Katsuki, ed.), Igaku Shoin, Ltd., Tokyo, p. 283.
(443) Lassen, U. V. and Rasmussen, B.E. 1978 in Membrane Transport in Biology (D.C. Tosteson, ed.), Vol. 1, Springer Verlag., New York, p. 201.
(444) Fischer, E. 1894 Ber. dtsch. chem. Ges. 27: 2985.
(445) Henri, V. 1902 C.R. Acad. Sci., Paris 135: 916.
(446) Dixon, M. and Webb, E.C. 1958 *Enzymes*, Academic Press, New York.
(447) Clark, A.J. 1926 J. Physiol. (London) 61: 547.
———. 1933 *The Mode of Action of Drugs on Cells*, 3rd ed., Edward Arnold, London.
———. 1937 Quart. J. exp. Physiol. 27: 375.
(448) Ariëns, E.J., van Rossum, J.M. and Simonis, A.M. 1956 Arzneimittel-Forsch. 6: 282, 611, 737.
(449) Bowen, W. J. and Kerwin, T.D. 1955 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89: 515.
(450) Mommaerts, W.F.H.M. and Green, I. 1954 J. Biol. Chem. 208: 833.
(451) Wakabayashi, M. and Fishman, W.H. 1961 J. Biol. Chem. 236: 996.
(452) Reichard, P., Baldesten, A. and Rutberg, L. 1961 J. Biol. Chem. 236: 1150.
(453) Ling, G. N. 1964 Texas Report Biol. Med. 22: 244.
(454) van Rossum, J. M. and Ariëns, E. J. 1958 Arch. Intern. Pharmacodynam. 118: 393.
(455) Kühne, W. 1878 Unters. physiol. Inst. Univ. Heidelberg, 1: 291.
(456) Cohen, G. N. and Monod, J. 1957 Bact. Rev. 21: 169.
(457) Saladino, A.J., Bentley, P. J. and Trump, B.F. 1969 Amer. J. Pathol. 54: 421.
(458) Noonan, T.R., Fenn, W.O. and Haege, L. 1941 Amer. J. Physiol. 132: 612.
(459) Woods, A. 1820 Athenae Oxonienses, "new" ed. , London 4: col. 628.
(460) Brisseau de Mirbel, C.F. 1809 *Exposition de la théorie de l'organisation Végétale*, Paris.
(461) Treviranus, G. R. 1805 Biologie, oder Philosophie der lebenden Natur für Naturforscher und Aerzte, 3: 233, Göttingen.
(462) Link, H. F. 1809 *Grundlehren der Anatomie und physiolgie der Pflänzen*, pp 11–13, Leipzig.
(463) Wilson, J. M. 1944 "Cellular Tissue and the Dawn of Cell Theory", Isis 35: 168.
(464) Manuel, F.E. 1968 *A Portrait of Issac Newton*, Belknapp Press of Harvard Univ., Cambridge, Mass. Da Capo Press, Plenum, New York (paper-back ed.).
(465) Solomon, A. K. 1952 J. Gen. Physiol. 36: 57.
(466) Cremer, M. 1906 Z. Biol. 47: 562.
(467) Linderstrøm-Lang, K. U. 1924 Compt. rend, trav. lab. Carlsberg, Sér chim 15 No. 7.
(468) Haber, F. and Klemensiewicz, Z. 1911 Z. Physk. Chem. 78: 228.
(469) Kern, W. 1948 Makromol. Chemie 2: 279.
(470) Harkins, W. D. 1945 Science 102: 292.
(471) Freedman, J. C. 1976 Biochem Biophys Acta 455: 989.
(472) Cope, F. W. 1967 J. Gen. Physiol. 50: 1353.
(473) Jardetsky, O. and Wertz, J. E. 1960 J. Amer. Chem. Soc. 82: 318.
(474) Berendsen, H. J. C. and Edzes, H. T. 1973 Ann. N.Y. Acad. Sci. 204: 459.
(475) Abragam, A. 1961 *The Principles of Nuclear Magnetism*, Clarendon Press. Oxford.
(476) Cohen, M.H. and Reif, F. 1957 Solid State Physics 5: 321.
(477) Brand, J. C. C. and Speakman, J. C. 1960 *Molecular Structure: The Physical Approach* Edward Arnold, London.
(478) Ling, G. N. and Zhang, Z. L. 1983 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 251.
(479) Lindblom, G. 1971 Acta Chem. Scand. 25: 2767.
(480) Ling, G.N., Will, S. and Shannon, P. 1969 Physiol. Chem Phys. 1: 355.
(481) Stone, F.W. and Stratta, J.J. 1967 *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. vol. 6, pp.103–145, John Wiley and Sons, Inc., New York p. 113.
(482) Liebig, J. 1862 Annalen 121: 78.
(483) Davson, H. and Danielli, J.F. 1943 *The Permeability of Natural Membranes*, 2nd ed., Cambridge University Press, London.
(484) Beatley, E.H. and Klotz, I. M. 1951 Biol. Bull. 101: 215.
(485) Pauling, L. 1960 *The Nature of theChemical Bond*, 3rd Ed., Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.
(486) Jost, WE. 1960 *Diffusion in Solids. Liquids and Gases*, Academic Press, New York.
(487) Skriver, W., Maunsbach, A.B. and Jørgensen, P.L. 1980 J. Cell. Biol. 86: 746.
(488) Ling, G. N. 1964 Biopolymers (Biophysics Symposium Issue) 1: 91.
(489) Hodgkin, A.L. and Horowicz, P. 1959 J. Physiol. (London) 148: 127.
(490) Ling, G.N. and Schmolinski, A. 1956 Fed. Proc. 15: 120.
(491) Gutknecht, J., Hastings, D.F. and Bisson, M.A. 1978 in *Membrane Transport in Biology*, Vol. 3 , pp. 125–170 (G. Gibiesch ed.) Springer Verlag, New York.
(492) Brooks, S.C. 1939 J. Cell. Comp. Physiol. 14: 383.
———. 1940 Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 8: 171.
(493) Chance, B. and Yoshioka, T. 1966 Arch. Biochem. Biophys. 117: 451.
(494) Lardy, H. A. and Graven, S. N. 1965 Fed. Proc. 24: 424.
(495) Pressman, B.C. 1965 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53: 1076.
(496) Ling, G.N. 1981 Physiol. Chem. Phys. 13: 29.
(497) Falcone, A.B. and Hadler, H. I. 1968 Arch. Biochem. Biophys. 124: 91.
(498) Gylkhandanyan, A. V., Evtodienko, Yu. V., Zhabotinsky, A.M. and Kondrashova, M. N. 1976 FEBS Lett. 66: 44.

