

РЕЛАКСАЦИОННЫЙ РЕЖИМ ГЕНЕРАЦИИ ЗВУКА КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИЕЙ

В.И. Грачев, А.Р. Зарицкий, Г.А. Ляхов, М.В. Фок

Предложена модель релаксационных колебаний суспензии живых клеток, в которой обнаружена /1/ квазипериодическая генерация звука.

В эксперименте /1/ кювету, содержащую 0,25 мл буферной суспензии клеток (*E.coli*, эритроциты, другие клетки при концентрации 10^6 – 10^9 кл/мл), свежесозревших и дважды отмытых в таком же буфере (K_2HPO_4 , pH = 7,0), помещали между обкладками пьезодатчика. После термостатирования кюветы при $29 \pm 0,01$ °C в течение часа вместе со вскрытой ампулой, содержащей изотонический раствор NaCl, в суспензию доливали 0,75 мл раствора NaCl. Через 3-4 мин самописец начинал регистрировать импульсы с амплитудой от 10 до 300 мкВ (в зависимости от вида клеток). В течение 1,5-3 часов интервал между импульсами увеличивался от 1-4 до 10-15 мин. Осциллограммы с разверткой 50 мс/см фиксировали в каждом импульсе по две составляющие равной амплитуды с интервалом в 0,5 с; при развертке 2-3 мс/см эти составляющие имели вид затухающих цугов длительностью 10-15 мс (содержащих по 10-15 периодов) с явно выраженной еще более тонкой структурой, проанализировать которую пока не удалось.

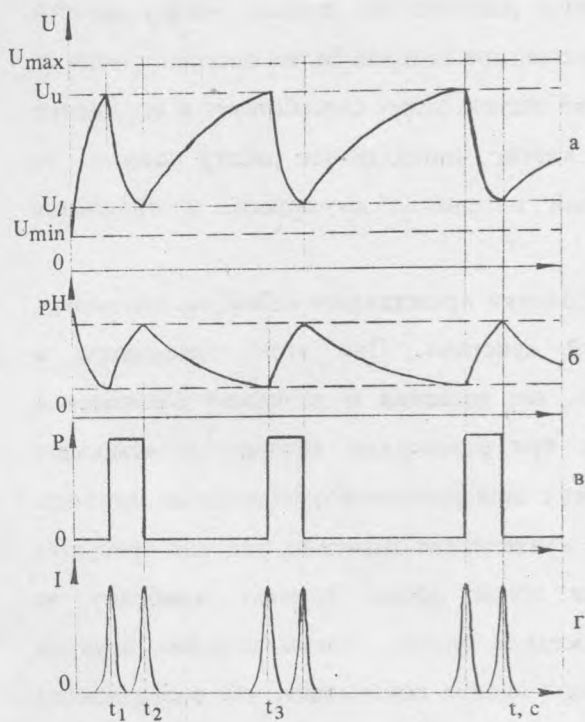
Нарушение теплового контакта, вызванное отведением одной из пластин датчика от кюветы, не влияло на вид импульсов, что исключает тепловой механизм возбуждения. Замена пьезоэлектрика на угольный термодатчик с электрическим сопротивлением, на несколько порядков меньшим, также не изменяла картины, что исключает электромагнитный механизм. Наиболее вероятным, таким образом, является акустический механизм возбуждения импульсов (для угольного сопротивления микрофонный эффект известен).

Вливание раствора NaCl в суспензию неживых клеток не вызывало импульсов, т.е. их генерация связана с жизнедеятельностью клеток. Эффект критичен к условиям опыта и процедуре подготовки суспензии. Необходимо почти полное отсутствие ионов Na^+ и Cl^- во время инкубации суспензии в термостате. Отношение объемов раствора NaCl и суспензии клеток, надежно обеспечивающее "запуск" процесса, лежит в узких пределах около 3:1, что указывает на существенную роль ионных насосов клеток. Для их нормальной работы необходимо, чтобы внутри клетки было достаточно ионов Na^+ , а снаружи — K^+ . Первое требование выполняется тем легче, чем сильнее суспензия разбавлена раствором NaCl, а второе при этом выполняется все хуже; оптимально соотношение объемов суспензии и раствора NaCl порядка единицы, что и наблюдалось в

эксперименте. Необходимость высокой точности термостатирования указывает на неравновесное состояние суспензии.

Изложенное позволяет предположить, что наблюдаемые в /1/ импульсы обусловлены релаксационными колебаниями, для которых характерно непрерывное изменение параметров системы, стремящихся к предельным значениям, но их не достигающих из-за скачкообразного перехода системы (с возбуждением звука) в состояние с иными предельными значениями. Времена пребывания системы вблизи асимптотических положений при этом, естественно, различны.

