

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИСКРЕТНЫХ ТОКОВ ОДИНОЧНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН НА СИНТЕТИЧЕСКИХ НАНОМЕТРОВЫХ ПОРАХ В ПЛЕНКАХ ИЗ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА

© А. А. Лев, В. А. Готлиб, Н. Э. Лебедева

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: lev@mail.cytspb.rssi.ru*

При исследовании проводимости одиночных сверхузких пор (диаметр от 1 до 15 нм), сформированных в тонких мембранах (толщина 10—12 мкм) из полиэтилентерефталата (ПЭТФ), были обнаружены спонтанные дискретные изменения токов, протекающих через такие поры, при подаче от внешнего источника разности потенциалов от 200 до 1000 мВ. По целому ряду характеристик такие дискретные токи (дискретные изменения проводимости) оказались идентичными так называемым токам одиночных ионных каналов клеточных мембран. Сверхузкие поры, свойства которых описываются в настоящей работе, получались при щелочном травлении треков в тонких ПЭТФ-мембранах (вариант так называемых ядерных фильтров). При этом на стенках пор образуются карбоксильные группы, т. е. фиксированные отрицательные заряды и компенсирующий их слой противоионов (катионов). При приложении разности потенциалов на мембрану этот последний слой катионов способен переносить ток, причем такой перенос именуется поверхностной проводимостью. При нанометровых диаметрах пор эта поверхностная проводимость может оказываться доминирующей. Нами было показано, что дискретные изменения проводимости нанометровых пор связаны с метастабильностью их поверхностной проводимости. В высококатион-избирательных каналах клеточных мембран неизбежно должен существовать участок с доминирующей там поверхностной проводимостью, а следовательно, и метастабильностью этой проводимости. Тем самым предлагается новое объяснение дискретности токов одиночных катион-специфических каналов клеточных мембран. Такое объяснение не исключает наличия других, традиционных, объяснений дискретности токов ионных каналов.

Ключевые слова: нанометровые поры, искусственные мембраны, полиэтилентерефталат, дискретные токи, поверхностная проводимость.

Приведен краткий обзор основных данных, полученных к настоящему времени на одиночных нанометровых порах полностью синтетической системы, повторяющих ряд характерных свойств одиночных ионных каналов клеточных мембран.

Для исследования свойств одиночных трансмембранных ионных каналов живых клеточных мембран в настоящее время широко применяются различные варианты так называемого пэтч-метода (patch-method). Как известно, сущность этого метода состоит в том, что по поверхности клетки перемещается с помощью микроманипулятора относительно широкостенный микроэлектрод. Локализация такого микроэлектрода над внешним устьем ионного канала регистрируется по возникновению спонтанных дискретных изменений тока при подаче разности потенциалов на мембрану от внешнего источника. Такие дискретные токи, т. е. изменения трансмембранной ионной проводимости, характеризуются крутыми фронтами перехода от малой проводимости к относительно большой и обратно. Время, приходящееся на восходящие и нисходящие фронты, составляет несколько микросекунд.

Такие дискретные изменения токов (дискретные изменения проводимости) являются характерным призна-

ком катион-избирательных («калиевых», «натриевых» и «кальциевых»), а также анион-избирательных («хлорных») ионных каналов. Такого рода дискретные изменения проводимости одиночных ионных каналов клеточных мембран принято относить за счет конформационных перестроек так называемой воротной зоны этих каналов. Эти перестройки можно относить либо к «механическому» перекрытию воротной зоны, либо к возникновению потенциального барьера, т. е. зоны, имеющей статический заряд того же знака, что и знак переносимых через канал ионов. Подавление дискретных токов одиночных ионных каналов принято относить за счет прямого действия блокирующего агента на воротную зону ионного канала или за счет аллостерических взаимодействий, приводящих к тому же эффекту.

Считается, что воротная зона трансмембранного ионного канала имеет специфическую пептидную структуру. В настоящей работе будет показано, что практически не отличимые по целому ряду характеристик изменения проводимости могут наблюдаться при исследовании полностью синтетических полимерных мембран с пронизывающими эти мембраны порами, диаметр которых измеряется нанометрами, т. е. на системах, где нельзя предположить существование специфических пептидных

образований, формирующих воротные структуры ионных каналов клеточных мембран.