(499) Hopfer, U., Lehninger, A. L. and Lenarz, W. J. 1970 J. Biol. Med. 2: 41.
Ohki, S. 1972 Biocheim. Biophys. Acta 282: 55.
MacDonald, R.C. and Bangham, A.D. 1972 J. Memb. Biol. 7: 29.
(500) Burnstock G. The action of adrenaline on excitability and membrane potential in the taenia coli of the guinea-pig and the effect of DNP on this action and on the action of acetylcholine. J. Physiol. 1958, 143(1): 183–194.
(501) Martell, A.E. and Smith, R. M. 1974 *Critical Stability Constants*, Vol. 1, Amino Acids, Plenum Press, New York.
(502) Ling, G.N., Walton, C. and Ling, M.R. 1979 J. Cell. Physiol. 101: 261.
(503) Ling, G. N., Walton, C. and Ochsenfeld, M.M. 1983 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 15: 379.
(504) Abood, L.G., Koketsu, K. and Noda, K. 1961 Amer. J. Physiol. 200: 431.
Koketsu, K. 1966 Pers. Biol. Med. 9: 54.
(505) Aickin, C. 1986 Ann. Rev. Physiol. 48: 349.
(506) Taft, R.W. 1953 J. Amer. Chem. Soc. 75: 4231.
(507) Chiang, M. C. and Tai, T.C. 1963 Sci. Sin. 12: 785.
(508) Eastoe, J. E. 1955 Biochem. J. 61: 589.
(509) Chang T., Penefsky H.S. Aurovertin, a fluorescent probe of conformational change in beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 1973, 248(8): 2746–2754.
(510) Reiser, A. 1959 in *Hydrogen Bonding* (D. Hadži and H. W. Thomspon, eds.) Pergamon Press, New York, pp. 443–447.
(511) Kossiakoff, A. and Harker, D. 1938 J. Amer. Chem. Soc. 60: 2047.
(512) Coulson, C.A. 1959 in *Hydrogen Bonding* (D. Hadži and H. W. Thompson, eds.) Pergamon Press, New York, pp. 339–360.
(513) Burawoy, A. 1959 in *Hydrogen Bonding* (D. Hadži and H. W. Thompson, Eds.), Pergamon Press, New York, pp. 259–276.
(514) Baur, E. 1913 Zeitshr. f. Elektrochem. 19: 590.
(515) Loeb, J. and Beutner, R. 1913 Biochem. Z. 51: 295, 296.
Beutner, R. 1914 Z. Physik. Chem. 87: 392.
(516) Ling, G.N. and Walton, C. 1975 Physiol. Chem Phys. 7: 215.
(517) Ling, G.N. 1970 Physiol. Chem. Phys. 2: 242.
(518) Michaelis, L. and Perlzweig, W. A. 1927 J. Gen. Physiol. 10: 575.
(519) Ling, G.N. 1967 in *Thermobiology* (A. H. Rose, ed.) Academic Press, New York, pp. 5–24.
(520) Dawson, W.R. and Schmidt-Nielson, K. 1964 in *Handbook of Physiology* (D.B. Dill, ed) Amer. Physiol. Soc., Washington pp. 481–492.
(521) Belding, H. S. 1967 in *Thermobiology* (A. H. Rose, ed.) Academic Press, New York, pp. 479–510.
(522) Hammett, L. P. Physical Organic Chemistry. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, N.Y., 1940. Есть русский перевод второго издания этой книги: Гамет Л. Основы физической органической химии. Скорости, равновесия и механизмы реакций. М., Мир, 1972, 534 с.
(523) Tasaki, I. and Iwasa, K. 1980 Biol. Bull. 159: 494.
Tasaki, I. Iwasa, K. and Gibbons, R.C. 1980 Jap. J. Physiol. 30: 897.
(524) Tasaki, I and Byrne, P.M. 1994 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 26: 101.
(525) Nakao, M., Nakao, T., Yamtzoe, S. and Yoshikawa, H. 1973 J. Biochem. (Tokyo) 49: 487.
(526) Arist. Metaph. 983b.
(527) McKie, D. 1952 *Antoine Lavoisier*, Da Capa Press, a Subsidairy of Plenum Publ. Co., New York.
(528) Dubos, R. 1950 *Louis Pasteur; Free Lance of Science*, Da Capa Press, a subsidiary of Plenum Publ. Co. New York.
(529) Bronowski, J. 1973 *The Ascent of Man*, Little, Brown & Co., Boston.
(530) Ling, G. N. 1994 Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR 26: 121.
(531) Weissbluth, M. 1974 *Hemoglobin: Cooperativity and Electronic Properties*, Springer Verlag, New York.
(532) McBain, J. W. 1932 *The Sorption of Gases and Vapors by Solids*, George Routledge and Sons, London.
(533) de Boer, J, H, and Zwikker, C. 1929 Z. Physik. Chem. B3: 407.
(534) Brunauer, S., Emmett, P.H. and Teller, E. 1938 J. Amer. Chem. Soc. 60: 309.
(535) Mellon, E.F., Korn, A.H. and Hoover, S.R. 1948 J. Amer. Chem. Soc. 70: 3040.
(536) Perutz, M.F. 1969 Proc. Roy. Soc. B173: 113.
(537) von Helmholtz, H. 1881 in: *The Modern Development of Faraday's Conception of Electricity*, The Faraday Lecture, delivered before the Fellows of the Chemical Society in London on April 5, 1881.
(538) Schultze, H.E. and Heremans, J.F. 1966 *Molecular Biology of Human Proteins*, Vol 1, Elsevier Publ. Co., New York, p. 4.
(539) Schatzmann, H, J, 1953 Helv. Physiol. Pharmecol. Acta 11: 346.
Dunham, E.T. and Glynn, I. M. 1961 J. Physiol. (London) 156: 274.
Bonting, S.L. and Caravaggio, L.L. 1963 Arch. Biochem. Biophys 101: 37.
Bonting, S. L. in *Membrane and Ion Transport*, Vol. 1 (E.E. Bittgar, ed.) Wiley-Interscience, New York, p. 257.
(540) Ling, G.N. and Palmer, L. 1972 Physiol. Chem. Phys. 4: 517.
(541) Yang, C.N. 1972 in *Phase Transition and Critical Phenomena* (C. Domb and M.S. Green eds.), Academic Press, New York, pp. 1–5.
(542) Quinke, G. 1898 Ann. Physik 64: 618.
(543) Ling, G. N. 1979 in *The Aqueous Cytoplasm* (A.D. Keith, ed.) Marcel Dekker, New York.
(544) Korn, E.D. 1978 Proc. Nat. Acad. Sci. 75: 588.
(545) Ingber, D.E. and Folkman, J. 1989 in *Cell Shape, Determinants, Regulation and Regulatory Role* (W.D. Stein and F.B. Bronner, eds.) Academic Press, San Diego.
(546) Fischer, M.H. and Moore, G. 1907 Amer. J. Physiol. 20: 350.
(547) Ling, G.N. <http://www.gilbertling.org/lp12.htm>
(548) Lauffer, M.A. 1975 *Entropy-Driven Processes in Biology: Polymerization of Tobacco Mosaic Virus, Proteins and Similar Reactions*, Springer Verlag. New York.
(549) Ling, G.N. and Ochsenfeld, M.M. 1977 Physiol. Chem. Phys. 9: 427.
(550) Ling, G.N. 1957 in *Metabolic Aspects of Transport across Cell Membranes* (Q.R. Murphy, ed.) Univ. Wisconsin Press, Madison, Wisc., pp. 181–186.
(551) Bruno, L.D. 2001 Newsday (Long Island, N.Y.), January 15, p. C-17, Section "Not for Profit."
(552) Haseltine, E. 2000 Discover (Twentieth Anniversary Issue), October Issue, p. 84.
(553) Shute, N., 2001 U.S. News and World Report, February Issue p. 44.
(554) McQueen, A. 2000 The Philadelphia Inquirer June 28, page A4 C.
(555) <http://project2061.aaas.org/newsinfo/press/r1000627.htm>
(556) Dawson, R. 1981 *Confucius*, Oxford University Press, Oxford.
(557) Lyster, R.L.J. 1955 Ph.D. Thesis, Cambridge University Cambridge, England.
Rossi-Fanelli, A., Antonini, E. and Caputo, A. 1984 Adv. Protein Chem. 19:73.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абдергальден Эмиль, с. 41
Абецедарская, с. 146
Абоод, с. 249
Авеню Генри, с. 159
Айзенберг Э. И., с. 33, 34, 58, 125, 126, 128, 263
Акаике, с. 237, 238, 248, 249, 294
Александров, с. 246
Альфред Кларк, с. 198, 200
Амсон, с. 41, 129, 135
Анаксимен, с. 261
Андреоли, с. 149
Анфинсон, с. 164, 168
Аристотель, с. 169, 261
Аррениус, с. 64, 243, 265, 339
Арьенс, с. 198
Асунмаа, с. 153

Банч, с. 146
Бартелл, с. 135, 153
Баур Э., с. 239, 240–242
Бенджамин Мур, с. 52
Берендсен, с. 211–214
Берлунд, с. 137, 153
Бернсток, с. 250
Бернштейн, с. 39, 40, 235, 236, 251, 283
Бернштейн Юлиус, с. 30, 38, 40, 234
Бертил Якобсон, с. 92
Бесинджер, с. 108
Бертло, с. 326
Бигелоу, с. 135, 153
Блей, с. 260, 297
Блох Ф., с. 342
Бойль, с. 41, 129, 135
Бор, с. 210, 211, 294
Борн, с. 320, 328
Боттс, с. 172
Бранд, с. 213
Брегман, с. 160–161
Бредли, с. 99, 100, 282, 312, 323
Бриссо-Мирбель, с. 23
Брукс, с. 233–235, 296
Брунауэр, с. 98, 99
Бруно, с. 304
Бунгенберг-де-Йонг, с. 48, 49, 51, 61, 93, 104, 106, 109, 157–160, 163, 285, 293, 325, 330
Буравой, с. 184
Буш Ваннавер, с. 309
Бэкон Френсис, с. 261
Бюргер Альфред, с. 20, 21, 188
Бютнер Рихард, с. 240
Бюхтал Фриц, с. 55

В. Генри, с. 159, 197, 198
Вальтер Нернст, с. 238
ван Левенгук Антони, с. 23
ван Россум, с. 199
Вант-Гофф Якоб Хендрик, с. 26, 28–30, 55, 121, 264, 265, 332, 340
Вейсман Август, с. 297
Верц, с. 211
Вёсснер, с. 110
Виллегас, с. 260, 297
Вилли Кюне, с. 50
Вильгельм Оствальд, с. 38
Вуд, с. 281
Вудбери, с. 63

