

О ВОЗМОЖНОЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ ФАЗОВОГО ПЕРЕХОДА «ЖИДКОЕ–ТВЕРДОЕ» В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

© 2001 г.

Д. П. ХАРАКОЗ

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пущино, Московская обл.*

I. Введение. II. Физиологически важные физико-химические свойства главного фазового перехода. III. Две проблемы эволюции теплокровности. IV. Гипотеза о фазово-переходном механизме синаптического экзоцитоза. V. Эволюционные следствия гипотезы. VI. Физиологические следствия гипотезы. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Современные представления о физиологической роли фазового состояния липидного компонента мембран остаются в значительной мере «протеиноцентрическими». Значение фазового состояния обычно сводится лишь к обеспечению необходимой подвижности и активности мембранных белков, исполняющих важнейшие функции клетки — каталитические, сигнальные и транспортные. Эта упрощенная картина, однако, меняется с появлением данных, свидетельствующих о прямом участии фазовых переходов липидов в жизнедеятельности клетки [14, 47, 48, 79].

Цель настоящей статьи — рассмотреть ряд общих физиологических явлений с позиций высказанной недавно гипотезы о механизме экзоцитоза [12], в которой центральная роль отводится так называемому главному фазовому переходу — переходу между жидким (жидкий кристалл) и твердым (гель) состояниями липидной мембраны.

Принятые обозначения: $ДС_{16}ФХ$ — дипальмитоилфосфатидилхолин; $ДС_{14}ФХ$ — димиристоилфосфатидилхолин; T — температура; T_b — температура тела; T_m — температура главного фазового перехода; $T_{m,0}$ — температура перехода в отсутствие кальция (или анестетика) в среде; δ — ширина зоны фазового перехода на температурной шкале; H — энтальпия; V — объем; P — внешнее давление; C — молярная концентрация. Другие обозначения использованы однократно и описаны в соответствующих местах текста.

Адрес для корреспонденции: e-mail: kharakoz@pbc.itb.serpukhov.su

Гипотеза позволяет сформулировать новые представления о физико-химических причинах эволюционного происхождения теплокровности, может служить основой для построения новой молекулярной теории общей анестезии, а также позволяет сделать вывод о *физико-химической неизбежности* регулярного сна у высших животных.

В статье представлена «липидоцентрическая» точка зрения на механизм выброса нейромедиатора, однако при этом подчеркивается важная роль белков в обеспечении необходимых структурных и кинетических свойств этого механизма. Изложение основных идей предваряется кратким обзором физико-химических характеристик главного фазового перехода, имеющих отношение к пластичности мембран.

По затронутым вопросам опубликовано огромное количество работ, поэтому статья не может претендовать на полноту обзора литературы. Цитируется лишь работы, необходимые для обоснования главных тезисов.

II. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛАВНОГО ФАЗОВОГО ПЕРЕХОДА

ИЗМЕНЕНИЯ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ ПРИ ФАЗОВОМ ПЕРЕХОДЕ

При отвердевании липидной мембраны длинные неполярные хвосты липидных молекул упаковываются в плотную упорядоченную квази-двумерную структуру, подобную двумерному твердому телу. При этом площадь поверхности мембраны сильно сокращается (см. рис. 1) — это свойство является одним из наиболее важных для обсуждения физиологической роли фазового перехода. Из исследований модельных мембран известно, что площадь сокращается на 20—25%. При этом толщина бислоя возрастает почти настолько же, в результате чего объем мембраны уменьшается только на 3—5% [50, 99]. Отвердевание сопровождается падением энтальпии [27, 50]. Если мембрана несет избыточный отрицательный заряд, то жидкое и твердое состояния различаются по способности к взаимодействию с ионами, в частности

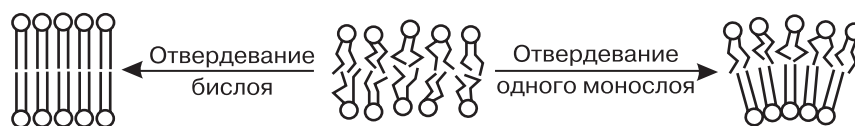


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая изменение площади поверхности при отвердевании и возникновении изгибов, если в твердое состояние переходит только один монослой.

с кальцием [2]. В твердом состоянии поверхностная плотность зарядов выше и потому взаимодействие с кальцием сильнее.

Благодаря изменениям перечисленных экстенсивных свойств состояние мембраны зависит от сопряженных интенсивных свойств. В соответствии с принципом Ле-Шателье отвердевание можно вызвать понижением температуры (потому что при переходе уменьшается энтальпия), увеличением концентрации Ca^{2+} (потому что возрастает сродство к нему), увеличением давления (потому что уменьшается объем), латеральным давлением (потому что сокращается площадь поверхности). Для нашего рассмотрения наиболее важными факторами являются температура, давление, концентрация ионов кальция и некоторых других низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с мембраной.

ТЕМПЕРАТУРА ПЕРЕХОДА

Рассмотрим некоторые структурные и термодинамические факторы, влияющие на температуру главного фазового перехода в липидной мембране, T_m (рис. 2).

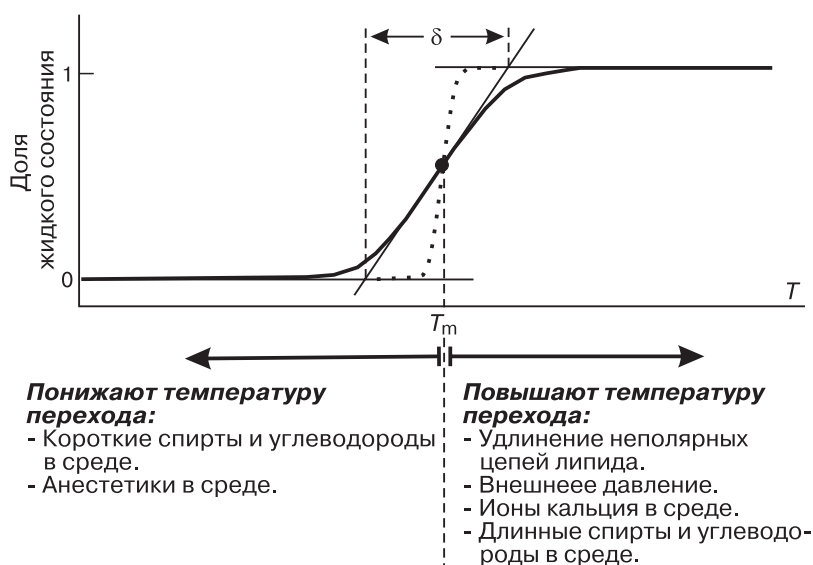


Рис. 2. Температурная зависимость фазового перехода.

T_m — температура перехода, δ — его ширина. Точечной линией показан переход более кооперативный, чем тот, что показан сплошной линией. Внизу перечислены факторы, повышающие и понижающие температуру перехода.

Структура и упаковка липидных молекул

Температура перехода зависит от способности липида к формированию ненапряженной упаковки молекул в мембране. Способ упаковки и ее совершенство (отсутствие дефектов) зависят, в частности, от соотношения размера полярной головки и толщины неполярных хвостов липида [52, 55]. Хорошей иллюстрацией сказанного служит сравнение липидов с фосфатидилхолиновой и с этаноламиновой головками. Структурное различие состоит в том, что фосфатидилхолин содержит более крупную холиновую группу ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$) вместо аминогруппы ($-\text{NH}_3^+$) в этаноламине. Стерические затруднения, возникающие при упаковке фосфатидилхолиновых головок, препятствуют плотной упаковке неполярных цепей липида в твердой фазе. Структура оказывается напряженной и плавится при более низкой температуре, чем в случае фосфоэтанолминовых липидов с той же длиной цепей. Различие составляет от 15 до 30 °С, в зависимости от длины хвостов [23, 27].

Более важным в аспекте рассматриваемых проблем физиологии клетки является тот факт, что T_m сильно зависит от длины неполярной части молекулы липида [23, 27]: *приращение цепей на одну CH_2 группу приводит к возрастанию температуры перехода на 5—10 °С*.

Гидростатическое давление

Согласно уравнению Клапейрона-Клаузиуса $\Delta T_m / \Delta P = T_m \Delta V / \Delta H$, где P — давление, ΔV и ΔH — объемный и энтальпийный эффекты фазового перехода, соответственно. Поскольку при отвердевании объем и энтальпия падают, то с ростом давления твердое состояние стабилизируется и температура перехода повышается. Для мембран разного состава (включая многокомпонентные природные мембраны) величина $\Delta T_m / \Delta P$ варьирует в пределах 0,015—0,030 °С/атм, причем большинство экспериментальных значений концентрируется около 0,022 °С/атм [72]. Таким образом, *в среднем на каждые 45 атм увеличения давления температура главного фазового перехода повышается на 1 °С*.

Важно подчеркнуть, что эта закономерность соблюдается только в случаях, когда давление изменяется без изменения химического состава системы — гидростатическим способом или с использованием малорастворимых газов, которые не обладают анестетическим действием (как гелий). Влияние анестетических веществ на температуру перехода обсуждается ниже в этой главе.