На молекулярном уровне клеточная суспензия представляет собой систему электролит-мембрана-цитоплазма (внутриклеточный электролит) с переменными электропроводностью оболочки, разностью потенциалов на ней, рН цитоплазмы и другими параметрами. С введением Na^+ и Cl^- в концентрации, более чем на порядок превышающей исходную, возникают диффузионные потоки ионов через оболочку, причем поток Cl^- в первый момент значительно превосходит поток Na^+ , так как проницаемость мембраны для Cl^- много выше, чем для Na^+ . Трансмембранный потенциал резко возрастает (рис. 1а). Вследствие этого поток ионов



Cl^- уменьшается, а Na^+ возрастает. Однако с увеличением концентрации в цитоплазме ионов Na^+ насосы активизируются, выкачивая их обратно, причем на каждые 3 иона Na^+ заканчивается внутрь только 2 иона K^+ , поэтому трансмембранный потенциал продолжает расти. При достижении порогового уровня потенциала происходит структурная перестройка мембраны (обнаруженная в /2/ по "закрыванию" мембраны — резкому уменьшению ее неспецифической

Рис. 1. Колебания параметров системы электролит-мембрана-цитоплазма и генерация импульсов (качественная картина): U — трансмембранный потенциал, pH — кислотность цитоплазмы, P — неспецифическая проницаемость мембраны, I — интенсивность звука.

проницаемости). Работа ионных насосов при этом не нарушается, потенциал продолжает расти. Ионы, которые не участвуют в активном транспорте, распределяются в соответствии с трансмембранной разностью потенциалов. В частности, растёт концентрация протонов в

цитоплазме (рис. 1б) — цитоплазма закисляется. Уменьшается средний заряд белков; когда он становится меньше критического, белки адсорбируются на мембране. Та же разность потенциалов распределяется теперь в более толстом слое (мембрана + белок), а в слабом поле устойчива "открытая" структура мембраны, в которую она и переходит под действием флуктуационного толчка (точка t_1).

Открытие мембраны прекращает рост трансмембранного потенциала (рис. 1а) на уровне $U_u < U_{\max}$. Из-за резкого увеличения проницаемости ионы Na^+ вновь устремляются в цитоплазму, что вызывает разряд мембранной емкости и падение потенциала на ней. Концентрация протонов также падает (рис. 1б), средний отрицательный заряд белков увеличивается, и при достижении определенной его величины белки десорбируются с мембраны, поле в ней возрастает, что опять вызывает ее перестройку (рис. 1в), мембрана закрывается (точка t_2). Трансмембранный потенциал к моменту t_2 уменьшается лишь до $U_l > U_{\min}$ (рис. 1а) и после закрывания мембраны снова возрастает благодаря ионным насосам. Далее процесс повторяется в той же последовательности на ином уровне, так как пока мембрана была открыта, в клетке увеличилось содержание Na^+ , и K_2HPO_4 частично заместился на Na_2HPO_4 . Величина pH теперь сместилась в щелочную сторону, и после закрывания мембраны ионным насосам приходится работать все дольше, чтобы довести трансмембранную разность потенциалов (и pH) до величины, при которой белки адсорбируются на оболочке. В результате период релаксационных колебаний растет; этому способствует и истощение запасов питательных веществ и аденозинтрифосфата в клетке, замедляющее работу насосов. На некотором цикле насосы не доводят трансмембранный потенциал до порога, и колебания прекращаются.

Процесс "закрывания" и "открывания" клеточной оболочки представляет собой, по-видимому, фазовый переход двумерная жидкость — двумерный кристалл. При этом изменяются и механические свойства липидного бислоя (в частности, его толщина и величина равновесной площади), он оказывается в напряженном состоянии, при релаксации которого и возникает звуковой импульс. Фазовый переход в липидах происходит с запаздыванием относительно момента, когда величина трансмембранного потенциала проходит критическое значение, так как требуется еще, чтобы флуктуация в бислое создала зародыш новой фазы. Выводит мембрану из "закритического" состояния и звуковой импульс от соседней клетки. Таким образом, звук от "сработавшей" оболочки запускает перестройку остальных; оценка показывает, что расфазировка не превышает 3° . Тому, что все клетки одновременно оказываются готовыми к перестройке, способствует хорошая синхронизация культуры, достигаемая тщательным термостатированием и быстрым размешиванием раствора NaCl. Оценки показывают, что упругой энергии, запасенной в мембране, достаточно для создания одиночного звукового импульса, а общего запаса энергии в клетке — для всей наблюдаемой серии импульсов.

Итак, интервал 0,5 с между звуковыми импульсами в паре определяется скоростью спада трансмембранного потенциала при открытой мембране, а интервал между парами — скоростью действия ионных насосов. Предлагаемая модель объясняет и постоянство амплитуды импульсов — параметры фазового перехода не зависят от предыстории.

Релаксационные колебания системы, сопровождающиеся генерацией звуковых импульсов клеточной суспензией, не связаны с конкретным типом исследованных в /1/ клеток, поэтому подобная "возбудимость" должна быть свойственна всем клеткам, имеющим белково-липидную оболочку, содержащую ионные насосы.

Авторы благодарны В.Н. Брезгунову и Н.С. Соломину за уточнение данных эксперимента и Д.С. Чернавскому за ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брезгунов В.Н., Соломин Н.С. Деп. ВИНТИ 16.08.89, № 5541-В89.
2. Фок М.В. и др. Биофизика, 34, 901 (1989).

Поступила в редакцию 17 января 1991 г.