В нашей работе использовались модельные тонкие (10—12 мкм) пленки из полиэтилентерефталата (ПЭТФ), подвергнутые облучению в циклотроне или линейном ускорителе ионами инертных газов (Xe, Kr), а также ионами золота. Ускоренные ионы обладали энергией порядка 250 МэВ. При облучении пленок из полимерных материалов в них образуются линейные треки — атомарные возмущения структуры полимера. Такие изменения структуры полимера невозможно обнаружить ни с помощью электронной микроскопии, ни по изменению электропроводности пленки. Однако эти изменения удается обнаружить при последующей химической обработке пленок, когда по ходу трека образуются поровые пространства.

Мембраны из полиэтилентерефталата (ПЭТФ-мембраны) с наведенными там треками были получены д-ром П. Ю. Апелем на циклотроне в Лаборатории ядерных реакций Объединенного института ядерных исследований (ОИЯИ, Дубна), а также проф. Р. Шпором (R. Spor) и д-ром П. Ю. Апелем при облучении в линейных ускорителях в Институте исследования тяжелых ионов (Дармштадт, Германия).

Формирование нанометровых пор, пронизывающих ПЭТФ-мембрану, проводили с помощью щелочного травления таких мембран, причем на стенках пор образуются карбоксильные группы, т. е. возникает фиксированный отрицательный заряд. В зависимости от концентрации травящей щелочи, а также от температуры и длительности травления получают поры различного диаметра. Для получения цилиндрических пор травящий раствор щелочи (10 М NaOH) находится с обеих сторон пленки. Для образования пор конической формы щелочной раствор находится с одной стороны пленки, тогда как с другой — 10 М раствор уксусной кислоты. Во всех случаях процесс травления проводится под контролем электропроводности мембраны. Появление электропроводности свидетельствует о возникновении сквозной поры. При формировании конических пор нейтрализация щелочи кислотой приводит к прекращению процесса травления и образуется узкий конец поры, диаметр которого оценивается лишь по значению электропроводности и составляет 1—2 нм. Широкий конец конической поры удавалось обнаружить с помощью электронной микроскопии, его диаметр был найден равным 500 нм (Siwy et al., 2002).

Фиксированный отрицательный заряд, образующийся на стенках пор при щелочном травлении ПЭТФ-мембран, компенсируется слоем ионов противоположного знака, в нашем случае — катионов (противоионов), образуя таким образом двойной электрический слой. Как и при облучении в циклотроне, так и в линейном ускорителе образуются множественные треки и соответственно при их травлении формируются многопоровые мембраны. Полимерные пленки с большим числом пор (10^6 — 10^9 пор на 1 см^2) давно используются в практике как фильтрующие мембраны («ядерные мембраны»). Несмотря на то что разброс диаметров пор таких многопоровых мембран относительно мал, при их исследовании получают некоторые усредненные значения проводимости в пересчете на 1 пору.

Для детального изучения свойств нанометровых пор, а также для сопоставления этих свойств с тем, что наблюдается при использовании пэтч-метода в исследованиях ионных каналов клеточных мембран, необходимо было получить полимерные пленки с одиночными порами. Для

этой цели вначале мы использовали перекрытие устьев наведенных в полимерной пленке пор в многопоровых мембранах гидрофобными материалами. Последнее достигалось выдерживанием многопоровой мембраны в диоксиде или растворах липидов в смеси хлороформа с метанолом. В результате удавалось получить мембраны с очень малым числом пор, вплоть до единичной (Lev et al., 1992). Кроме того, использовали метод «маска». Он состоял в том, что многопоровая мембрана перекрывалась тонкой пленкой с очень узким отверстием (диаметр 40—50 мкм), при этом использовались полиэтиленовые пленки, имеющие с одной стороны электроизолирующий слой. В результате выдавливания этого слоя и его затекания на многопоровую мембрану оставались проводящими 1—2 поры.

Однако в последние годы предпочтение отдавалось препаратам ПЭТФ-мембран, имеющим одиночный трек. Такие одиночные треки получал проф. П. Ю. Апель при бомбардировке тяжелыми ускоренными ионами на циклотроне ПЭТФ-мембраны, защищенной специальными фильтрами, резко ослабляющими плотность потока, бомбардирующего мембрану. Кроме того, использовалась специальная система, отклоняющая поток ускоренных ионов в линейном ускорителе после прохождения одиночной частицы, разработанная Р. Шпором и П. Ю. Апелем в Институте исследования тяжелых ионов (Дармштадт, Германия) (Apel et al., 2001; Siwy et al., 2002). Пленки с одиночными треками подвергались травлению так же, как это описано выше для многопоровых мембран. Таким образом получали систему, в принципе идентичную вариантам пэтч-метода, используемого для регистрации одиночных ионных каналов мембран живых клеток.