Кальций

Ионы кальция, взаимодействуя с отрицательно заряженной поверхностью, повышают температуру главного фазового перехода. Экспе-

риментально это явление изучено слабо из-за осложнений, связанных с появлением новых фазовых состояний мембраны и с фазовым разделением липидов в среде с высокой концентрацией Ca^{2+} [2, 53]. Из исследований модельных мембран, изготовленных из анионных липидов и их производных, известно, что в области малых концентраций Ca^{2+} (порядка 0,1 мМ) температура перехода растет очень быстро: коэффициент $\Delta T_m / \Delta [\text{Ca}^{2+}]$ может достигать величин 30—100 °С/мМ [1, 2, 7, 53, 68, 75, 101]. В этих модельных системах поверхностная плотность отрицательных зарядов на порядок выше, чем в реальных биологических мембранах. Если ввести поправку, основанную на том, что эффект пропорционален плотности зарядов [103], то для биологических мембран получается, что *сдвиг T_m на 1 °С может быть вызван повышением концентрации Ca^{2+} на 0,1 мМ* (см. также работы [66, 77, 87], где исследовались модели с меньшей плотностью зарядов и получены близкие результаты). В клетках в возбужденном состоянии концентрация кальция может достигать в несколько раз более высоких значений (например, в синаптических окончаниях, куда Ca^{2+} поступает из внешней среды через открытые каналы [49, 69, 76]). Таким образом, *внутриклеточный кальций при определенных условиях может индуцировать отвердевание липидного монослоя, обращенного к цитоплазме.*

Общие анестетики и их аналоги

Низкомолекулярные соединения, взаимодействующие с мембраной, могут сдвигать температуру фазового перехода. Общей термодинамической причиной сдвига является преимущественное взаимодействие этих соединений с твердым или жидким состоянием. Это взаимодействие количественно описывается коэффициентом распределения вещества в системе мембрана/вода. Пусть K_F — коэффициент распределения для мембраны в жидком состоянии и K_S — в твердом состоянии (коэффициенты здесь определяются как отношение мольной доли вещества в липидной фазе к мольной доле в водной фазе). Тогда можно вычислить изменение температуры перехода на единицу концентрации вещества (C) в системе [58, 59]:

$$(dT_m/dC)_{C \rightarrow 0} = A(K_F - K_S) / (1 + K_M X_L), \quad (1)$$

где $A = RT / (55,5 \Delta S)$ (это отрицательная величина; в случае мембраны из ДС₁₆ФХ $A = -0,41$ °С/М); ΔS — молярная энтропия перехода липида из жидкого в твердое состояние; R — универсальная газовая постоянная; X_L — мольная доля липида в водной системе; $K_M = (K_F + K_S) / 2$. Формула показывает, что если вещество преимущественно связывается с жидкой фазой ($K_F > K_S$), то T_m понижается, а если с твердой ($K_F < K_S$), то T_m повышается.

Известно, что подавляющее большинство из изученных веществ, обладающих анестетической активностью, понижают температуру главного фазового перехода в мембранах. Отметим следующий факт, обнаруженный при исследовании гомологического ряда алифатических спиртов — модельных аналогов анестетических веществ [58, 67]. Низшие гомологи связываются в поверхностном слое мембраны, поэтому преимущественное связывание происходит с жидкой фазой, где поверхность увеличена. В результате *низшие гомологи спиртов и углеводородов стабилизируют жидкое состояние — температура плавления мембраны понижается*.

Иная ситуация с высшими гомологами. Эти длинные молекулы внедряются в область неполярных липидных цепей. При этом, в принципе, можно ожидать как повышения, так и понижения температуры перехода, в зависимости от того, в какую фазу эти молекулы легче внедряются. Опыт показывает, что *высшие гомологи стабилизируют твердое состояние — температура фазового перехода растет*. Для наших целей можно принять это как факт, не вникая в молекулярный механизм явления.

Для иллюстрации на рис. 3 представлены эффекты действия спиртов гомологического ряда $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ на мембрану $\text{ДС}_{16}\text{ФХ}$ [58, 96]. Инверсия знака dT_m/dC происходит на уровне додеканола ($n = 12$). В случае мембран, полученных из липида с более короткой неполярной цепью, $\text{ДС}_{14}\text{ФХ}$, инверсия наступает раньше, при $n = 10$ [94]. (Заметим здесь, что высшие спирты, повышающие температуру перехода, не являются анестетиками, в отличие от низших, понижающих ее [58].) Аналогичные результаты получены при исследовании действия насыщенных жирных кислот гомологического ряда [54, 67].

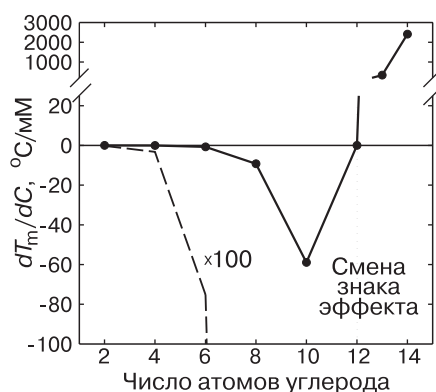


Рис. 3. Влияние спиртов гомологического ряда $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ на температуру фазового перехода в мембране $\text{ДС}_{14}\text{ФХ}$ (по данным из работы [96] для этанола и работы [58] для остальных членов ряда).

Пунктиром показан участок для низших гомологов в 100-кратно увеличенном масштабе.

ШИРИНА ЗОНЫ ПЕРЕХОДА И КООПЕРАТИВНОСТЬ

Ширина переходной зоны δ (см. рис. 2) — другая характеристика фазового перехода, важная для понимания его физиологической роли. Рассмотрим, от чего она зависит.

Процесс фазового перехода кооперативен в том смысле, что состояние данного участка мембраны зависит от состояния соседних участков. Сосуществование участков с разным состоянием термодинамически невыгодно, поэтому в некоторой области, охватывающей множество молекул, фазовое превращение происходит по закону «все-или-ничего». Такая кооперативная связь в мембране простирается на некоторое определенное расстояние, поэтому характерный размер участка (его обычно называют кооперативным доменом), внутри которого выполняется закон «все-или-ничего», ограничен. Из термодинамического уравнения Вант-Гоффа следует, что ширина переходной зоны температур, δ , обратно пропорциональна тепловому эффекту перехода в кооперативном домене. Следовательно, ширина будет тем меньше, чем больше произведение числа молекул в домене (N) на молярный тепловой эффект перехода (ΔH):

$$1/\delta \sim N \times \Delta H. \quad (2)$$

Размер домена, N , служит мерой кооперативности системы. Он связан с вероятностью дефектов упаковки: чем больше дефектов, тем меньше степень кооперативности. В свою очередь, чем выше изгибная подвижность мембраны, тем более вероятны дефекты [84]. И наконец, изгибная подвижность мембраны падает при увеличении толщины мембраны [36] или, что то же самое, при увеличении длины неполярных цепей липида. Из этой цепочки рассуждений следует вывод, чрезвычайно важный для последующего анализа физиологических явлений: *ширина переходной зоны уменьшается с увеличением длины неполярной части молекулы*. Эксперименты на модельных мембранах подтверждают это. На рис. 4 кружочками представлены данные из работы [104], в которой бислойные липидные везикулы исследованы наиболее аккуратно и систематично. Ширина перехода по нелинейному закону падает с увеличением числа С-атомов в неполярных цепях липида. Из рисунка следует еще один важный вывод: *зона фазового перехода в бислойных мембранах может быть очень узкой, шириной менее 0,1 градуса*.

Следует отметить, что для обеспечения высокой кооперативности система должна быть гомогенной по физическим свойствам. Примеси, как правило, приводят к уширению переходной зоны — но не всегда. В принципе, если добавка к основному липиду некоторого определенного количества липида с иной молекулярной формой компенсирует напряжения, возникающие из-за стерических несоответствий при

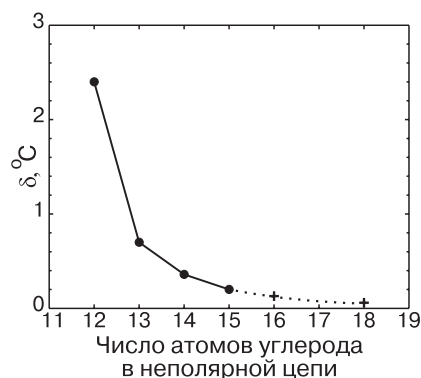


Рис. 4. Зависимость ширины фазового перехода в больших бислоиных везикулах от длины неполярной цепи в ряду насыщенных диацил-фосфатидилхолинов.

Экспериментальные данные, показанные кружочками, взяты из работы [104] и экстраполированы в область более длинных цепей, что показано крестиками.

упаковке основного липида, то кооперативность системы может повышаться. К сожалению, это явление не исследовано экспериментально.

Из термодинамических соображений [59] следует, что *вещества, способные сдвигать температуру фазового перехода, увеличивают ширину фазового перехода*. В частности, так ведут себя соединения, обладающие анестетическим действием.

КИНЕТИКА ФАЗОВОГО ПЕРЕХОДА

Без информации о скорости перехода мембраны в новое фазовое состояние невозможно понять физиологическую роль перехода. Главный фазовый переход в липидных мембранах относится к физическому классу переходов первого рода [21, 62, 63]. Для нас важны кинетические следствия из этого заключения:

— *отвердевание мембраны проходит через стадию формирования зародыша новой фазы критического размера* (это такой размер, по достижении которого новая фаза начинает необратимо распространяться на всю систему);

— *скорость перехода мембраны в твердое состояние определяется двумя факторами: вероятностью появления зародыша в единицу времени и скоростью распространения фронта новой фазы;*

— *оба эти фактора зависят от степени переохлаждения системы — чем сильнее переохлаждение, тем быстрее процесс; поэтому, для обеспечения быстрого перехода система должна быть переохлаждена* (то есть, температура фазового перехода должна оказаться выше температуры среды);

— *время появления зародыша может быть уменьшено до очень малых значений, если в системе есть неоднородность соответствующего (критического) размера, которая служит «затравкой» твердой фазы.*

В мембране роль «затравки» может выполняться специальными белковыми комплексами, в которых структура поверхности, погруженной в мембрану, совместима со структурой твердой липидной фазы. Если размер «затравки» выше критического, то лимитирующим фактором процесса остается только скорость распространения фронта фазы.

Оценка скорости распространения (u) фронта твердой фазы известна в настоящее время только для одного вида липидов — для ДС₁₆ ФХ [63]. Для температур в интервале 0—5 К около точки перехода выполняется линейное соотношение $u = 2 \times |T - T_m|$ мм/с. При переохлаждении на 1 К скорость равна 2 мм/с и, следовательно, *участок мембраны длиной в 200 нм (характерный размер активной зоны в синапсах [8]) охватывается твердым состоянием за 0,1 мс.* Эта оценка используется далее при обсуждении механизма синаптической передачи.

ФАЗОВЫЙ ПЕРЕХОД И ПЛАСТИЧНОСТЬ МЕМБРАН (ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ)

Два универсальных свойства клетки

Одно из универсальных свойств клеток — избыточный отрицательный заряд поверхности мембран, который создается анионными липидами. Это свойство настолько существенно, что катионные липиды и их аналоги небезвредны для клеток [39]. С другой стороны, универсальным регулятором клеточных процессов являются ионы кальция. Поскольку взаимодействие кальция с отрицательно заряженной поверхностью способно вызывать отвердевание мембраны (см. выше), то возникает предположение о возможной глубинной связи между этими двумя универсальными свойствами клеток.