Галилей Галилео, с. 23, 304, 307
Гамбургер Х., с. 33
Гаммет, с. 179, 183, 324, 325
Гарнье, с. 166
Гейгера, с. 219
Генри С., с. 197, 198, 321
Гераклит, с. 261
Герман Л., с. 246
Герман фон Гельмгольц, с. 263
Гийермон, с. 61
Гиппон, с. 261
Голдсмит Майкл, с. 101
Гольдман, с. 236, 254
Горовитц, с. 240–242, 246, 283
Горович, с. 219–221
Гортнер Росс, с. 47, 54–56, 121
Гравен, с. 233
Грандфест Гарри, с. 158
Грегор Гарри, с. 212, 243
Грэм Дайан, с. 281
Грэм Томас, с. 46, 47, 104, 135, 247, 325, 326, 328
Грэхем, с. 131, 156, 265, 328
Грю, с. 23
Гувер, с. 99
Гугенгейм, с. 322
Гук Роберт, с. 23, 24
Гулати, с. 89, 90

Дагган, с. 139, 140
Дамадьян Реймонд, с. 101, 102, 174, 270
Даниэли, с. 137
Дарвин Чарльз, с. 33
де Бур, с. 98, 338
де Врис Хуго, с. 28, 31
Дебай, с. 64, 243, 265, 268, 339
Декарт, с. 261
Демокрит, с. 261
Джекоб Брегман, с. 157
Джерард Ральф, с. 6, 58, 63, 131, 155, 156, 247, 249, 265, 328
Джордж Эйзенман, с. 131, 158
Джудит Грэм, с. 156
Диксон, с. 197
Дин Роберт, с. 42
Доннан Фредерик, с. 30, 38, 39, 40, 41, 127, 203
Дэвис, с. 175
Дюбуа-Реймон Эмиль, с. 338
Дюжарден Феликс, с. 24, 35, 36, 46, 50, 106, 108, 170, 335
Дюкло, с. 61
Дютроше Рене, с. 26–28, 261

Ёшиока, с. 233, 234

Жан Батист Ламарк, с. 169
Зайер, с. 158, 163
Земмельвейс, с. 304
Зингер, с. 137, 251

Изард, с. 162
Изинг Эрнст, с. 313, 329
Инуе, с. 107, 148
Инфант, с. 175
Исава, с. 259

Кайе, с. 146
Кайт, с. 36, 107
Каллермайер Миклош, с. 57
Каллсен, с. 146
Камерон И. Л., с. 37
Камнев И. Е., с. 33, 34, 58, 60, 61, 125, 126, 128, 263
Кант Иммануил, с. 306
Карл Людвиг, с. 265
Карлсон, с. 328
Карреман, с. 143
Катц Бернард, с. 43, 44, 332
Катц, с. 44, 156, 160, 236, 254, 285
Катц Юлиус, с. 41, 100, 122–124
Квинке, с. 136
Квон, с. 227–229
Кейнс Ричард, с. 43, 44, 73, 76, 235, 265
Кеннон, с. 165, 167
Керн, с. 266
Кесби Джим, с. 158–161, 285, 293
Кирквуд, с. 66. 172, 173
Клег Джим, с. 103
Клерк, с. 304
Клотц, с. 92
Колачикко, с. 239, 240
Колбер, с. 218
Колландер, с. 136, 137, 153
Кон Фердинанд, с. 24
Конвей, с. 41, 129, 135, 139, 140, 157, 160
Корн, с. 99
Коул, с. 148
Коуп Фриман, с. 101, 103, 210, 211, 226
Кофэд-Йонсен, с. 231
Кремер, с. 241, 244
Кромаш, с. 330
Кронман С., с. 239, 240

ойт Х., с. 48, 325
лон, с. 173
н Томас, с. 336
палов П. С., с. 120
рода, с. 50
шмерик, с. 44, 73, 74, 76
оне Вильгельм, с. 35, 50, 197
ори, с. 329

вуазье Антуан, с. 262, 304
марк Жан Батист, с. 9, 26
нг, с. 243
рди, с. 233
ви, с. 219–222
йдиг Франц, с. 25, 54, 138
нгмюр Ирвинг, с. 79, 99, 100, 186, 205, 216, 217, 239, 240, 267, 321, 323, 327, 339
пешкин В. В., с. 19, 50, 53, 54, 56, 59, 61, 106–108, 169, 171, 261, 264
рмит, с. 136
бих Юстус, с. 136
лли Ральф, с. 42
нг, с. 5, 6, 16–19, 39, 44, 58, 62–64, 67, 69–72, 74, 78–81, 83–87, 92, 95, 97, 99, 100, 108, 110, 113–117, 123, 124, 127, 130, 131, 133, 134, 138, 140–146, 150, 152, 156, 162, 171, 179, 183, 185, 187, 193, 196, 198, 199, 201–206, 210, 211, 213, 217, 220, 221, 223–230, 247–249, 255, 257, 263, 265, 274, 277, 278, 293, 294, 312–316, 320, 325, 326, 328–331
ндблом, с. 213
нденберг, с. 110, 116
ндерстрём, с. 243
ндерстрём-Ланг Кай Ульрик, с. 64, 65
пман, с. 129, 262
стер, с. 277
манн, с. 129, 262
тербург Пол, с. 102
ффер, с. 172
димар Герман, с. 246, 338
нсгор, с. 262
юис, с. 324, 327
бимова М. Н., с. 328, 332, 333, 335–339
двиг Карл, с. 111

дрел, с. 232
каллум, с. 56, 84, 86
лофф, с. 151, 233
Мальпиги, с. 23
Матвеев В. В., с. 62
Мевес, с. 253, 257–259
Мейергоф, с. 129
Меллон, с. 99
Мери Кэрол Вильямс, с. 160
Мизусима, с. 167
Миллер, с. 92, 130
Минкофф Лари, с. 101
Михаэлис, с. 41, 79, 135, 140, 153, 197, 198, 242, 244, 321, 339
Михаэлис Леонор, с. 241
Моддерман, с. 49, 109
Мольденгавер, с. 23
Монд, с. 41, 129, 135
Моралес, с. 131, 132, 172, 262, 327
Мур Бенджамин, с. 52, 56, 59, 61, 63, 128, 129, 156, 264
Мюллер Пол, с. 140

Накао, с. 228
Насонов Д. Н., с. 19, 33, 34, 56–59, 61, 62, 125, 126, 128, 229, 246, 247, 263, 264
Натансон, с. 137
Невилл, с. 218
Негенданк, с. 99, 100, 124, 134, 151
Нернст, с. 240, 283, 326, 335
Неттер Г., с. 41
Николсон, с. 137, 251
Никольский, с. 240–242, 246
Нолле, с. 26, 28, 111, 135, 137, 152
Ньютон, с. 307
Ню, с. 114

Овертон Чарльз Э., с. 32, 33, 42, 52, 136
Овертон Эрнест, с. 137, 152, 240, 264, 285
Окен Лоренц, с. 26, 301
Оксенфельд Маргарет, с. 74, 79–84, 86, 102, 108, 114, 130, 140, 143, 150, 206, 257, 311, 315
Опарин, с. 61
Оствальд Вольфганг, с. 38, 47, 53

Парацельс, с. 261, 262
Парселл Э. М., с. 342
Пастер Луи, с. 262
Паули, с. 48, 54
Пенефский, с. 91, 207
Перлцвейг , с. 241
Перутц, с. 185, 298
Питерсон, с. 226
Подольский, с. 44, 73, 74, 76, 131, 132, 262, 327
Полинг Л., с. 342
Прессман, с. 233
Пристли Джозеф, с. 261, 262, 304, 307
Пфеффер Вильгельм, с. 26, 28–30, 35, 36, 38, 54, 106, 121, 135, 138, 263, 264

Райзман, с. 66, 172, 173
Райт, с. 225
Рейган Рональд, с. 102
Рейзер, с. 181, 183
Рейзин, с. 143, 146
Ремак Роберт, с. 24
Рингер С., с. 60, 69, 70, 74, 82, 122–124, 128, 206, 210, 211, 214, 216, 217, 219–221, 223, 224, 227–229, 250, 282, 290, 292, 299, 327, 328, 335
Розенталь, с. 158, 163
Рона, с. 48, 54
Роршах Бад, с. 103
Ротшух Карл, с. 306
Роуф, с. 59, 61, 129, 264
Роуф Герберт, с. 52, 56, 63, 156, 264
Рудин Дональд, с. 40, 158–161, 285, 293
Рузвельт, с. 309
Рутман, с. 131
Рухланд, с. 137, 153