Так как при щелочном травлении треков в ПЭТФ-мембранах в порах на их стенках образуются карбоксильные группы, несущие фиксированный отрицательный заряд, то при его компенсации противоионами (катионами) формируется двойной электрический слой. Наружный слой, образованный катионами, при приложении разности потенциалов на мембрану способен переносить ток. Такого рода перенос впервые был описан в теоретической работе Смолуховского (Smoluchowski, 1903) и назван поверхностной проводимостью. В зависимости от соотношения объема порового пространства и площади поверхности поры, а также от величины и плотности фиксированного заряда поверхностная проводимость может превышать объемную при заполнении пространства поры относительно разбавленными растворами электролитов. В наших исследованиях при использовании в качестве базового электролита миллимолярных растворов KCl величины поверхностной проводимости могли превышать рассчитанные значения объемной вплоть до 50 крат.

При доминировании поверхностной проводимости, т. е. проводимости за счет движения катионов, и при высокой плотности фиксированных зарядов, естественно, имеет место высокая катионная избирательность, определяющаяся по числам переноса (t_+). Величину t_+ определяли по формуле

$$t_+ = \{ \varphi / [(2,3RT/zF) \cdot \lg(a_1/a_2)] + 1 \} / 2,$$

где a_1 и a_2 — активности электролитов, находящихся по разным сторонам мембраны; R и F — стандартные физические величины; T — температура в градусах Кельвина; z — валентность катиона; φ — концентрационная разность потенциалов.

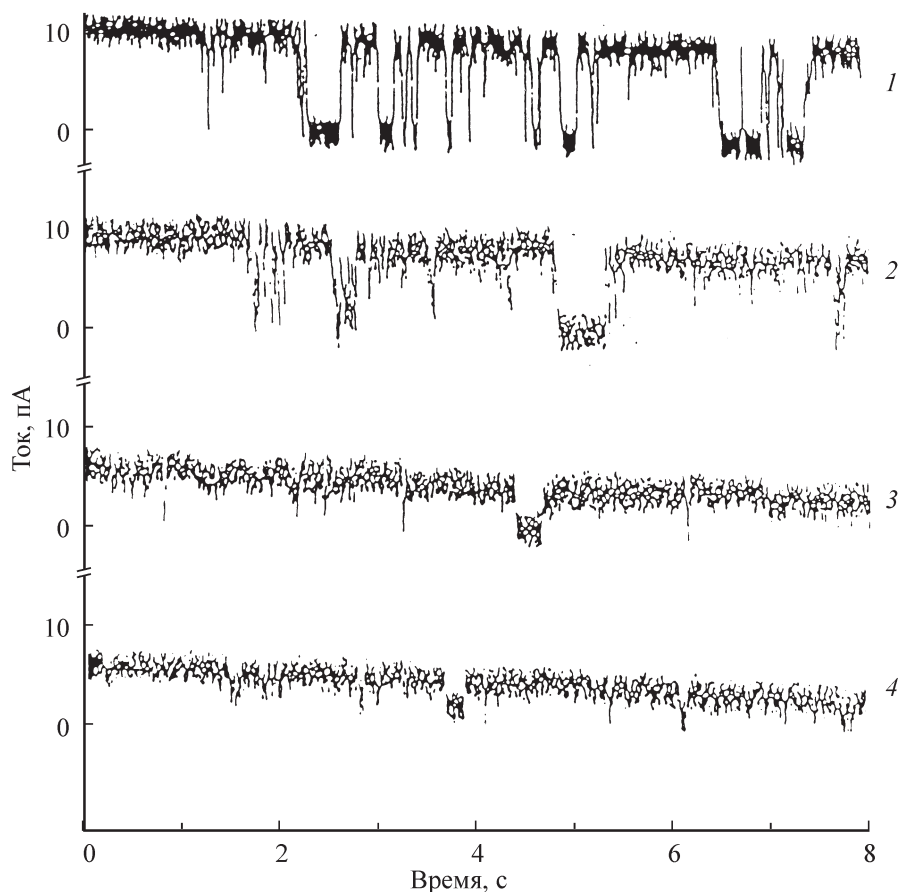


Рис. 1. Фрагменты записей токов одиночной нанометровой цилиндрической поры в трековой ПЭТФ-мембране в отсутствие и в присутствии CaCl_2 в базовом растворе (0.1 М KCl , 0.005 М HEPES , pH 7.4).