Свидетельства физиологической роли фазового перехода

Существует множество косвенных свидетельств в пользу важной роли фазовых переходов в жизнедеятельности клетки [2, 14, 21, 22, 48, 47, 79]. Большинство из них основаны на том, что наблюдается корреляция между температурой среды, при которой развивается клетка, и температурой главного фазового перехода в липидном компоненте клеточной мембраны. Примечательно, что часто наблюдается следующая закономерность: температура перехода, будучи близкой к температуре клетки, находится несколько ниже ее. Создается впечатление, что клетке необходимо, чтобы твердое состояние мембраны было «под боком», и тогда его можно «достать» локальным повышением концентрации ионов кальция.

Интересное указание на участие фазового перехода в динамическом поведении митохондриальных мембран было получено при исследовании

довании колебательных режимов митохондрий — режимов, при которых осциллируют трансмембранные ионные потоки [13]. Было обнаружено, что осцилляции не наблюдаются при температурах ниже 24 °С и развиваются в полную силу при температурах выше 26 °С. Переходная зона узка и находится около температуры фазового перехода в митохондриальной мембране. Получается, что для возникновения колебательного режима необходимо, чтобы температура перехода была ниже температуры среды. Можно предположить, что в процесс осцилляций вовлечено отвердевание мембраны, индуцированное кальцием.

Фазовый переход и кривизна мембраны

Переход из жидкого состояния в твердое сопровождается значительным сокращением площади поверхности (см. выше). Из этого, в частности, следует, что если в одном монослое индуцируется твердое состояние, а другой остается неизменным, то возникает напряжение, приводящее к изгибной деформации бислоя — он становится вогнутым в сторону отвердевшего монослоя (рис. 1). Такое состояние напряжено, и мембрана со временем может переходить в менее напряженное плоское состояние, если трансмембранные белки не препятствуют скольжению монослоев друг относительно друга. В этом примере формообразующая роль фазового перехода очевидна. Такой механизм формирования изгибов может играть важную роль, например, в формировании промежуточных состояний в процессе слияния мембран [28] (рис. 5), а также в процессах клеточного деления.

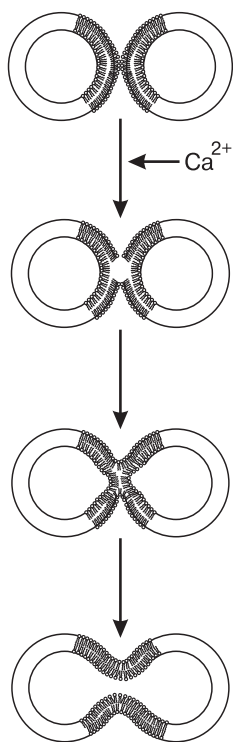


Рис. 5. Разрывы и изгибы монослоев на промежуточных стадиях слияния мембран.

Фазовый переход и разрывы в мембране

В процессе фазового перехода в мембране могут возникать напряжения, приводящие к появлению локальных разрывов и формированию трансмембранных водных пор. Это явление исследовалось экспериментально на плоских липидных бислоях [1]. Интересная ситуация может возникнуть в везикулярной мембране, когда фазовый переход происходит несимметрично. А именно, если твердое состояние индуцируется только во внешнем монослое (напри-

мер, с помощью кальция), то сокращение площади его поверхности может приводить к разрывам. На короткое время оголяются неполярные группы, что должно способствовать слиянию мембран, оказавшихся в этот момент в контактной близости друг с другом (рис. 5). В этом примере, как и в предыдущем, демонстрируется значение фазового перехода для формирования переходных состояний в процессе везикулярного транспорта и экзоцитоза в клетке.

Вероятность слияния мембран и длина неполярных цепей липида

Формирование изгибов сопряжено с работой против упругих сил, препятствующих изменению формы. Чем толще мембрана, тем труднее ее деформировать. Отсюда следует важный качественный вывод: *чем длиннее неполярные цепи липида, тем более затруднено слияние мембран, поскольку изогнутые участки — необходимый элемент формы промежуточного состояния при слиянии.*

III. ДВЕ ПРОБЛЕМЫ ЭВОЛЮЦИИ ТЕПЛОКРОВНОСТИ

На вопрос о биологической целесообразности теплокровности известен тривиальный ответ: чем стабильнее температура, тем точнее контролируются скорости химических и физических процессов. Однако в отношении биохимии и физиологии клетки этот простой ответ создает только кажущуюся ясность. Без ответа остаются следующие вопросы:

1. Точность регулирования температуры тела у теплокровных животных поразительно высока. Особенно чувствителен к изменениям температуры мозг. Например, гипоталамус человека (где находится центральный физиологический «термометр») реагирует на изменение в несколько сотых градуса, вызывая соответствующую компенсаторную реакцию организма [5, 6].

Какой же из физиологических процессов может быть столь чувствителен к температуре? Здесь не случайно упомянута именно чувствительность, а не стабильность, потому что в зависимости от физиологического состояния, например, при переходе от бодрствования ко сну, температура мозга меняется в довольно широких пределах.

2. Пределы индивидуальной вариабельности температуры тела поразительно узки не только среди особей одного вида, но даже у разных видов. У всех теплокровных, за исключением низших млекопитающих, нормальная температура тела находится в пределах 35—42 °С, в то время как температура среды обитания варьирует значительно больше [92]. Такой узкий диапазон физиологических температур еще более удивителен, если принять во внимание огромную разницу в

интенсивности теплообмена со средой между крупными животными (слон, кит) и мелкими (землеройка, колибри), а также между видами наземными и водными. Казалось, что в процессе эволюции теплокровные виды могли более «комфортно» приспособиться к условиям среды обитания: северные виды (особенно морские) поддерживали бы температуру тела $\sim 10^\circ\text{C}$, а виды жарких пустынь $\sim 50^\circ\text{C}$. Однако, вопреки этой логике ведут себя не только теплокровные, но и некоторые представители «холоднокровных» таксонов [51, 92]. Например, голубой тунец в активном состоянии поддерживает стабильную температуру тела около 30°C , слабо зависящую от температуры окружающей воды. Многие рептилии поддерживают температуру тела $\sim 40^\circ\text{C}$ (путем поведенческой терморегуляции). Известно множество поразительных примеров даже среди насекомых. Например, бражник не может взлететь, не разогрев грудные ганглии до $32\text{—}38^\circ\text{C}$ (температурный порог варьирует у разных видов), а грудь шмеля разогревается в полете до 38°C — совсем как у типичных млекопитающих!

Какая же принципиально важная задача эволюции могла быть оптимально решена только в некотором ограниченном интервале температур?

В поисках ответа на эти вопросы следует сразу исключить биохимические реакции, катализируемые ферментами, поскольку их активность сравнительно слабо зависит от температуры [51]. Даже денатурация белков — процесс, наиболее резко зависящий от температуры, — проходит в интервале нескольких градусов [26]. Кроме того, регуляторные механизмы в клетке способны изменять общую активность того или иного фермента более чем на порядок, что значительно превышает возможные температурные эффекты [51].

Структурные переходы в нуклеиновых кислотах происходят более резко, чем в белках. Область плавления однородных доменов двойной спирали ДНК может быть узкой — в пределах одного градуса [26]. Поэтому плавление ДНК, в принципе, нельзя исключить из числа процессов, которые могли бы потребовать высокой термостабильности. Однако при физиологических ионных условиях ДНК плавится выше 50°C , поэтому состояние этих молекул слабо зависит от температуры при температуре тела теплокровных животных. Следовательно, как ферменты, так и нуклеиновые кислоты могут быть исключены из рассмотрения.

Среди известных молекулярных процессов только главный фазовый переход липидной мембраны характеризуется резкой температурной зависимостью состояния и сопряженных с ним физических свойств системы. Ширина области перехода может составлять одну десятую долю градуса и меньше (гл. II). Поэтому можно предположить, что *мембранный фазовый переход — наиболее вероятный канди-*

дат на роль ключевого процесса, определившего эволюцию терморегуляции животных.

Приведем два аргумента в пользу того, что этот молекулярный процесс играет особо важную роль именно *в тканях мозга*. Аргумент эволюционный: теплокровные виды — высший этап эволюционного развития животных, сопряженный с мощным развитием мозга. Аргумент физиологический: именно стабилизация температуры мозга является приоритетной задачей тепловых адаптационных механизмов у позвоночных животных [51, 92].

Исследуя физико-химические факторы биологической эволюции и, в частности, причины происхождения теплокровности, С.Э.Шноль около двадцати лет назад пришел к заключению, что фазовый переход липидных мембран имеет важное значение для возбудимости нервных тканей и, возможно, участвует в проведении импульса по аксону [14]. Весь опыт исследований возбудимости клетки показывает, что проведение потенциалов действия хорошо описывается и без предположения о фазовом переходе. Однако в своей общей формулировке, относящейся к возбудимости нервной ткани в целом, эта идея остается привлекательной.

Ниже изложена гипотеза об участии фазового перехода *в механизме синаптического экзоцитоза*. Ее первоначальная версия была сформулирована ранее [12].

IV. ГИПОТЕЗА О ФАЗОВО-ПЕРЕХОДНОМ МЕХАНИЗМЕ СИНАПТИЧЕСКОГО ЭКЗОЦИТОЗА

Регулируемый экзоцитоз в синапсе — сложный и высокоорганизованный процесс, основные стадии которого хорошо изучены [15, 17, 18, 38, 56, 60, 61, 102]. Особенно большой прогресс достигнут в последние годы в исследовании белкового аппарата, обслуживающего экзоцитоз. Следует обратить внимание на последние стадии, когда синаптическая везикула, нагруженная нейромедиатором, находится в непосредственном контакте с цитоплазматической пресинаптической мембраной в так называемой *активной зоне* и ожидает кальциевого сигнала для выброса содержимого во внеклеточное пространство. Вокруг активной зоны сосредоточены сотни везикул, составляющих запасной пул для замещения израсходованных везикул. В самой активной зоне несколько десятков везикул состыкованы с цитоплазматической мембраной. Из них около десятка полностью подготовлены к акту экзоцитоза и ожидают кальциевый сигнал. При этом предполагается, что внешний монослой подготовленной везикулы уже слит с цитозольным монослоем пресинаптической мембраны и содержимое

везикулы отделено от внешней среды бислойным участком в месте стыковки (рис. 6). Белки и белковые комплексы выполняют множество функций, важных для совершения акта экзоцитоза. Некоторые выполняют якорную функцию — они фиксируют положение везикулы на цитоплазматической мембране в активной зоне. Фузогенные белки, способствуют слиянию мембран и, возможно, формируют фузионную пору, через которую нейромедиатор может диффундировать во внешнее пространство. Они активируются ионами кальция, проникающими из внеклеточной среды сквозь кальциевые каналы, которые открываются при деполяризации пресинаптической мембраны. Белки аппарата слияния (кроме синаптотагмина I [37]) характеризуются высоким сродством к кальцию — он связывается при концентрациях от единиц до десятков мкМ. В то же время пиковая концентрация кальция в активной зоне на порядок выше, и тогда он может эффективно связываться с кислыми липидами. Длительность пика высокой концентрации — порядка 1 мс.