Саладино, с. 228
Сент-Дьёрдьи Альберт, с. 92, 93, 101
Силлен, с. 239, 240
Сингер
Скоу, с. 232
Скоу Йенс Кристиан, с. 42, 129–131
Сноуден, с. 110
Соллнер, с. 242, 284
Спикман, с. 213
Стейн, с. 218
Стерлинг Джеймс Хатчинсон, с. 297, 298
Стиллман, с. 151, 258
Сэмюелс Маргарет, с. 160

Тай, с. 179, 324
Тайтлер Джеймс, с. 307
Танака, с. 166
Тасаки, с. 259
Тафт Роберт, с. 179, 324, 326
Теллер, с. 98
Тёниссен, с. 157, 158, 163
Тидьи Йожеф, с. 57, 100
Тидьи-Шебеш, с. 86
Томсон Уильям (лорд Кельвин), с. 3, 304
Траубе Мориц, с. 26, 28, 29, 47, 135, 136
Тревиранус Готфрид, с. 23
Тромбиташ, с. 86
Трошин А. С., с. 19, 44, 51, 58–62, 203, 204, 246, 264, 265, 280, 312, 314, 326, 335, 340

Уеда, с. 107, 148
Уилсон Эдмунд Бичер, с. 25, 57
Уилл, с. 217, 329, 333
Уолтер,146
Уолтон с. 97, 108, 225, 328
Уссинг с. 219–222, 231
Уэбб, с. 197

Фарадей Майкл, с. 22, 46, 47, 241, 261, 304, 305, 307, 311, 322
Фасман, с. 166
Фаулер Ральф, с. 342
Фенн У., с. 55
Фик, с. 262
Финч, с. 146
Фишер Мартин, с. 47, 53, 56, 60, 61, 111, 112, 125, 225, 264, 265
Фишер Эмиль, с. 41, 129, 188
фон Галлер, с. 23
фон Гельмгольц Герман, с. 304
фон Зглиницки, с. 86
фон Корози, с. 225
фон Моль Гуго, с. 24, 36, 46, 50, 170
фон Негели Карл, с. 24, 35, 50
фон Ханштейн
Франклин Бенджамин, с. 177
Франклин Делано, с. 309
Фрейндлих Фокс С., с. 333
Фу, с. 223, 224
Фудзита, с. 153

Хаген, с. 139, 140
Хаксли Томас, с. 52, 170, 251, 252, 257, 285, 296, 297, 332, 333, 335
Хантер, с. 135
Харви, с. 137, 148
Хёбер Рудольф, с. 44, 45, 55, 73

Хейзелвуд Карлтон, с. 101, 103
Хейл, с. 92
Хёфлер К., с. 32, 34, 126, 137
Хилл, с. 262
Хилл Арчибальд, с. 43, 45, 55, 56, 72, 93, 120, 121, 185, 235, 265
Хилле, с. 258, 259
Хинке, с. 146
Ходжкин Алан, с. 40, 43, 44, 73, 76, 156, 160, 219–221, 234–236, 251, 252, 254, 257, 265, 285, 296, 332–335
Ходоров, с. 258
Холл Томас, с. 261, 298
Холлеман, с. 49, 108, 109
Хопкинс Джонс, с. 63, 101
Хорган, с. 309
Хоттер, с. 229
Хоуп, с. 146
Хоффман, с. 153
Ху, с. 113, 114, 123, 124, 328
Хуан, с. 77
Хюккель, с. 64, 243, 265, 339

Цвааль, с. 149
Цвиккер, с. 98, 338

Чамберс, с. 92
Чанг, с. 179, 191, 207
Чандлер, с. 253, 257, 259
Чанс, с. 233, 234
Чемберс Р., с. 31
Чемберс Э. Л., с. 31
Чжан, с. 71, 72, 213
Чжэнь-дон-Чэнь, с. 102, 311
Чиан, с. 324

Шаллер, с. 151
Шванн Теодор, с. 23, 24, 26, 29, 30, 42, 263
Шеннон, с. 329, 333
Шерага, с. 166
Шлейден Матиас, с. 26
Шмолинске, с. 220
Шталь Георг, с. 262
Штаудингер Герман, с. 47
Шу, с. 166
Шульце Макс, с. 25, 46, 52, 54, 138, 146, 153, 334

Эдельман Людвиг, с. 84–86, 88, 89, 247, 257, 319
Эдзес, с. 211–214
Эйзенман, с. 140, 158–162, 214, 285, 293
Эмметт, с. 98
Энгельгардт, с. 172, 328
Энгельман, с. 262
Эпштейн, с. 139, 140
Эйнштейн Альберт, с. 305
Эрвин Шрёдингер, с. 175, 176
Эренсвард, с. 239, 240
Эрленмейер, с. 90
Эрнст Енё, с. 44, 55–57, 100, 123, 264

Якобсон Бертил, с. 92, 93
Янг, с. 6, 185, 187, 247, 277, 278, 313
Янссен Захария, с. 23
Ярдецкий, с. 211



ОБ АВТОРЕ

Уроженец Нанкина, Гильберт Линг вырос и получил начальное образование в Пекине, а степень бакалавра биологии — в Национальном центральном университете города Чунцин. Вскоре после окончания университета он принял участие в общенациональном конкурсе, победил в нем и поэтому смог продолжить биологическое образование в США, покинув раздираемый войной Китай. Свое последипломное обучение он начал в начале 1946 года в отделе физиологии Чикагского университета под руководством всемирно известного профессора Ральфа Джерарда (Ralf W. Gerard). Получив в 1948 году степень PhD, он еще два года проработал под руководством профессора Джерарда как стипендиат фонда Seymour Coman. В 1950 году он стал преподавателем в Медицинской школе Университета Джонса Хопкинса в Балтиморе, и работал там до 1953 года, когда вновь получил приглашение в Чикаго.

Трехгодичная работа в Балтиморе была ознаменована тремя важными событиями. Во-первых, результаты последних исследований привели его к выводу, что традиционная мембранная физиология клетки полна огромных противоречий. Во-вторых, он предложил заменить ее теорией, позднее названной теорией фиксированных зарядов Линга. Третье событие состояло в том, что он принял приглашение на обед вместо того, чтобы пойти в кино. Он и не подозревал, что встретит за столом красивую и талантливую Ширли Вонг (Shirley Wong), а впоследствии женится на ней. Ширли была некогда одноклассницей сестры Линга, Нэнси, еще в Шанхае, потом студенткой консерватории Пибоди (ныне Институт Пибоди) в Балтиморе, где училась в классе фортепиано у самого Мечислава Мюнца (M. Munz).

В Чикаго у Линга была возможность продолжать исследования в Нейропсихиатрическом институте Медицинской школы Иллинойского университета. Начав с должности старшего преподавателя, через два года он был повышен до штатного адъюнкт-профессора. В 1957 году еще более заманчивая работа увлекла его обратно на восток США — в Филадельфию. Но еще до отъезда из Чикаго он сумел заложить основы своего будущего исследования, главного труда своей жизни.

В то время в Филадельфии под руководством Джозефа Кларка (Joseph Clark) и Ричардсона Дилуорта (Richardson Dilworth) проводили строительные работы. В рамках реконструкции был возведен новый 9-этажный Психиатрический

институт Восточной Пенсильвании (ПИВП), последний этаж которого, с живописным видом на окрестности, был отведен Отделу фундаментальных исследований, где Лингу в должности старшего научного сотрудника и его команде предстояло проводить исследования на протяжении следующих пяти лет. В ПИВП он закончил свою первую книгу. Уоррен Блайсделл (Warren Blaisdell), президент незадолго до этого основанного издательства Blaisdell Publishing Co. (отделение издательства Random House), подписал с ним договор о публикации книги под названием: «Физическая теория жизни: теория ассоциации-индукции». Книга вышла в свет в 1962 году.

К сожалению, райским условиям для работы в ПИВП не суждено было длиться долго. Уже в 1961 году Лингу и его единомышленникам из Отдела фундаментальных исследований пришлось собирать чемоданы.

Линг стоял на распутье: принять должность штатного профессора, предложенную ему в Луизианском университете Тулейна, где ему пришлось бы уделять много времени преподаванию фармакологии, или же посвятить себя целиком исследованиям, положившись на непредсказуемые гранты? Пользуясь решительной поддержкой своей жены, он выбрал рискованную судьбу грантодержателя, решившись на создание свой лаборатории в Пенсильванской больнице. Важным преимуществом этого варианта был профессор Фрэнк Эллиотт (Frank Elliott), блестящий, остроумный и влиятельный невролог, отдававший должное экспериментальной работе, и взявший Линга и его коллег под свое покровительство. Начался новый период научной карьеры Линга. Притягательной стороной Филадельфии был еще и вековой дом викторианской эпохи, где Линги жили уже на протяжении многих лет, где они вырастили троих детей, и где Линг мог полноценно отдыхать, предаваясь своему страстному увлечению розами, возделывая сразу 70 кустов, и заботам об огороде.