1 — без CaCl_2 ; 2—4 — CaCl_2 в концентрациях соответственно $3 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} и $3 \cdot 10^{-3}$ М. Подаваемое напряжение 200 мВ. ПЭТФ — полиэтилентерефталат. По данным и с любезного разрешения Т. К. Ростовцевой.

При t_+ , превышающем 0.8, можно говорить о высокой катионной избирательности мембраны. В наших исследованиях в отдельных экспериментах были получены значения t_+ , превышающие 0.95.

Неожиданно в записях токов, протекающих через одиночные цилиндрические и конические поры, полученные при щелочном травлении треков ПЭТФ-мембран, были получены спонтанные дискретные изменения этих токов, возникающие при подаче разности потенциалов от внешнего источника. Эти дискретные изменения токов (т. е. изменения проводимости) имели крутые фронты при переходе от низкой проводимости к относительно высокой. Время перехода фронта оценивается в 1 или несколько микросекунд. Продолжительность периода относительно высокой проводимости при такого рода флуктуациях составляла несколько десятых секунды. По своей форме и величинам проводимости дискретные токи, переносимые через нанометровые поры ПЭТФ-мембран (рис. 1, кривая 1; рис. 2, а), оказывались практически идентичными дискретным токам одиночных ионных каналов в мембранах живых клеток. Блокирование дискретных токов, протекающих через нанометровые поры в ПЭТФ-мембранах, при понижении pH базовых растворов (до 2.8—3.0), а также при малой концентрации поливалентных катионов в базовом растворе, нейтрализующих фиксированные заряды на стенках таких пор, указывает на то, что описываемые дискретные токи связаны с повер-

хностной проводимостью нанометровых пор. На рис. 1 показано изменение дискретных токов пор в ПЭТФ-мембранах при введении в базовый электролит (0.1 М KCl) хлорида кальция в миллимолярных концентрациях. Как видно на этом рисунке, увеличение концентрации CaCl_2 в относительно концентрированном базовом растворе (0.1 М KCl) приводит к уменьшению частоты появления дискретных токов и сопутствующему уменьшению их амплитуды. При концентрации CaCl_2 $3 \cdot 10^{-3}$ М дискретные токи практически полностью исчезают (рис. 1, кривые 2—4).

Аналогичное блокирование спонтанных дискретных токов, протекающих через нанометровые цилиндрические поры в ПЭТФ-пленках, было обнаружено при введении в базовый электролит растворов хлоридов магния, бария и алюминия в миллимолярных концентрациях, а также при увеличении в базовом растворе концентрации протонов (уменьшении pH раствора) (Pasternak et al., 1993). При блокировании дискретных токов двухвалентными ионами эффект блокирования зависит от вида двухвалентного иона.

Особенно резко блокирующее действие было обнаружено при введении в базовые растворы (0.1 М KCl) рутениевого красного (Ru^{6+}), как известно, являющегося классическим блокатором катион-избирательных ионных каналов клеточных мембран (рис. 2). При введении в базовые электролиты шестизарядного органического ка-