С учетом этих данных сформулируем гипотезу о фазово-переходном механизме выброса нейромедиатора.

Индукцированное ионами кальция отвердевание липидной мембраны играет ключевую роль в механизме выброса нейромедиатора в быстрых химических синапсах.

Попытаемся представить возможный молекулярный механизм, включающий фазовый переход.

На рис. 6 представлена схема, описывающая последнюю стадию синаптического экзоцитоза — стадию Ca^{2+} -индуцированного слияния везикулярной и цитоплазматической мембран с выбросом содержимого в синаптическую щель. В основных чертах эта схема совпадает с общепринятой (см., например, [17, 102]), за исключением только одной модификации — последний шаг процесса включает фазовый переход мембраны как движущую силу выброса нейромедиатора ($B \rightarrow G$). Предполагается, что липидный состав цитоплазматической мембраны в активной зоне удовлетворяет двум условиям: (1) при низкой концентрации кальция, характерной для цитозоля, температура фазового перехода находится ниже температуры клетки, и, следовательно, монослой, обращенный к цитозолю, находится в жидком состоянии; (2) при повышении концентрации кальция в физиологически допустимых пределах температура фазового перехода оказывается выше температуры клетки, и монослой может перейти в твердое состояние. Исходя из этого, можно представить следующую последовательность событий на стадии выброса нейромедиатора:

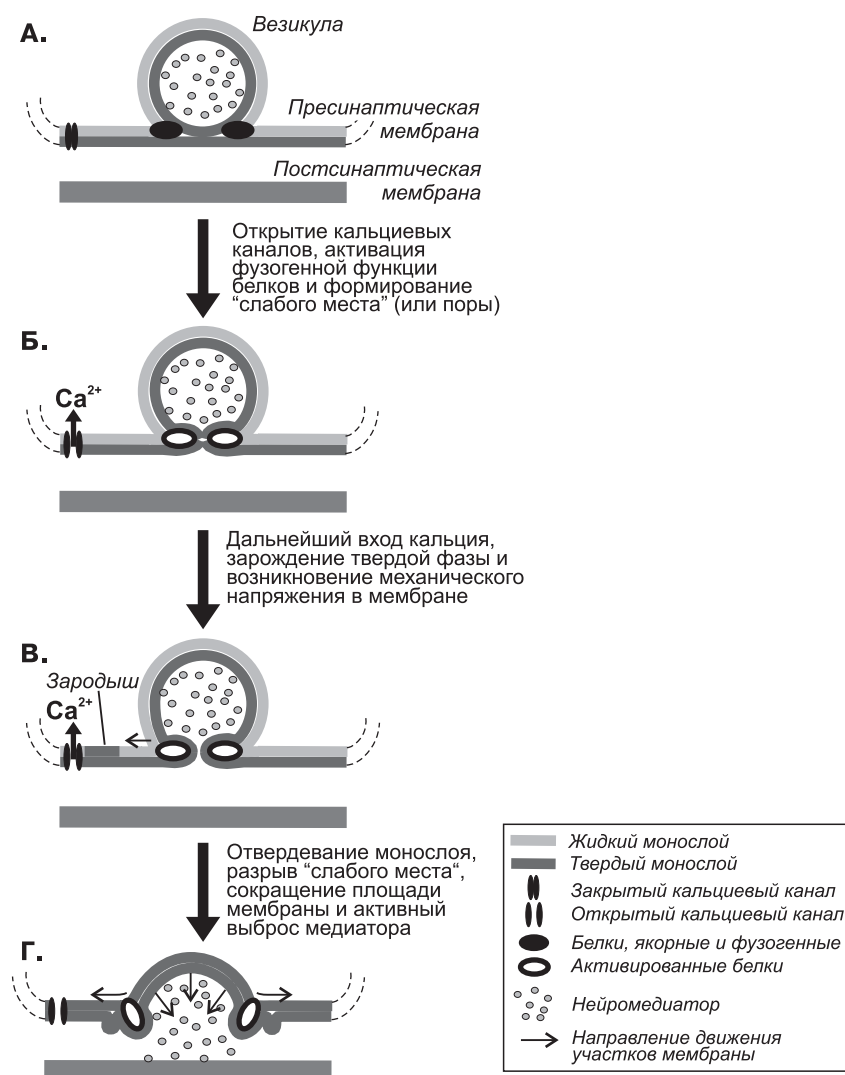


Рис. 6. Ca^{2+} -индуцированное слияние везикулы и выброса нейромедиатора.

Описание в тексте (схема совпадает с общепринятой, за исключением последнего шага, который, согласно гипотезе, происходит с участием фазового перехода как движущей силы выброса нейромедиатора: стадия В → Г). Якорная функция белков особенно важна на последней стадии, когда необходимо передать разрывающее усилие с внутреннего монослоя на внешний

А. В отсутствие возбуждения монослой, обращенный к цитозолю, находится в жидком состоянии. Это относится к цитоплазматической мембране активной зоны и, возможно, к мембране синаптических везикул. Фузогенные белки находятся в области контакта везикулы с цитоплазматической мембраной. Там же находятся и якорные белки, скрепляющие монослой в контактной области (рис. 6А).

Б. В ответ на пришедший потенциал действия открываются кальциевые каналы, и Ca^{2+} начинает поступать из внешней среды (рис. 6Б). Его концентрация вначале достигает уровня, достаточного для связывания с фузогенными белками. Белки принимают конформацию, способствующую слиянию мембран. Тем самым в месте контакта везикулярной мембраны с цитоплазматической формируется «слабое место», готовое разорваться в ответ на механическое напряжение. Возможно, что уже на этой стадии формируется пора, через которую может начаться *медленный* диффузионный выход нейромедиатора в синаптическую щель.

В. Кальций продолжает входить в клетку. Его взаимодействие с отрицательно заряженной поверхностью мембраны ведет к повышению температуры фазового перехода, T_m (см. рис. 7 и гл. II). При некоторой концентрации (назовем ее критической, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{crit}}$) T_m сравнивается с температурой клетки T_b . При дальнейшем росте $[\text{Ca}^{2+}]$ жидкая мембрана оказывается в метастабильном переохлажденном состоянии, когда температура системы находится ниже точки отвердевания. По мере увеличения глубины переохлаждения ($T_m - T_b$) резко повышается вероятность возникновения зародыша твердой фазы. При некоторой концентрации кальция (назовем ее действующей, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{eff}}$) глубина переохлаждения становится достаточно высокой, чтобы у зародыша появился шанс сформироваться за время кальциевого импульса (рис. 6В).

Г. С появлением зародыша начинается процесс перехода монослоя в твердое состояние, и площадь его поверхности сокращается. Возникает натяжение, которое через якорные белки передается противоположному монослою. Мембрана рвется в области контакта с везикулой в «слабом месте», подготовленном фузогенными белками (см. рис. 6Г). Твердое состояние продолжает распространяться по мембране, все больше и больше сокращая ее площадь, и содержимое везикулы оказывается выброшенным наружу — за короткое время, $\sim 0,1$ мс (см. гл. II).

По существу неважно, происходит ли фазовый переход только в цитоплазматической мембране или охватывает также мембрану везикулы, как это предполагалось в первоначальной версии гипотезы [12]. Из исследований молекулярного состава синаптических везикул [38] известно, что они содержат много холестерина (в мольном отно-

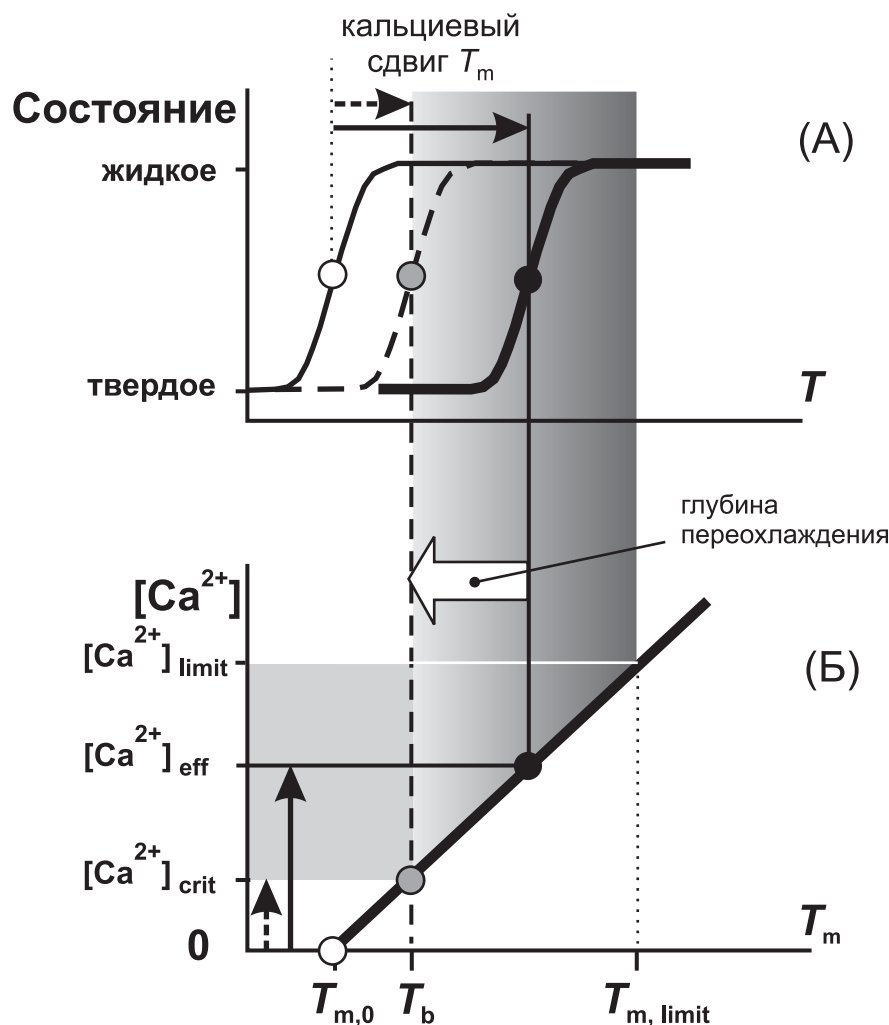


Рис. 7. Схема предполагаемой связи между концентрацией кальция и фазовым состоянием мембраны в активной зоне синапса.