Пенсильванская больница, основанная Бенджамином Франклином и Томасом Бондом, — первая больница Америки. В то время она и сама переживала возрождение. Под умелым руководством молодого президента Х. Роберта Каткарта (H. Robert Cathcart) и на средства Фонда Джона Хартфорда, в больнице были собраны видные врачи со всего мира, и среди них Фрэнк Эллиотт (Frank Elliott). В такой вдохновляющей атмосфере приключений и надежды появилась первоклассная научная лаборатория, которую разместили в отдельном двухэтажном здании, до этого служившем складом, и некогда принадлежавшем католическому детскому дому. Так на углу 7-й и Хвойной улиц в центре Филадельфии, в районе Society Hill, возник Отдел молекулярной биологии.

Именно здесь Линг проведет следующие 27 лет в напряженных исследованиях вместе со своей научной группой, студентами и аспирантами со всего мира. Кроме того, каждое лето в его группу вливались студенты-стажеры, привносившие в нее не только энтузиазм молодости, но и талантливые озарения и находки, явившиеся немалым вкладом в фундаментальную науку. Но особенно важную роль в том, что эти 27 лет новаторских исследований стали возможными, сыграли двое выдающихся ученых-руководителей. Это доктор Артур Каллахан (Arthur Callahan) из Управления морских исследований США и доктор Стивен Скьяффино (Stephen Schiaffino) из Национального института здоровья США. Их заслуга состояла в том, что они приглашали для оценки научных проектов Линга только нейтральных экспертов, что требовало от них немалого мужества и упорства. В 1984 году Линг выпустил свою вторую книгу, «В поисках физической основы жизни» (Plenum Publ. Co.), в которой обобщил накопившийся к тому времени огромный материал, полученный как в его лаборатории, так и независимыми исследователями. Увы, в конце концов, Каллахан и Скьяффино ушли в отставку. С их уходом обстановка начала быстро ухудшаться. В октябре 1988 года из-за прекращения финансирования лаборатория Линга была закрыта.

В этот критический момент в ситуацию вмешался замечательный ученый и человек — доктор Реймонд Дамадьян (Raymond Damadian), изобретатель магнитно-резонансной томографии и президент компании Fonar, занимающейся изготовлением аппаратов МРТ и расположенной в Нью-Йорке, в районе Мелвилл на Лонг-Айленде. С тех пор Fonar оказывает всю возможную поддержку Лингу и двум его сотрудникам, Маргарет Оксенфельд (Margaret Ochsenfeld) и доктору Чжэнь-дун Чэню (Zhen-dong Chen).

Вместе с книгами, записями и лабораторным оборудованием Линг перевез на Лонг-Айленд и редакцию научного журнала Physiological Chemistry & Physics and Medical NMR. Он был одним из редакторов этого журнала между 1982 и 1984 годами, а с 1984 года является его главным редактором.

Поскольку миссис Линг, занимавшаяся преподавательской и концертной деятельностью, не могла оставить свою клиентуру на Лонг-Айленде, Линги решили приобрести квартиру в Кингс-Парк, около 20 минут езды от Fonar. С тех пор доктор Линг каждый уик-энд путешествует на машине между Лонг-Айлендом и Филадельфией.

В 1992 году Линг выпустил третью книгу: «Революция в физиологии клетки». Через пять лет он начал писать и эту, последнюю пока, книгу, адресованную гораздо более широкой аудитории.

УЧАСТНИКИ ПРОЕКТА ПО ПЕРЕВОДУ КНИГИ ЛИНГА НА РУССКИЙ ЯЗЫК

Инициатор и директор проекта: к. т. н. **Александр Вячеславович Малыгин (malygin.av@gmail.com)**. Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН. Санкт-Петербург.

Переводчик: **Антон Борисович Иванюк (antonivanyuk@gmail.com)**. Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития РФ.

Научный редактор: к. б. н. **Владимир Васильевич Матвеев (vladimir.matveev@gmail.com)**. Институт цитологии РАН. Санкт-Петербург. Персональная страница: www.actomyosin.spb.ru.

Участники проекта будут признательны за замечания и отзывы о книге.

СОДЕРЖАНИЕ

Почему мы взялись за перевод этой книги? 2
Предисловие автора к английскому изданию 2
Предисловие автора к русскому изданию 2
Предисловие Джеральда Поллака 2
Предисловие научного редактора перевода 2
ВВЕДЕНИЕ 2
Глава 1. **ЧТО ЗНАЧИТ ВЗЯТЬСЯ НЕ С ТОГО КОНЦА** 2
Глава 2. **ФИЗИОЛОГИ ПОВТОРЯЮТ ОШИБКИ МОРФОЛОГОВ** 2
Глава 3. **РОЖДЕНИЕ МЕМБРАННОЙ ТЕОРИИ** 2
Глава 4. **ЧТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О ТОМ, ЧТО ЛЮБАЯ КЛЕТКА ПОКРЫТА МЕМБРАНОЙ?** 3
4.1. Изменения объема клеток и проницаемости мембран 3
1. Полупроницаемый диффузионный барьер на поверхности клетки 3
2. Плазмолиз 3
3. Переходные и устойчивые изменения объема клеток 3
4. Регенерация мембраны 3
4.2. Мембранная теория электрических потенциалов Бернштейна 3
4.3. Теория распределения ионов и мембранного потенциала Доннана 4
Глава 5. **ЧТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О СОДЕРЖИМОМ КЛЕТКИ КАК О РАЗБАВЛЕННОМ РАСТВОРЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ?** 4
5.1. Первые свидетельства свободного состояния воды в клетке 4
5.2. Первые свидетельства свободного состояния клеточного K^+ 4
Глава 6. **КОЛЛОИД — БЕСЦЕННЫЙ ДАР ХИМИКОВ** 4
6.1. Коллоидная система как убедительная модель протоплазмы 4
6.2. Коацерваты 4
1. История 4
2. Взгляды Бунгенберг-де-Йонга на физическое состояние воды в коацерватах 4
3. Коацерват и протоплазма 5
4. Коацерват и клетка 5
Глава 7. **НАСЛЕДИЕ ПОЛУЗАБЫТЫХ ПЕРВОПРОХОДЦЕВ** 5
Глава 8. **ИТОГИ РАЗГРОМА** 5
8.1. Венгерская группа под руководством Енё Эрнста 5
8.2. Ленинградская школа Насонова—Трошина 5

ТНИКИ ПРОЕКТА
ЕРЕВОДУ КНИГИ ЛИНГА НА РУССКИЙ ЯЗЫК

иатор и директор проекта: к. т. н. **Александр Вячеславович Малыгин** **ı.av@gmail.com**). Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН. Санкт-рг.

одчик: **Антон Борисович Иванюк** (**antonivanyuk@gmail.com**). Санкт-ргская государственная педиатрическая медицинская академия Ми-ва здравоохранения и социального развития РФ.

ый редактор: к. б. н. **Владимир Васильевич Матвеев** (**vladimir.matveev@ m**). Институт цитологии РАН. Санкт-Петербург. Персональная стра-ww.actomyosin.spb.ru.

ники проекта будут признательны за замечания и отзывы о книге.

