

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 *аденилтрифосфат*) 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 (макроэнергетическими) фосфатными связями*» и стали обозначаться $\sim P$.

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 АТ-Фаза*. Скоу предположил, что этот и аналогичные ферменты, находящиеся в мембранах, способны высвободить 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 вырабатывать [49; 98, р. 189—212] (табл. 2). На протяжении почти полувека, прошедшего после публикации этих данных, *никто* так и не попытался опровергнуть 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, р. 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)	$\Psi + E_{\text{Na}^+}/F$ 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 °С), замещения кислорода среды чистым азотом, добавлением в среду 1 мМ NaCN и 1 мМ иоацетата натрия. В таких условиях единственным доступным для мышечных волокон источником энергии остаются только запасы АТФ, АДФ и креатинфосфата на момент начала действия ядов [131, р. 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	$n_{ATФ}$	h	ΔH_{obs}	Температура	n_{HCl}^*	h	$\frac{h}{n_{HCl}}$	$\Delta H_{p(ioniz)}$	$\Delta H_{obs} + \Delta H_{p(ioniz)}$
°С	г/ 100 мл	мкмоль	милли- кал	ккал/ моль	°С	мкмоль	милли- кал	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 КСl концентрацией 0,60 М. Общая концентрация ортофосфата составила 0,05 М, рН — 8,00. $n_{ATФ}$ — исходное количество АТФ, подвергшейся полному гидролизу. n_{HCl} — количество HCl в нейтрализованном растворе КСl 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, р. 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

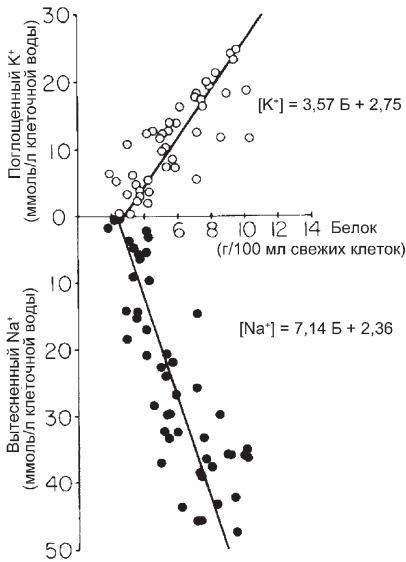


Рис. 33. Аккумуляция K^+ и вытеснение Na^+ тенями эритроцитов, полученными из отмытых эритроцитов человека. Эксперимент строго следовал методике, описанной в работе [471]. В основном использовали свежую кровь от различных доноров. В редких случаях, когда взятие крови проводили повторно, это делали не 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-ATPазы ? 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, р. 224; 107, р. 22—25].

Линг и Негенданк также, между прочим, указывали [138, р. 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 колонку с сефадексом может замедлиться. В результате, внутри пузырьков остается большее количество меченого Na^+ , чем в отсутствие 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 полусинтетических, 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 низкий 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.