В верхней части рисунка (А) представлены кривые плавления, а на сопряженной нижней части (Б) — зависимость температуры плавления от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . По достижении $[Ca^{2+}]_{crit}$ температура фазового перехода (T_m) сравнивается с температурой тела (T_b). При дальнейшем нарастании до действующей $[Ca^{2+}]_{eff}$ достигается необходимая глубина переохлаждения, при которой вероятность формирования зародыша твердой фазы достаточно высока, чтобы реализоваться в течение кальциевого импульса. Серым цветом выделена область переохлажденных состояний: чем плотнее серый тон, тем выше вероятность формирования зародыша. Она ограничена сверху предельной температурой фазового перехода ($T_{m,limit}$), которая соответствует максимально возможной локальной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_{limit}$).

шении 1 : 2 к фосфолипидам). При таком высоком содержании холестерина существование главного фазового перехода маловероятно [24, 78, 98]. С другой стороны, при связывании Ca^{2+} с заряженной поверхностью должна возникать стягивающая сила, которая в случае плоской мембраны привела бы к появлению вогнутости со стороны связывающей поверхности. В модельных мембранах эта сила приводит к формированию неламеллярных инвертированных структур, что способствует слиянию мембран [28, 34]. В случае везикулярной мембраны стягивающая сила на внешней поверхности вызывает стремление мембраны выпрямиться, что может служить дополнительным фактором, ускоряющим выталкивание содержимого синаптической везикулы сквозь разрыв в месте слияния с цитоплазматической мембраной.

СИНАПТИЧЕСКАЯ ЗАДЕРЖКА

Главное кинетическое преимущество фазово-переходного механизма состоит в том, что обеспечивается максимальная скорость выброса нейромедиатора, поскольку медленная диффузия сквозь фузионную пору заменяется на быстрый гидродинамический поток содержимого синаптической везикулы в направлении к рецепторам постсинаптической мембраны. Рассмотрим основные факторы, определяющие синаптическую задержку — время от момента прихода потенциала действия к синапсу до начала развития возбуждения постсинаптической мембраны.

Время нарастания концентрации кальция до $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{eff}}$ — действующей концентрации, при которой может начаться фазовый переход. Это время зависит от скорости входящего потока ионов и от величины $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{eff}}$ (рис. 7). В свою очередь, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{eff}}$ определяется двумя факторами: чувствительностью T_m к кальцию (наклон прямой на рис. 7Б) и разностью между температурой тела, T_b , и температурой перехода в бескальциевой среде, $T_{m,0}$ (рис. 7А). Из этого следует несколько важных качественных выводов.

Чем ближе $T_{m,0}$ к T_b , тем ниже $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{crit}}$ и $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{eff}}$ и тем короче задержка. Однако разница должна быть не меньше ширины зоны фазового перехода (d), иначе из-за флуктуаций будет происходить спонтанный запуск отвердевания мембраны, и клетка потеряет контроль над процессом. Следовательно, для сокращения времени ожидания $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{eff}}$ необходимо:

- *повышать степень кооперативности фазового перехода (и тогда разность $T_b - T_{m,0}$ может быть уменьшена);*
- *увеличивать чувствительность T_m к кальцию;*
- *увеличивать скорость нарастания концентрации кальция.*

Эти требования могли быть важными факторами естественного отбора в процессе биологической эволюции.

Время появления зародыша твердой фазы. Твердая фаза начинает распространяться в системе только после того, как сформировался зародыш критического размера. Он должен успеть сформироваться до падения локальной концентрации кальция ниже $[Ca^{2+}]_{crit}$. В чистой гомогенной липидной системе время ожидания может составлять секунды и даже сутки, в зависимости от того, насколько температура тела оказалась ниже температуры фазового перехода [11, 62]. Эта задержка может быть значительно уменьшена путем введения белковой «затравки» новой фазы (см. гл. II). Можно предположить, что в состав синаптического аппарата входят такие затравочные белковые комплексы. Их возникновение также могло быть результатом эволюционного отбора.

Время сокращения мембраны в результате фазового перехода определяется скоростью распространения твердой фазы вдоль мембраны. Как обсуждалось в гл. II, время распространения твердого состояния на активную зону синапса и, следовательно, время выброса медиатора может быть порядка десятой доли миллисекунды. Эта величина сопоставима с временами синаптической задержки [97].

Связь перечисленных факторов с эволюцией теплокровности будет обсуждаться ниже. Остановимся кратко на некоторых экспериментальных данных по кинетике синаптического экзоцитоза, свидетельствующих в пользу фазово-переходного механизма.

СОПОСТАВЛЕНИЕ МОДЕЛИ С ЭКСПЕРИМЕНТОМ

Быстрый и медленный экзоцитоз

Существуют две фазы выброса содержимого везикул, медленная и быстрая [17, 18, 45, 49]. Медленная запускается малыми концентрациями Ca^{2+} (десятки мкМ), которые характерны для связывания кальция с белками. Быстрая индуцируется на порядок большими концентрациями, которые характерны для взаимодействия кальция с кислыми фосфолипидами. Это различие находит естественное объяснение в рамках фазово-переходного механизма. Медленный выброс осуществляется путем диффузии через пору, сформированную фузогенными белками. Быстрый осуществляется посредством фазового перехода мембраны, для которого необходимо взаимодействие кальция с кислыми липидами.

Кооперативность кальциевой индукции экзоцитоза

Кривая зависимости частоты актов экзоцитоза от $[Ca^{2+}]$ имеет сигмоидную форму, что свидетельствует о кооперативном характере

кальциевой стимуляции актов экзоцитоза [33, 45] Эту особенность объясняют тем, что для выброса содержимого везикулы требуется одновременное связывание нескольких ионов кальция с белковым аппаратом механизма слияния. В рамках фазово-переходного механизма кооперативный характер объясняется иным способом. Из рис. 7 видно, что низкие концентрации кальция не способны вызвать отвердевание. Процесс может начаться только по достижении критической концентрации. Таким образом, сигмоидная форма кривой зависимости экзоцитоза от концентрации кальция является отражением формы кривой фазового перехода.

*Вероятностный характер и латеральное ингибирование
индуцированного экзоцитоза в активной зоне*

Известны две кинетические особенности экзоцитоза, которые трудно поддаются объяснению [46]. Несмотря на то, что в активной зоне находится около десятка везикул, готовых к акту слияния, далеко не каждый пришедший импульс вызывает выброс нейромедиатора — свидетельство спонтанного характера индуцированного экзоцитоза. Но если акт экзоцитоза свершается, то в нем участвует *только одна везикула и никогда больше одной*. Это свидетельствует о существовании латерального ингибирования в активной зоне — факт слияния одной везикулы мгновенно становится «известен» остальным (т.е. сигнал передается латерально, вдоль мембраны). Возникает вопрос — как передается сигнал ингибирования на расстояние 200 мкм за время $\sim 0,1$ мс?

Обе особенности можно объяснить с позиций фазово-переходного механизма. Спонтанность является прямым следствием случайности формирования зародыша твердой фазы. Если в течение промежутка времени, пока концентрация кальция превышает значение $[Ca^{++}]_{crit}$ (рис. 7), зародыш не сформировался, то акт экзоцитоза не состоится; если сформировался и необратимо распространяется по активной зоне, то в мембране нарастает механическое напряжение до момента первого разрыва и слияния первой везикулы. В цитоплазматическую мембрану вливается дополнительный материал везикулярной мембраны, в результате чего напряжение мгновенно падает и больше ни одного разрыва не может возникнуть в данной активной зоне.

V. ЭВОЛЮЦИОННЫЕ СЛЕДСТВИЯ ГИПОТЕЗЫ

Наиболее важные эволюционные следствия вытекают из рассмотренной выше *необходимости поддерживать высокую кооперативность фазового перехода* для обеспечения короткой синаптической задержки.

ОСОБЫЙ ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ДОМЕНОВ

Необходимость высокой кооперативности фазового перехода и его чувствительности к кальцию выдвигает особые требования к липидному составу тех доменов синаптического аппарата, в которых осуществляется переход. Это может быть либо однокомпонентный анионный липид, либо смесь липидов со строго определенным стехиометрическим соотношением компонентов, удовлетворяющим требованию хорошей совместной упаковки в мембране. Надо принять во внимание, что в синапсе происходит непрерывная рециркуляция мембранного материала — цитоплазматическая мембрана постоянно смешивается с везикулами, которые затем возвращаются в цитоплазму, там сливаются с другими органеллами и вновь транспортируются к активным зонам для повторного использования. Это неизбежно приводит к нарушению липидного состава доменов. Для поддержания необходимого состава *должен быть выработан механизм контроля и очистки* мембран активных зон. В гл. VI будет обсуждаться вопрос о возможной роли сна в осуществлении этой функции.

СУЩЕСТВОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО ОПТИМУМА

Как обсуждалось в гл. II, кооперативность фазового перехода повышается с увеличением длины неполярных цепей липида. Следовательно, естественный отбор должен вести к их удлинению, что неизбежно приводит к повышению температуры плавления мембраны. Тогда становится ясно, чем определяется нижняя граница диапазона температур тела у теплокровных.

С другой стороны, длина цепей не может увеличиваться беспречно, потому что возникают иные кинетические затруднения — понижается изгибная подвижность мембран, что затрудняет их слияние и, следовательно, ведет к падению эффективности механизма выброса нейромедиатора. Отсюда ясно, почему диапазон температур ограничен сверху.

По-видимому, оптимальное решение, удовлетворяющее этим противоположным требованиям к длине неполярных цепей, как раз и соответствует узкой области температур фазового перехода около 40 °С. Потери, связанные с необходимостью дополнительных затрат энергии на поддержание этой температуры тела независимо от условий среды, перекрываются теми преимуществами, которые получены за счет сокращения синаптической задержки и, следовательно, повышения скорости обработки информации, поступающей в мозг, и быстроты реакции животного.

ВЫСОКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА

Происхождение этого результата биологической эволюции очевидно. Малую разницу между $T_{m,0}$ и T_b можно поддерживать без потери контроля над процессом только при условии, что случайные отклонения температуры тела не превышают величину того же порядка, что и ширина фазового перехода. Здесь речь идет именно о случайных отклонениях температуры — неслучайные, физиологически контролируемые отклонения могут быть и более значительными — например, повышение температуры при воспалительных процессах или понижение ее при переходе от бодрствования ко сну (см. ниже).

VI. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СЛЕДСТВИЯ ГИПОТЕЗЫ

ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИДРОСТАТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ

С ростом давления температура фазового перехода в мембранах повышается. В соответствии с гипотезой следует ожидать, что животное при высоком давлении будет испытывать «дискомфорт», который вызовет реакцию, направленную на повышение температуры тела. Это соображение подтверждается в экспериментах по поведенческой терморегуляции рачков-бокоплавов [64]. Из рис. 8 видно, что предпочтительная температура среды этих животных действительно растет при увеличении давления со средним наклоном $\Delta T/\Delta P = 0,045$ °C/атм, близким к диапазону величин, полученных в модельных исследованиях ($\Delta T_m/\Delta P = 0,015$ — $0,03$ °C/атм; гл. II).

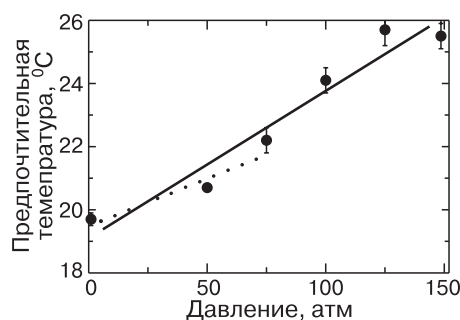


Рис. 8. Предпочтительная температура среды рачков-бокоплавов (*Parhyale hawaiiensis*) как функция гидростатического давления [64].

Средний наклон по всем точкам — около $0,045$ °C/атм (сплошная линия); начальный наклон — $0,02$ — $0,03$ °C/атм (точечная линия).

ГИПОТЕРМИЯ И ОБЩАЯ АНЕСТЕЗИЯ

Анестетики понижают температуру фазового перехода в модельных мембранах. Следует ожидать, что анестетик так же действует на

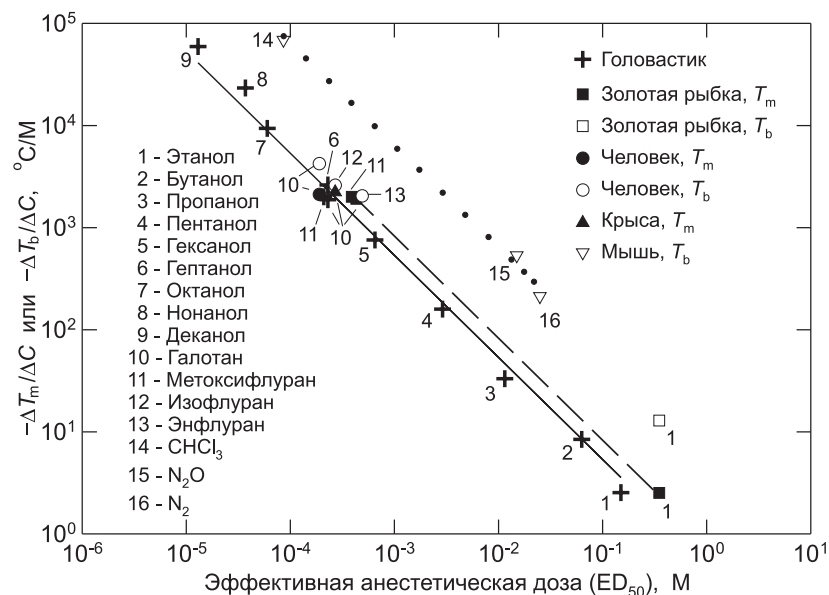


Рис. 9. Корреляция анестетической эффективности веществ с их способностью понижать температуру фазового перехода в модельных мембранах ($\Delta T_m/\Delta C$; крестики и зачерненные символы) и с их гипотермическим действием на животных ($\Delta T_b/\Delta C$; пустые символы). Прямые линии проведены по закону $ED_{50} \times \Delta T/\Delta C = a$ при следующих значениях a : $-0,53^\circ\text{C}$ (сплошная линия), $-0,83^\circ\text{C}$ (пунктирная линия), $-6,4^\circ\text{C}$ (точечная линия). Обсуждение в тексте.

Источники данных по анестетическим дозам: [16, 29, 40, 65, 80, 85, 91]; по гипотермическому действию на животных: [20, 30, 31, 41, 70, 71, 73, 82, 85, 87, 89, 90, 93, 95]; по влиянию на температуру фазового перехода в модельных мембранах: [43, 57, 96]; по растворимости газов в воде: [4, 10, 40].

фазовый переход в синапсах, и тогда температура тела животного тоже будет понижаться. И действительно, анестетическая гипотермия — хорошо известный факт. Проанализируем количественную корреляцию между действием анестетиков на температуру фазового перехода в простых модельных мембранах и их гипотермическим и анестетическим действием на животных.

На рис. 9 на оси абсцисс отложены величины эффективной анестетической дозы веществ, ED_{50} (доза, вызывающая анестезию у 50% животных). На оси ординат — способность этих же веществ понижать температуру фазового перехода в модельных липидных мембранах, $-\Delta T_m/\Delta C$, а также гипотермическое действие на животных, $-\Delta T_b/\Delta C$. Здесь C — молярная концентрация в теле животного или в воде; T_b — температура тела животного, измеряемая либо в мозге, либо в кишеч-

нике, либо в водной среде (для водных животных). Наблюдается очень хорошая корреляция между анестетическим потенциалом вещества и понижением T_m в модельной мембране. Несмотря на то, что эффективность анестетиков различается на пять порядков, одна анестетическая доза любого из веществ приводит к понижению T_m на 0,4–0,8 °С. Для головастика, крысы и человека ΔT_m равняется в среднем –0,5 °С на одну ED_{50} (сплошная линия на рис. 9). Для золотой рыбки анестетические дозы выше, и поэтому $\Delta T_m = -0,8$ °С на одну ED_{50} .

С точки зрения рассматриваемой гипотезы было бы более интересным сравнение анестетических доз с гипотермической эффективностью веществ, потому что, в принципе, липидные домены в синапсах могут сильно отличаться от простых модельных систем по своей чувствительности к анестетику. Наиболее подходящим объектом для такого рода анализа являются мелкие водные животные, температура тела и мозга которых практически равны температуре среды и поэтому легко контролируется в эксперименте. Анестетическая доза этанола для золотой рыбки равна 0,35 М [85]. С учетом гипотермической эффективности этанола (–13 °С/М; [85]) получаем $\Delta T_b = -3,7$ °С на одну ED_{50} . Эту величину можно принять за оценку *критического понижения температуры фазового перехода в синаптической мембране, необходимого для достижения анестетического состояния*. Смысл этой величины можно понять из рис. 7: это такое понижение температуры фазового перехода в синапсах, при котором кальций даже при максимально возможной концентрации не способен вызвать отвердевание жидкой мембраны, и фазово-переходный механизм оказывается «выключенным».

К сожалению, для теплокровных животных подобную оценку сделать не удастся прежде всего потому, что анестетик понижает одновременно и температуру фазового перехода в быстрых синапсах, и температуру тела животного. Эти два эффекта компенсируют друг друга, и результаты трудно интерпретировать. Кроме того почти нет работ, в которых измерения анестетической гипотермии проводились бы в мозге, а не в кишечнике. Различие температур в этих органах может быть значительным [19]; вероятно, именно по этой причине гипотермический эффект на мышцах, измеренный в кишечнике, в 8 раз превышает эффект, полученный для мозга человека (см. рис. 9).

РЕВЕРСИЯ АНЕСТЕЗИИ ВЫСОКИМ ДАВЛЕНИЕМ

Из гипотезы следует, что действие анестетика должно ослабляться повышением давления, поскольку эти два фактора влияют противоположным образом на температуру фазового перехода в доменах синаптической мембраны. И действительно, феномен реверсии анестезии

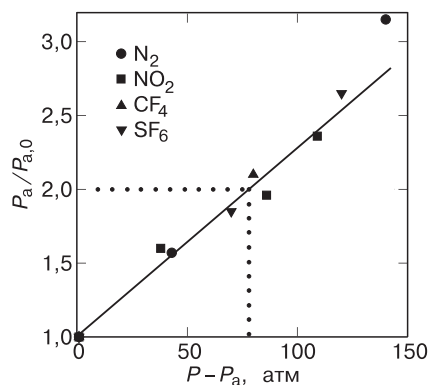


Рис. 10. Зависимость относительной анестетической дозы газов-анестетиков для тритона от избыточного давления, создаваемого гелием.

$P_{a,0}$ и P_a — анестезирующее парциальное давление газов в отсутствие и в присутствии гелия, соответственно; P — общее давление. Таким образом, на оси ординат — парциальное давление неанестетического гелия. Точечная линия показывает, что при повышении избыточного давления на 75 атм анестетическая доза возрастает на величину, равную исходной дозе. Рисунок построен по данным из работы [81].

давлением известен давно и хорошо исследован [32, 100]. На рис. 10 представлены зависимость эффективной дозы газов-анестетиков для тритона от избыточного давления, создаваемого гелием, который, как считают, не обладает анестетическим действием или оно пренебрежимо мало. Ордината представлена в относительных единицах. Возрастание избыточного давления на каждые 75 атм приводит к необходимости увеличивать дозу анестетика на величину, равную исходной дозе $P_{a,0}$, чтобы добиться того же анестетического эффекта. Этот результат позволяет сделать еще одну, независимую оценку критического анестетического сдвига температуры фазового перехода в синапсе. Давление в 75 атм вызывает повышение температуры фазового перехода в мембранах на 1,1–2,2 °C (если принять коэффициент $\Delta T_m/\Delta P = 0,015\text{--}0,030$ °C/атм, полученный на модельных системах) или на 3,4 °C (если принять величину $\Delta T/\Delta P = 0,045$ °C/атм, полученную в опытах по поведенческой терморегуляции рачков-бокоплавов — рис. 8). В рамках фазово-переходной модели синаптического экзоцитоза это означает, что у тритона, анестезированного одной минимальной дозой в отсутствие избыточного давления, температура фазового перехода активных мембран синапса понижена на величину от 1,1 до 3,4 °C. Давление же в 75 атм вернуло T_m на исходный уровень и теперь для достижения анестетического эффекта необходима одна дополнительная доза. Оценка 1,1–3,4 °C близка к величине 3,7 °C, полученной из данных по гипотермии у золотой рыбки. Это может рассматривать как еще один косвенный аргумент в пользу гипотезы о фазово-переходном механизме синаптической передачи.