СОДЕРЖАНИЕ

Почему мы взялись за перевод этой книги? 5
Предисловие автора к английскому изданию 6
Предисловие автора к русскому изданию 13
Предисловие Джеральда Поллака 16
Предисловие научного редактора перевода 19
ВВЕДЕНИЕ 20
Глава 1. **ЧТО ЗНАЧИТ ВЗЯТЬСЯ НЕ С ТОГО КОНЦА** 23
Глава 2. **ФИЗИОЛОГИ ПОВТОРЯЮТ ОШИБКИ МОРФОЛОГОВ** 26
Глава 3. **РОЖДЕНИЕ МЕМБРАННОЙ ТЕОРИИ** 28
Глава 4. **ЧТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О ТОМ, ЧТО ЛЮБАЯ КЛЕТКА ПОКРЫТА МЕМБРАНОЙ?** 31
4.1. Изменения объема клеток и проницаемости мембран 31
1. Полупроницаемый диффузионный барьер на поверхности клетки 31
2. Плазмолиз 31
3. Переходные и устойчивые изменения объема клеток 32
4. Регенерация мембраны 35
4.2. Мембранная теория электрических потенциалов Бернштейна 38
4.3. Теория распределения ионов и мембранного потенциала Доннана 40
Глава 5. **ЧТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О СОДЕРЖИМОМ КЛЕТКИ КАК О РАЗБАВЛЕННОМ РАСТВОРЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕЩЕСТВ?** 43
5.1. Первые свидетельства свободного состояния воды в клетке 43
5.2. Первые свидетельства свободного состояния клеточного K^+ 43
Глава 6. **КОЛЛОИД — БЕСЦЕННЫЙ ДАР ХИМИКОВ** 46
6.1. Коллоидная система как убедительная модель протоплазмы 46
6.2. Коацерваты 48
1. История 48
2. Взгляды Бунгенберг-де-Йонга на физическое состояние воды в коацерватах 48
3. Коацерват и протоплазма 50
4. Коацерват и клетка 51
Глава 7. **НАСЛЕДИЕ ПОЛУЗАБЫТЫХ ПЕРВОПРОХОДЦЕВ** 52
Глава 8. **ИТОГИ РАЗГРОМА** 56
8.1. Венгерская группа под руководством Енё Эрнста 56
8.2. Ленинградская школа Насонова—Трошина 57

Глава 9. **СОРБЦИОННАЯ ТЕОРИЯ ТРОШИНА** 59
Глава 10. **ТЕОРИЯ ФИКСИРОВАННЫХ ЗАРЯДОВ ЛИНГА** 63
10.1. Теория избирательного накопления K^+ в присутствии Na^+ 64
1. Усиление ассоциации противоионов (или нейтральных молекул) с центром связывания, если он становится неподвижным, фиксированным 64
2. Теория белковых солевых связей и значение АТФ в их динамике 66
3. Электростатическая модель избирательного накопления в клетке K^+ в присутствии Na^+, созданная в 1952 году 67
10.2. Экспериментальное подтверждение ТФЗЛ (и некоторых положений теории АИ) 68
1. Цитоплазма, а не клеточная мембрана, избирательно аккумулирует K^+ в клетке и вытесняет из нее Na^+ 68
2. Факты, подтверждающие, что образование солевых связей — главная причина неспособности изолированных белков избирательно связывать K^+ 71
3. Основная масса клеточного K^+ не является свободной 73
3.1. Подвижность внутриклеточного K^+ 73
3.2. Дисперсионный рентгеновский микроанализ 76
3.3. Активность K^+ внутри клетки, измеренная при помощи K^+-селективного микроэлектрода 77
4. Клеточный K^+ адсорбируется β- и γ-карбоксильными группами со стехиометрией одна группа — один ион 79
4.1. Адсорбция K^+ отвечает требованиям модели Ленгмюра 79
4.2. K^+ адсорбируется на β- и γ-карбоксильных группах 82
5. В поперечнополосатых мышечных волокнах большинство β- и γ-карбоксильных групп, адсорбирующих K^+, принадлежит миозину 84
6. Взаимосвязь между количеством адсорбированного K^+ и АТФ 87
7. Итоги раздела 10.2 89
Глава 11. **ТЕОРИЯ МНОГОСЛОЙНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОЛЯРИЗОВАННОЙ ВОДЫ В КЛЕТКЕ** 92
11.1. История вопроса 92
11.2. Теория многослойной организации поляризованной воды в клетке и ее мировое признание 93
11.3. Следствия теории МОПВ для теории и практики и их подтверждение.. 100
1. Изобретение магнитно-резонансной томографии (МРТ) 100
2. Уникальные свойства желатина — ключ к новому пониманию коллоидов 103
3. Новая гипотеза коацервации, основанная на теории МОПВ 104
4. Количественная теория распределения веществ между клеточной водой и водой окружающей среды вследствие их вытеснения из клетки или модельных систем 111
5. Почему величина параметра q для ионов натрия в клетках ниже, чем в экстравертных моделях? 119
6. Ответ Арчибальду Хиллу на его аргумент в пользу свободной воды и K^+ в клетке 120
7. Осмотическая регуляция объема клетки 121
7.1. Что снижает активность воды в клетке до активности воды раствора Рингера? 12
7.2. Обратимое осмотическое сжатие содержимого диализных мешков с растворами экстравертных моделей, погруженных в концентрированные растворы веществ, для которых их мембрана полностью проницаема 12
Глава 12. **ТЕОРИЯ МЕМБРАННЫХ НАСОСОВ И ЕЕ ГЛАВНЫЕ ПРОТИВОРЕЧИЯ** 12
Глава 13. **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ** 13
13.1. История вопроса 13
1. Мембранная теория 13
2. Теория фиксированных зарядов Линга и теория ассоциации-индукции 13
13.2. Проницаемость клеток и модельных систем для ионов 13
13.3. Обмен воды между клеткой и средой ограничен связанной водой, а не мембраной 14
13.4. Проницаемость клеток для воды на порядки выше, чем фосфолипидного бислоя 14
13.5. Поверхностное натяжение на границе раздела клетка/среда ниже, чем на границе раздела фосфолипиды/среда 14
13.6. Ионофоры на порядки усиливают проницаемость для ионов K^+ сплошного, искусственного фосфолипидного бислоя, но слабо влияют на проницаемость для K^+ мембран почти всех исследованных клеток 14
13.7. Поляризованная и структурированная вода вместо фосфолипидного бислоя 15
Глава 14. **ЖИВОЕ СОСТОЯНИЕ: ЭЛЕКТРОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ И УПРАВЛЕНИЕ** 15
14.1. Появление теории ассоциации-индукции 15
1. Вступление 15
2. Величина *c* и количественная модель управления избирательной адсорбцией ионов 16
3. Аналог величины *c* и его влияние на соотношение между степенью свернутости белка и количеством поляризованной воды 16
3.1. Регуляция вторичной структуры белков 16
3.2. Регуляция физического состояния клеточной воды 16
14.2. Что отличает жизнь от смерти на уровне клетки и субклеточных структур? Новая концепция «живого состояния» 16
1. Живое состояние 16
2. Элементарная живая машина 17
3. Чем отличается мертвое состояние от активного живого? 17
4. Что дает пища: энергию или отрицательную энтропию? 17
14.3. Электронный механизм дистанционного каскадного управления 17
1. Электронная индукция в белках 17
2. Кооперативное взаимодействие — основа быстрых согласованных переходов между различными стабильными состояниями 18
3. Классификация лекарственных средств и других кардинальных адсорбатов на ЭАКА, ЭДКА и ЭИКА 18

9. **СОРБЦИОННАЯ ТЕОРИЯ ТРОШИНА** 59
10. **ТЕОРИЯ ФИКСИРОВАННЫХ ЗАРЯДОВ ЛИНГА** 63
10.1. Теория избирательного накопления K^+ в присутствии Na^+ 64
1. Усиление ассоциации противоионов (или нейтральных молекул) с центром связывания, если он становится неподвижным, фиксированным 64
2. Теория белковых солевых связей и значение АТФ в их динамике 66
3. Электростатическая модель избирательного накопления в клетке K^+ в присутствии Na^+, созданная в 1952 году 67
10.2. Экспериментальное подтверждение ТФЗЛ (и некоторых положений теории АИ) 68
1. Цитоплазма, а не клеточная мембрана, избирательно аккумулирует K^+ в клетке и вытесняет из нее Na^+ 68
2. Факты, подтверждающие, что образование солевых связей — главная причина неспособности изолированных белков избирательно связывать K^+ 71
3. Основная масса клеточного K^+ не является свободной 73
3.1. Подвижность внутриклеточного K^+ 73
3.2. Дисперсионный рентгеновский микроанализ 76
3.3. Активность K^+ внутри клетки, измеренная при помощи K^+-селективного микроэлектрода 77
4. Клеточный K^+ адсорбируется β- и γ-карбоксильными группами со стехиометрией одна группа — один ион 79
4.1. Адсорбция K^+ отвечает требованиям модели Ленгмюра 79
4.2. K^+ адсорбируется на β- и γ-карбоксильных группах 82
5. В поперечнополосатых мышечных волокнах большинство β- и γ-карбоксильных групп, адсорбирующих K^+, принадлежит миозину 84
6. Взаимосвязь между количеством адсорбированного K^+ и АТФ 87
7. Итоги раздела 10.2 89

11. **ТЕОРИЯ МНОГОСЛОЙНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОЛЯРИЗОВАННОЙ ВОДЫ В КЛЕТКЕ** 92
11.1. История вопроса 92
11.2. Теория многослойной организации поляризованной воды в клетке и ее мировое признание 93
11.3. Следствия теории МОПВ для теории и практики и их подтверждение.. 100
1. Изобретение магнитно-резонансной томографии (МРТ) 100
2. Уникальные свойства желатина — ключ к новому пониманию коллоидов 103
3. Новая гипотеза коацервации, основанная на теории МОПВ 104
4. Количественная теория распределения веществ между клеточной водой и водой окружающей среды вследствие их вытеснения из клетки или модельных систем 111
5. Почему величина параметра q для ионов натрия в клетках ниже, чем в экстравертных моделях? 119
6. Ответ Арчибальду Хиллу на его аргумент в пользу свободной воды и K^+ в клетке 120
7. Осмотическая регуляция объема клетки 121
7.1. Что снижает активность воды в клетке до активности воды раствора Рингера? 122
7.2. Обратимое осмотическое сжатие содержимого диализных мешков с растворами экстравертных моделей, погруженных в концентрированные растворы веществ, для которых их мембрана полностью проницаема 125

Глава 12. **ТЕОРИЯ МЕМБРАННЫХ НАСОСОВ И ЕЕ ГЛАВНЫЕ ПРОТИВОРЕЧИЯ** 129

Глава 13. **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ** 135
13.1. История вопроса 135
1. Мембранная теория 135
2. Теория фиксированных зарядов Линга и теория ассоциации-индукции 138
13.2. Проницаемость клеток и модельных систем для ионов 139
13.3. Обмен воды между клеткой и средой ограничен связанной водой, а не мембраной 143
13.4. Проницаемость клеток для воды на порядки выше, чем фосфолипидного бислоя 147
13.5. Поверхностное натяжение на границе раздела клетка/среда ниже, чем на границе раздела фосфолипиды/среда 148
13.6. Ионофоры на порядки усиливают проницаемость для ионов K^+ сплошного, искусственного фосфолипидного бислоя, но слабо влияют на проницаемость для K^+ мембран почти всех исследованных клеток 149
13.7. Поляризованная и структурированная вода вместо фосфолипидного бислоя 151

Глава 14. **ЖИВОЕ СОСТОЯНИЕ: ЭЛЕКТРОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ И УПРАВЛЕНИЕ** 155
14.1. Появление теории ассоциации-индукции 155
1. Вступление 155
2. Величина *c* и количественная модель управления избирательной адсорбцией ионов 160
3. Аналог величины *c* и его влияние на соотношение между степенью свернутости белка и количеством поляризованной воды 164
3.1. Регуляция вторичной структуры белков 164
3.2. Регуляция физического состояния клеточной воды 167
14.2. Что отличает жизнь от смерти на уровне клетки и субклеточных структур? Новая концепция «живого состояния» 169
1. Живое состояние 169
2. Элементарная живая машина 172
3. Чем отличается мертвое состояние от активного живого? 174
4. Что дает пища: энергию или отрицательную энтропию? 175
14.3. Электронный механизм дистанционного каскадного управления 177
1. Электронная индукция в белках 178
2. Кооперативное взаимодействие — основа быстрых согласованных переходов между различными стабильными состояниями 184
3. Классификация лекарственных средств и других кардинальных адсорбатов на ЭАКА, ЭДКА и ЭИКА 188

4. Электроноакцепторный кардинальный адсорбат АТФ — важнейший адсорбат клетки 189
5. Как действуют лекарства и другие кардинальные адсорбаты? 191
6. Почему кардинальные адсорбаты изменяют электронную плотность на всех проксимальных группах однотипно — либо увеличивают ее, либо уменьшают? 192
7. Активный центр фермента контролируется множеством фармакологических «эффекторных» центров 197

Глава 15. **КЛЕТКА В СОСТОЯНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ: ЭЛЕКТРОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ, РОЛЬ АТФ, ЛЕКАРСТВ, ГОРМОНОВ И ДРУГИХ КАРДИНАЛЬНЫХ АДСОРБАТОВ** 201

15.1. Избирательность в распределении веществ между клеткой и средой: кооперативность и регуляция 201
1. Накопление клетками ионов K^+, Na^+ и Mg^{2+} 202
2. Влияние АТФ на растворяющую способность клеточной воды 205
3. Влияние уабаина на относительную селективность адсорбционных центров к ионам щелочных металлов 208
4. Влияние инсулина на распределение D-глюкозы и глицина 216

15.2. Регуляция ионной проницаемости 219
1. Выход ионов Na^+ из интактных мышечных волокон и волокон, обработанных иодуксусной кислотой 219
2. Влияние уабаина на силу связывания ионов щелочных металлов с фиксированными анионными центрами на поверхности клетки 223

15.3. Набухание интактных и поврежденных клеток под влиянием солей 225
1. Набухание клеток в изотоническом растворе KCl 225
2. Набухание клеток в изотоническом растворе NaCl при их повреждении 226

15.4. Истинный активный транспорт через бифациальные эпителиальные слои и другие бифациальные системы 228
1. Активный транспорт ионов Na^+ через кожу лягушки 230
2. Активный транспорт ионов Rb^+ через цитоплазму клеток Nitella 232

15.5. Потенциал покоя 234
1. История вопроса 234
1.1. Мембранные теории потенциала покоя 234
1.1.1. Ионная теория 235
1.1.2. Теория электрогенного насоса 238
1.2. Теории межфазных потенциалов 238
1.2.1. Теория ионного адсорбционного потенциала Баура 239
1.2.2. Теория межфазных потенциалов Бютнера 240
1.2.3. Теории потенциала стеклянного электрода Горовитца и Никольского 240
2. Теория биопотенциалов, возникающих в результате локализованной поверхностной адсорбции (ЛПА) 242
2.1. Еще раз о важности локального устойчивого взаимодействия 243
2.2. Супермодель локализованной поверхностной адсорбции (ЛАП) является закономерным результатом фундаментальных ошибок мембранной теории потенциала 243
2.2.1. Чувствительность клеток и модельных систем к ионам щелочных металлов носит сходный характер 2
2.2.2. Электропотенциалы модельных систем и живых клеток нечувствительны к изменению концентрации Cl^- в омывающем растворе 2
2.2.3. Модельная система и клетка примерно в 150 раз чувствительнее к H^+, чем к K^+ 2
2.2.4. Электропотенциалы модели и клетки нечувствительны к внешней концентрации Mg^{2+} 2
2.3. Первое уравнение потенциала покоя как потенциала локализованной поверхностной адсорбции 2
2.4. Решающий эксперимент Эдельмана 2
2.5. Управление потенциалом покоя 2
2.5.1. Увеличение электронной плотности (величины *c*) на поверхностных β- и γ-карбоксильных группах под влиянием уабаина и других ЭДКА 2
2.5.2. Регуляторное влияние адреналина реализуется посредством снижения величины *c* поверхностных β- и γ-карбоксильных групп 2

15.6. Потенциал действия 2
1. Теория потенциала действия Ходжкина—Хаксли 2
1.1. Постоянный натриевый потенциал в действительности существовать не может 2
1.2. Натриевые каналы в действительности не специфичны к Na^+ 2
2. Теория потенциала действия, основанная на механизме локализованной поверхностной адсорбции (ЛПА) 2
2.1. Идентификация анионных групп, определяющих ионную проницаемость и потенциал покоя, как β- и γ-карбоксильных групп поверхностных белков клетки 2
2.2. Ионная избирательность β- и γ-карбоксильных групп клеточной поверхности способна изменяться от одного иона к другому, а в ионной теории избирательность соответствующих структур неизменна 2
2.3. Анионные группы, опосредующие поступление Na^+ в аксон кальмара при потенциале действия, — это те же самые β- и γ-карбоксильные группы, только с возросшей величиной *c* (возросшей плотностью электронов) 2
2.4. Набухание нервного волокна во время потенциала действия. 2
2.5. Распространяющейся волне изменения селективности поверхностных β- и γ-карбоксильных групп сопутствует деполяризации молекул воды у поверхности клетки 2

Глава 16. **ИТОГИ** 2
16.1. Начало истории 2
16.2. Мембранная теория 2
16.3. Первые физиологи протоплазматического направления 2
16.4. Теория фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ) 2
16.5. Теория многослойной организации поляризованной воды (МОПВ) в клетке 2

4. Электроноакцепторный кардинальный адсорбат АТФ — важнейший адсорбат клетки 189
5. Как действуют лекарства и другие кардинальные адсорбаты? 191
6. Почему кардинальные адсорбаты изменяют электронную плотность на всех проксимальных группах однотипно — либо увеличивают ее, либо уменьшают? 192
7. Активный центр фермента контролируется множеством фармакологических «эффекторных» центров 197

КЛЕТКА В СОСТОЯНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ: ЭЛЕКТРОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ, РОЛЬ АТФ, ЛЕКАРСТВ, ГОРМОНОВ И ДРУГИХ КАРДИНАЛЬНЫХ АДСОРБАТОВ 201