Реверсии анестезии давлением наблюдается и у теплокровных животных [32]. Однако ее количественная интерпретация осложнена по указанной выше — давление действует не только на температуру фазового перехода в синапсах, но и на температуру тела. Поэтому многочисленные данные по теплокровным здесь не обсуждаются.

ТЕМПЕРАТУРА МОЗГА И ВОССТАНОВИТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ СНА

Суточная периодичность активности, аналогичная циклу бодрствование—сон, характерна для всех животных. Но *почему именно теплокровные животные характеризуются наиболее радикальной потерей поведенческой активности в состоянии сна?* [74]

Другой вопрос из области физиологии сна состоит в следующем. Одна из важнейших функций сна — восстановительная. Считается, что клеткам мозга необходимо либо освободиться от вредных продуктов метаболизма, накопившихся во время активного состояния, либо восстановить иссякшие источники энергии [44, 105]. Однако, возникает вопрос: *почему очистка от «шлаков» или пополнение запасов энергии несовместимы с функциональной активностью?*

И еще один вопрос. Как обсуждалось выше, ткани мозга наиболее чувствительны к температуре: в состоянии покоя стабильность температуры порядка одной десятой доли градуса, а чувствительность к ее изменениям еще выше (см. гл. III). *Почему же в период спокойного сна температура мозга понижается на порядок сильнее — на 0,5–3,5°C?* [9, 25, 42, 88]

Гипотеза о фазово-переходном механизме экзоцитоза в быстрых синапсах позволяет по-новому взглянуть на физиологическую роль сна и ответить на эти вопросы.

При обсуждении эволюционных следствий гипотезы (гл. V) было сделано заключение, что для функционирования быстрых синапсов необходим уникальный липидный состав кооперативных доменов активной зоны и механизм регулярного восстановления этого состава. Известно, как клетка восстанавливает пул белков — отработавшие молекулы уничтожаются и заменяются новыми, синтезированными в точном соответствии с генетическим кодом. Для восстановления (сборки) липидных доменов со строго определенным составом компонентов не существует такого специфического механизма. В то же время известен метод перекристаллизации — простой неспецифический способ очистки веществ. Можно предположить, что именно он используется для восстановления липидных доменов. Но для этого необходимо понижать температуру тела, что и происходит во время сна! Температура мозга падает, причем циклы понижения и повышения происходят несколько раз в соответствии с чередованием фаз спокой-

ного и парадоксального сна [88, 106] — точно так, как это делал бы экспериментатор, проводя многократную перекристаллизацию, если надо получить препарат высокой очистки. Поскольку для запуска процесса «перекристаллизации» температура должна оказаться ниже точки отвердевания липида, то фазово-переходный механизм выброса нейромедиатора выключается — он не может работать, если мембрана всегда находится в твердом состоянии вне зависимости от концентрации Ca^{2+} . Если эти соображения верны, то получается, что *восстановление липидных доменов несовместимо с активным состоянием быстрых синапсов*.

Одной из физико-химических предпосылок для предположения о «перекристаллизации» служит исследование, проведенное на модельных мембранах смешанного состава [35]. Было показано, что в охлажденной мембране могут формироваться липидные домены, характеризующиеся высокой кооперативностью фазового перехода.

Интересно отметить, что в опытах на крысах показано сильное понижение температуры, на 2—3,5 °C, в гиппокампе [25] — важнейшем органе, отвечающем за функцию внимания при обучении и за первичную обработку поступающей в мозг информации [3, 83].

Таким образом можно предположить, что *регулярный сон у высших животных — это эволюционно выработанный механизм восстановления строго определенного липидного состава кооперативных доменов в синаптических окончаниях* — механизм, в основе которого лежит «перекристаллизация» липида. Несмотря на некоторую экстравагантность такого предположения, его привлекательность состоит в том, что, не выходя за рамки основной обсуждаемой гипотезы, мы получаем единый ответ на общие вопросы физиологии сна, сформулированные в начале раздела.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизм синаптического экзоцитоза исследуется в десятках лабораторий мира всем арсеналом современных методов, включая методы геной инженерии. Обнаружены десятки специфических белков экзоцитозно-эндоцитозного аппарата, и между многими из них прослежены функциональные связи. Исследована морфология синапсов методами микроскопии. Множество работ посвящено электрофизиологическим и флуоресцентным исследованиям кинетики синаптического экзоцитоза. Возникает естественный вопрос: почему же не обнаружено прямых указаний на участие фазового перехода в этом процессе? По-видимому, это объясняется следующими обстоятельствами:

В подавляющем большинстве публикаций не сообщаются те экспериментальные условия, которые являются принципиально важными с точки зрения высказанных здесь идей. Например, важнейшую роль в сохранении нативных свойств кооперативных липидных доменов может играть температура в процессе приготовления препарата. Домены могут разрушиться или модифицироваться при температурах, отличающихся от физиологических.

Кроме того в исследовании функциональной роли фазового перехода существует трудность принципиального характера, поскольку структура липидных доменов определяется исключительно слабыми взаимодействиями. Поэтому, в отличие от белков, их невозможно выделить из клетки в чистом виде. Остается опираться на косвенные свидетельства их поведения в клетке, сравнивать с поведением модельных липидных систем и надеяться на разработку новых методов, которые позволят наблюдать за фазовым состоянием доменов в интактной клетке *in situ*.

Нельзя также исключить, что в клетке существуют внутренние метаболические регуляторы температуры фазового перехода (например, эндогенный этанол), которые могут служить целям быстрой адаптации к изменению температуры среды. Время реакции такого адаптационного механизма может быть существенно более длительным, чем время выброса нейромедиатора, но более коротким, чем время лабораторного эксперимента, что должно затруднять экспериментальное обнаружение фазового перехода по косвенным признакам. Такая возможность должна приниматься во внимание при планировании экспериментов.

К сожалению, пока не будет решен вопрос о том, действительно ли в активной зоне синаптических окончаний какого-либо отдела мозга существуют кооперативные липидные домены, фазовый переход которых участвует в выбросе нейромедиатора, идея об участии фазового перехода в синаптическом экзоцитозе остается гипотезой.

Выражаю признательность С.Э.Шнолю, О.С.Виноградовой, И.Я.Подольскому, Е.А.Шляпниковой, Г.Н.Берестовскому, С.П.Маслову, И.А.Корниенко, К.С.Розанову и Р.В.Полозову за обсуждение общих и специальных вопросов биологии и физической химии, относящихся к предмету статьи.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 01–04–48702).

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.Ф., Кожомкулов Э.Т., Шевченко Е.В., Вассерман А.Н., Смирнова Е.Ю., Вознесенский С.А., Морозов Ю.В. // Биофизика. 1986. Т. 31. С. 252—255.
2. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. // Липидные мембраны при фазовых превращениях. М.: Наука. 1992. Гл. 4.
3. Виноградова О.С. // Типокамп и память. Москва: Наука. 1975. 332 с.
4. Горюновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некряч Е.Ф. // Краткий справочник по химии. Киев: АН УССР. 1962.
5. Иванов К.П. // Биоэнергетика и температурный гомеостазис. М.: Наука. 1972.
6. Иванов К.П., Слепчук Н.А. // Докл. Акад. наук СССР. 1985. Т. 281. С. 753—757.
7. Корепанова Е.А., Шевченко Е.В., Кожомкулов Э.Т., Вассерман А.Н., Морозова Е.П., Антонов В.Ф. // Биофизика. 2000. Т. 45. С. 276—282.
8. Мошков Д.А. // Адаптация и ультраструктура нейрона. М.: Наука. 1985.
9. Пастухов Ю. Ф., Екимова И. В., Ноздрачев А. Д., Гусельникова Е. А., Седунова Е. В., Зимин А. Л. // Докл. Акад. наук. 2001. Т. 376. С. 836—840.
10. Смит Г. // В кн.: Руководство по анестезиологии. Ред. Эйткенхед А.П., Смит Г. Москва: Медицина. 1999. Т. 1. Гл. 8.
11. Харакоз Д.П. // Биофизика. 1995. Т. 40. С. 1354—1356.
12. Харакоз Д.П. // Биофизика. 2000. Т. 45. С. 568—572.
13. Холмухамедов Э.Л. // В кн.: Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена. Материалы всесоюзного симпозиума. НЦБИ АН СССР: Пушкино. 1987. С. 35—55.
14. Шноль С.Э. // Физико-химические факторы биологической эволюции. М.: Наука. 1979. Гл. 11.
15. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. // Molecular Biology of the Cell. N.Y.: Garland Publishing, Inc., 1994. Chap. 13.
16. Alifimoff J.K., Firestone L.L., Miller K.W. // Br. J. Pharmacol. 1989. Vol. 96. P. 9—16.
17. Bajjalieh S.M. // Curr. Opin. Neurobiol. 1999. Vol. 9. P. 321—328.
18. Bajjalieh S.M., Scheller R.H. // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 1971—1974.
19. Benzinger T.H. // Physiol. Rev. 1969. Vol. 49. P. 671—759.
20. Berge O.G., Garcia-Cabrera I. // Pharmacol. Biochem. Behav. 1991. Vol. 39. P. 37—41.
21. Biltonen R. // J. Chem. Thermodynam. 1990. Vol. 22. P. 1—19.
22. Bloom M., Evans E., Mouritsen O.G. // Q. Rev. Biophys. 1991. V. 24. P. 293.
23. Blume A. // Thermochimica Acta. 1991. Vol. 193. P. 299—347.
24. Blume A., Hillman M. // Eur. Biophys. J. 1986. Vol. 13. P. 343—353.
25. Cain D.P., Hargreaves E.L., Boon F. // Brain Res. 1994. Vol. 658. P. 135—144.
26. Cantor C.R., Schimmel P.R. // Biophysical Chemistry. Part III. San Francisco: Freeman & Co. 1980. Chap. 21, 22.
27. Cevc G., Marsh D. // Phospholipid Bilayers. Physical Principles and Models. New York: Wiley. 1987. Chap. 1.
28. Cevc G., Richardsen H. // Adv. Drug Deliv. Rev. 1999. Vol. 38. P. 207—232.
29. Cherkin A., Catchpool J. F. // Science. 1964. Vol. 144. P. 1460—1462.
30. Crabbe J. C., Feller D. J., Dorow J. S. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1989. Vol. 249. P. 456—461.
31. Crawshaw L.I., Wallace H.L., Crabbe J.C., Ramos C., Duerr J., O'Connor