. Избирательность в распределении веществ между клеткой и средой: кооперативность и регуляция 201
1. Накопление клетками ионов K^+, Na^+ и Mg^{2+} 202
2. Влияние АТФ на растворяющую способность клеточной воды 205
3. Влияние уабаина на относительную селективность адсорбционных центров к ионам щелочных металлов 208
4. Влияние инсулина на распределение D-глюкозы и глицина 216

. Регуляция ионной проницаемости 219
1. Выход ионов Na^+ из интактных мышечных волокон и волокон, обработанных иодуксусной кислотой 219
2. Влияние уабаина на силу связывания ионов щелочных металлов с фиксированными анионными центрами на поверхности клетки 223

. Набухание интактных и поврежденных клеток под влиянием солей 225
1. Набухание клеток в изотоническом растворе KCl 225
2. Набухание клеток в изотоническом растворе NaCl при их повреждении 226

. Истинный активный транспорт через бифациальные эпителиальные слои и другие бифациальные системы 228
1. Активный транспорт ионов Na^+ через кожу лягушки 230
2. Активный транспорт ионов Rb^+ через цитоплазму клеток Nitella 232

. Потенциал покоя 234
1. История вопроса 234
1.1. Мембранные теории потенциала покоя 234
1.1.1. Ионная теория 235
1.1.2. Теория электрогенного насоса 238
1.2. Теории межфазных потенциалов 238
1.2.1. Теория ионного адсорбционного потенциала Баура 239
1.2.2. Теория межфазных потенциалов Бютнера 240
1.2.3. Теории потенциала стеклянного электрода Горовитца и Никольского 240
2. Теория биопотенциалов, возникающих в результате локализованной поверхностной адсорбции (ЛПА) 242
2.1. Еще раз о важности локального устойчивого взаимодействия 243
2.2. Супермодель локализованной поверхностной адсорбции (ЛАП) является закономерным результатом фундаментальных ошибок мембранной теории потенциала 243
2.2.1. Чувствительность клеток и модельных систем к ионам щелочных металлов носит сходный характер 244
2.2.2. Электропотенциалы модельных систем и живых клеток нечувствительны к изменению концентрации Cl^- в омывающем растворе 245
2.2.3. Модельная система и клетка примерно в 150 раз чувствительнее к H^+, чем к K^+ 245
2.2.4. Электропотенциалы модели и клетки нечувствительны к внешней концентрации Mg^{2+} 245
2.3. Первое уравнение потенциала покоя как потенциала локализованной поверхностной адсорбции 246
2.4. Решающий эксперимент Эдельмана 247
2.5. Управление потенциалом покоя 247
2.5.1. Увеличение электронной плотности (величины *c*) на поверхностных β- и γ-карбоксильных группах под влиянием уабаина и других ЭДКА 248
2.5.2. Регуляторное влияние адреналина реализуется посредством снижения величины *c* поверхностных β- и γ-карбоксильных групп 250

15.6. Потенциал действия 251
1. Теория потенциала действия Ходжкина—Хаксли 251
1.1. Постоянный натриевый потенциал в действительности существовать не может 252
1.2. Натриевые каналы в действительности не специфичны к Na^+ 252
2. Теория потенциала действия, основанная на механизме локализованной поверхностной адсорбции (ЛПА) 253
2.1. Идентификация анионных групп, определяющих ионную проницаемость и потенциал покоя, как β- и γ-карбоксильных групп поверхностных белков клетки 257
2.2. Ионная избирательность β- и γ-карбоксильных групп клеточной поверхности способна изменяться от одного иона к другому, а в ионной теории избирательность соответствующих структур неизменна 258
2.3. Анионные группы, опосредующие поступление Na^+ в аксон кальмара при потенциале действия, — это те же самые β- и γ-карбоксильные группы, только с возросшей величиной *c* (возросшей плотностью электронов) 258
2.4. Набухание нервного волокна во время потенциала действия. 259
2.5. Распространяющейся волне изменения селективности поверхностных β- и γ-карбоксильных групп сопутствует деполяризации молекул воды у поверхности клетки 260

Глава 16. **ИТОГИ** 261
16.1. Начало истории 261
16.2. Мембранная теория 263
16.3. Первые физиологи протоплазматического направления 264
16.4. Теория фиксированных зарядов Линга (ТФЗЛ) 265
16.5. Теория многослойной организации поляризованной воды (МОПВ) в клетке 267

16.6. Теория ассоциации-индукции 270
1. Живое состояние покоя 270
1.1. Покоящееся живое состояние как состояние метастабильного равновесия 270
1.2. Покоящееся живое состояние как низкоэнтропийное состояние .. 271
1.3. Чем различаются основные компоненты клетки — физическим состоянием или конформацией? 271
1.3.1. Выяснение конформации гемоглобина по распределению ионов K^+ и Na^+ между эритроцитами и средой 272
1.3.2. Определение конформационного состояния миозина в мышечных волокнах лягушки по распределению не электролитов между клеткой и средой 273
1.3.3. Выяснение конформации миозина и актина в мышечных волокнах лягушки по поглощению водяного пара 274
1.4. Ключевая роль АТФ в поддержании протоплазмы в состоянии покоя 275
1.5. Почему в структурированных слоях адсорбированной воды ее молекулы связаны между собой более прочно? 275
2. Протоплазма — глубоко интегрированная система молекулярных взаимодействий 277
2.1. Нативный гемоглобин *in vitro* 277
2.2. Гемоглобин, денатурированный NaOH, *in vitro* 277
2.3. Сократительный белок миозин *in vivo* 278
3. Объяснение четырех фундаментальных физиологических явлений 279
3.1. Распределение веществ между клеткой и средой 279
3.2. Проницаемость 280
3.3. Регуляция объема клетки 282
3.4. Потенциал покоя 283
4. Физиологические явления как обратимые кооперативные переходы, контролируемые индуктивным эффектом 284
4.1. Электронная плотность на функциональных группах белка — пульт управления жизнедеятельностью 285
4.2. Смена избирательности ключевых функциональных групп белка — физиологический смысл индуктивного эффекта 287
4.3. Классификация кардинальных адсорбатов, включая биологически активные вещества 288
4.4. Как клетка поддерживается в состоянии покоя и что происходит при его изменении. Роль кардинальных адсорбатов 288
4.4.1. Поддержание живого состояния при помощи АТФ — электроноакцепторного кардинального адсорбата 288
4.4.2. Модуляция состояния покоя уабаином — электронодонорным кардинальным адсорбатом 290
4.5. Обратимые физиологические явления 295
4.5.1. Истинный активный транспорт 295
4.5.2. Потенциал действия 296
5. Мертвое состояние 297
5.1. Жизнь и смерть протоплазмы 297
5.2. Как протоплазма умирает 298
5.3. Анатомия мертвой протоплазмы 299

16.7. История поиска сущности жизни на клеточном и протоплазматическом уровне 302
ЭПИЛОГ 303
Разгадывание кроссворда или охота на лис: две модели научной работы 303
Секрет успехов прошлого — в радикальной смене направления научного поиска 303
Фрагментация — угроза будущему науки 306
Всеобъемлющая теория, которая могла бы собрать Шалтай-болтая 306
Система образования — ключ к будущему биологии 307
«Предел науки — бесконечность», мысль, которая всегда будет маяком для истинного исследователя 309
Приложение 312
Словарь терминов теории ассоциации-индукции и смежных понятий 317
Список цитированной литературы 344
Именной указатель 360
Об авторе 365
Участники проекта по переводу книги Линга на русский язык 368

Научное издание

Гильберт Линг

ФИЗИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ЖИВОЙ КЛЕТКИ: НЕЗАМЕЧЕННАЯ РЕВОЛЮЦИЯ

Дизайн и макет:
О. Б. Омелина
Технический редактор:
А. Г. Плюскова
Допечатная подготовка:
Л. Г. Иванова, А. Г. Плюскова
Корректоры: С. П. Журавина, В. Л. Талзи

Подписано к печати 31.10.2008. Формат $70\times100^{1}/_{16}$. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 23,5. Уч.-изд. л. 30,31. Тираж 1000 экз. Заказ № 632.

Санкт-Петербургская издательская фирма «Наука» РАН
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 1
E-mail: main@nauka.nw.ru
Internet: www.naukaspb.spb.ru

ISBN 978-5-02-026348-2

Г. Линг ФИЗИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ЖИВОЙ КЛЕТКИ

Г. ЛИНГ



ФИЗИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ЖИВОЙ КЛЕТКИ

НЕЗАМЕЧЕННАЯ РЕВОЛЮЦИЯ