- C.S. // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 273. P. R696—R702.
32. Dluzewski A.R., Halsey M.J., Simmonds A.C. // *Mol. Aspects Med.* 1983. Vol. 6. P. 461—573.
33. Dodge F.A., Rahamimoff R. // *J. Physiol.* 1967. Vol. 193. P. 419—432.
34. Epand R.M., Bottega R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. Vol. 944. P. 144—154.
35. Estep T.N., Freire E., Anthony F., Barenholz Y., Biltonen R.L., Thompson T. E. // *Biochemistry.* 1981. Vol. 20. P. 7115—7118.
36. Evans E.A., Skalak R. // *Mechanics and Thermodynamics of Biomembranes.* Boca Raton: CRC Press. 1980. Chap. 4.
37. Fernandez-Chacon R., Konigstorfer A., Gerber S.H., Garcia J., Matos M.F., Stevens C.F., Brose N., Rizo J., Rosenmund C., Södhof T.C. // 2001. *Nature.* Vol. 410. P. 41—49.
38. Fernandez-Chacon R., Södhof T.C. // *Annu. Rev. Physiol.* 1999. Vol. 61. P. 753—776.
39. Fillion M.C., Phillips N.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. Vol. 1329. P. 345—356.
40. Franks N.P., Lieb W.R. // *Anesthesiology.* 1996. Vol. 84. P. 716—720.
41. Freund G. // *Life Sci.* 1973. Vol. 13. P. 345—349.
42. Fuller A., Moss D.G., Skinner J.D., Jessen P.T., Mitchell G., Mitchell D. // *Pflugers Arch.* 1999. Vol. 438. P. 671—680.
43. Galla H.J., Trudell J.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. Vol. 599. P. 336—340.
44. Gillis D.M. // *Bioscience.* 1996. Vol. 46. P. 391—393.
45. Goda Y., Stevens C.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. Vol. 91. P. 12942—12946.
46. Goda Y., Södhof T.C. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997. Vol. 9. P. 513—518.
47. Hazel J.R., McKinley S.J., Gerrits M.F. // *Am. J. Physiol.* 1998. Vol. 275. P. R861—R869.
48. Hazel J.R., Williams E.E. // *Prog. Lipid Res.* 1990. Vol. 29. P. 167—227.
49. Heidelberger R., Heinemann C., Neher E., Matthews G. // *Nature.* 1994. Vol. 371. P. 513—515.
50. Heimburg T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998, Vol. 1415, P. 147—162.
51. Hochachka P.W., Somero G.N. // *Biochemical Adaptation.* Princeton: Princeton University Press. 1984. Chap. 11.
52. Israelachvili J.N., Marcelja S., Horn R.G. // *Q. Rev. Biophys.* 1980. Vol. 13. P. 121—200.
53. Jacobson K., Papahadjopoulos D. // *Biochemistry.* 1975. Vol. 14. P. 152—161.
54. Jain M.K., Wu N.M. // *J. Membr. Biol.* 1977. Vol. 34. P. 157—201.
55. Janes N. // *Chem. Phys. Lipids.* 1996. Vol. 81. P. 133—150.
56. Jessell T.M., Kandel E.R. // *Cell.* 1993. Vol. 72 (Suppl.). P. 1—30.
57. Kamaya H., Ueda I., Moore P.S., Eyring H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. Vol. 550. P. 131—137.
58. Kaminoh Y., Nishimura S., Kamaya H., Ueda I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. Vol. 1106. P. 335—343.
59. Kaminoh Y., Tashiro C., Kamaya H., Ueda I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. Vol. 946. P. 215—220.
60. Katz B. // *The Release of Neural Transmitter Substances.* Springfield, Illinois: Charles C. Thomas. 1969.
61. Kelly R.B. // *Cell.* 1993. Vol. 72 (Suppl.). P. 43—53.
62. Kharakoz D.P. // *Russian J. Phys. Chem. (Special issue).* 2000. (*In press*)
63. Kharakoz D.P., Shlyapnikova E.A. // *J. Phys. Chem. B.* 2000. Vol. 104. P. 10368—10378.
64. Kinney M., Jones W. R., Royal R., Brauer R.W., Sorrel F.Y. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1981. Vol. 68. P. 501—505

65. Kita Y., Bennett L.J., Miller K.W. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1981. Vol. 647. P. 130—139.
66. Lee A.G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1976. Vol. 448. P. 34—44.
67. Lee A.G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1977. Vol. 472. P. 285—344.
68. Liu M.-S., Onji T., Snelgrove N.E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1982. Vol. 710. P. 248—251.
69. Llinas R., Sugimori M., Silver R.B. // *Science*. 1992. Vol. 256. P. 677—679.
70. Lomax P., Bajorek J.G., Bajorek T.A., Chaffee R.R. // *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1981. Vol. 24. P. 33—36.
71. Lomax P., Bajorek J.G., Chesarek W.A., Chaffee R.R. // *Pharmacology*. 1980. Vol. 21. P. 288—294.
72. Macdonald A.G. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1984. Vol. 304. P. 47—68.
73. Macdonald A.G., Marshall N.R., Pertwee R.G. // *J. Appl. Physiol.* 1989. Vol. 66. P. 238—244.
74. Maddis R. *Sleep Mechanisms and Function*. / Ed. Mayes A. Cambridge: Van Nostrand Reinhold (UK). 1983. P. 57—106.
75. Maggio B., Sturtevant J.M., Yu R.K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. Vol. 901. P. 173—182.
76. Matthews G. // *Annu. Rev. Neurosci.* 1996. Vol. 19. P. 219—233.
77. Mayer L.D., Nelsestuen G.L. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1983. Vol. 734. P. 48—53.
78. Melchior D.L., Scavitto F.J., Steim J.M. // *Biochemistry*. 1980. Vol. 19. P. 4828—4834.
79. Melchior D.L., Steim J.M. // *Annu. Rev. Biophys. Biochim.* 1976. V. 5. P. 205.
80. Miller K.W., Paton W.D., Smith E.B., Smith R.A. // *Anesthesiology*. 1972. Vol. 36. P. 339—351.
81. Miller K.W., Paton W.D., Smith R.A., Smith E.B. // *Mol. Pharmacol.* 1973. Vol. 9. P. 131—143.
82. Mizinga K.M., Stino F.K., Samaan S.S., Soliman K.F., Kolta M.G. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995. Vol. 51. P. 525—528.
83. Moscovitch M., Nadel L. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1998. Vol. 8. P. 297—300.
84. Nelson D., Piran T., Weinberg S. (Editors) // *Statistical Mechanics of Membranes and Surfaces* (Jerusalem Winter School for Theoretical Physics, Jerusalem, 1988). Singapore, New Jersey, London, Hong Kong: World Scientific. 1988. Vol. 5.
85. O'Connor C.S., Crawshaw L.I., Bedichek R.C., Crabbe J.C. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1988. Vol. 29. P. 243—248.
86. O'Connor C.S., Crawshaw L.I., Kosobud A., Bedichek R.C., Crabbe J.C. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989. Vol. 33. P. 315—319.
87. Papahadjopoulos D., Jacobson K., Poste G., Shepherd G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1975. Vol. 394. P. 504—519.
88. Parmeggiani P.L. // *Rev. Neurosci.* 1995. Vol. 6. P. 353—363.
89. Pertwee R.G., Marshall N.R., Macdonald A.G. // *J. Appl. Physiol.* 1986. Vol. 61. P. 1623—1633.
90. Pertwee R.G., Marshall N.R., Macdonald A.G. // *Exp. Physiol.* 1990. Vol. 75. P. 629—637.
91. Pringle M.J., Brown K.B., Miller K.W. // *Mol. Pharmacol.* 1981. Vol. 19. P. 49—55.
92. Prosser C.L. // In: *Comparative Animal Physiology*. / Ed. Prosser C.L. Philadelphia—London—Toronto: W.B. Saunders Company. 1973. Chap. 9.
93. Ramachandra V., Moore C., Kaur N., Carli F. // *Br. J. Anaesth.* 1989. Vol. 62. P. 409—414.
94. Richards C.D., Martin K., Gregory S., Keightley C.A., Hesketh T.R., Smith G.A., Warren G.B., Metcalfe J.C. // *Nature*. 1978. Vol. 276. P. 775—779.
95. Ritzmann R.F. and Tabakoff B. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1976. Vol. 273. P. 247—255.

96. *Rowe E.S.* // Biochemistry. 1983. Vol. 22. P. 3299—3305.
97. *Sabatini B.L., Regehr W.G.* // Nature. 1996. Vol. 384. P.170—172.
98. *Sakanishi A., Mitaku S., Ikegami A.* // Biochemistry. 1979. Vol. 18. P. 2636—2642.
99. *Schmidt G., Knoll W.* // Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 1985. Vol. 89. P. 36—43.
100. *Smith R.A., Dodson B.A., Miller K.W.* // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1984. Vol. 304. P. 69—84.
101. *Strehlow U., Jöhnig F.* // Biochim. Biophys. Acta. 1981. Vol. 641. P. 301—310.
102. *Sbdfhof T.C.* // Nature. 1995. Vol. 375. P. 645—653.
103. *Trouble H., Eible H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1974. Vol. 71. P. 214—219.
104. *Uchida K., Yao H., Ema K.* // Phys. Rev. E. 1997. Vol. 56. P. 661—666.
105. *Webb W.B.* Sleep Mechanisms and Function. / Ed. Mayes A. Cambridge: Van Nostrand Reinhold (UK). 1983. P. 1—17.
106. *Wehr T.A.* // Neurosci. Biobehav. Rev. 1992. Vol. 16. P. 379—397.