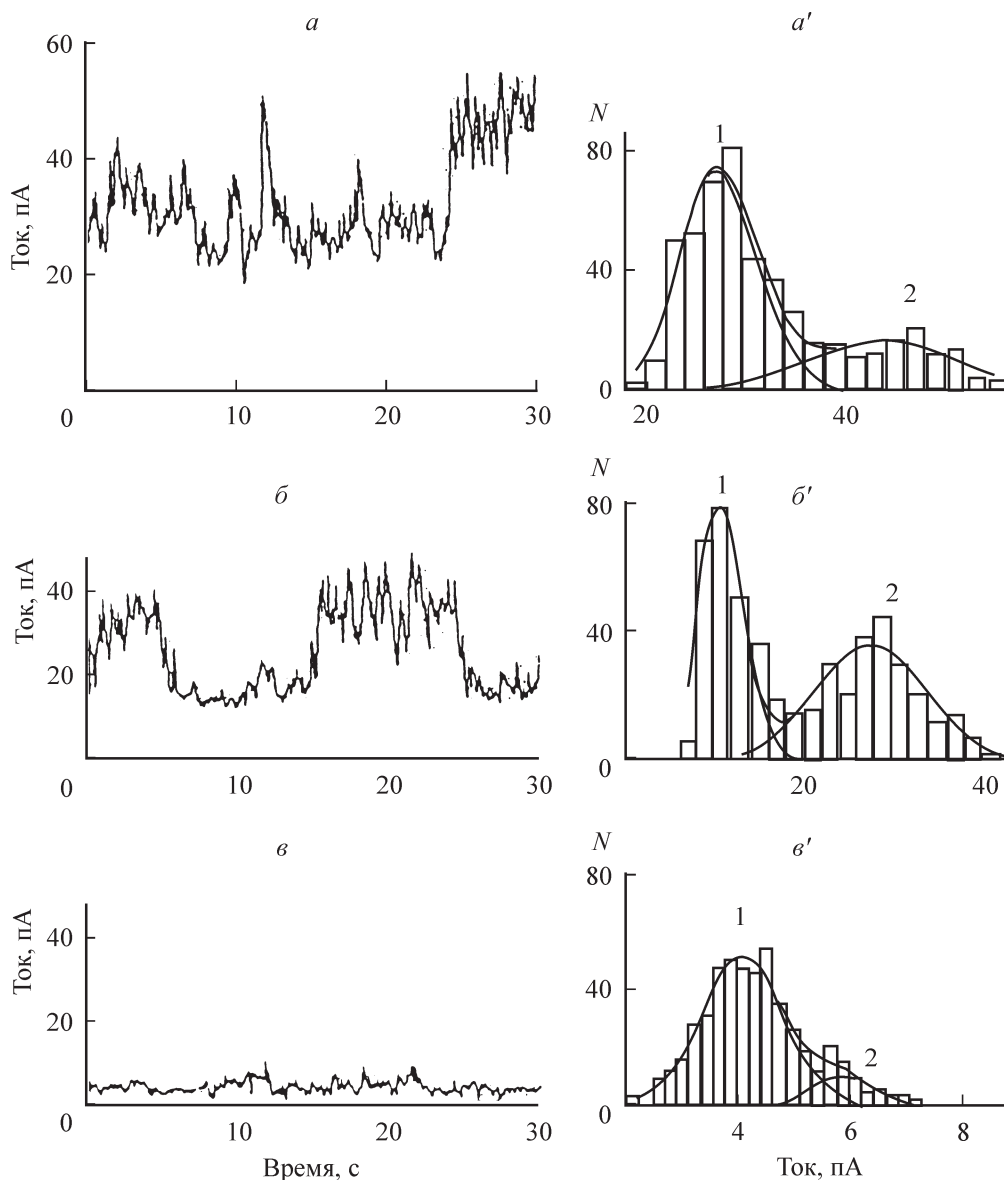


Рис. 2. Фрагменты записей токов одиночных нанометровых конических пор в трековых ПЭТФ-мембранах (*a–в*) и соответствующие разложения кривых амплитудного распределения токов (по Гауссу; *a'–в'*) в отсутствие и в присутствии рутениевого красного.

a, a' — без рутениевого красного; *б, б'* и *в, в'* — рутениевый красный в концентрациях соответственно 10^{-6} и 10^{-5} М; в кривых разложения по оси ординат — число точек (N), соответствующих амплитудам токов при их отборе с интервалом 5 мс. 1 — закрытое состояние, 2 — открытое состояние. Все записи получены при приложении разности потенциалов 800 мВ со знаком «плюс» на узкой части конической поры; базовый раствор 0.1 М KCl. По данным и с любезного разрешения И. О. Вейнберг (2006).

тиона Ru^{6+} следует ожидать наиболее полной нейтрализации отрицательных фиксированных зарядов на стенках пор и, следовательно, исчезновения дискретных токов, которые, как было сказано, определяются флуктуациями поверхностной проводимости. Полное исчезновение дискретных токов мы наблюдали при введении в базовый электролит Ru^{6+} в концентрации 10^{-5} М (в этой работе использовались мембраны с нанометровыми коническими порами; Вейнберг и др., 2005).

Дискретные токи, обнаруженные при исследовании одиночных пор нанометровых размеров, пронизывающих тонкие пленки из ПЭТФ, подавляются при использовании других органических катионов, в частности некоторыми местными анестетиками, практически используемыми для блокирования возбудимости нейронов, также связан-

ной с функционированием катион-избирательных ионных каналов клеточных мембран. В работе Вейнберг (2006) было показано, что такие местные анестетики, как ультракаин, лидокаин и новокаин, уменьшают частоту возникновения дискретных токов одиночных пор, образованных в ПЭТФ-пленках при щелочном травлении одиночных треков.

На тех же модельных системах было показано, что введение в базовые растворы (0.1 М NaCl, pH 6) амилорида (блокатора потенциалнезависимых катион-избирательных каналов клеток почечных канальцев теплокровных животных) в концентрации 10^{-7} М вызывало подавление суммарной проводимости поры и уменьшение амплитуды флуктуаций дискретных токов (Лев, Вейнберг, 2004).

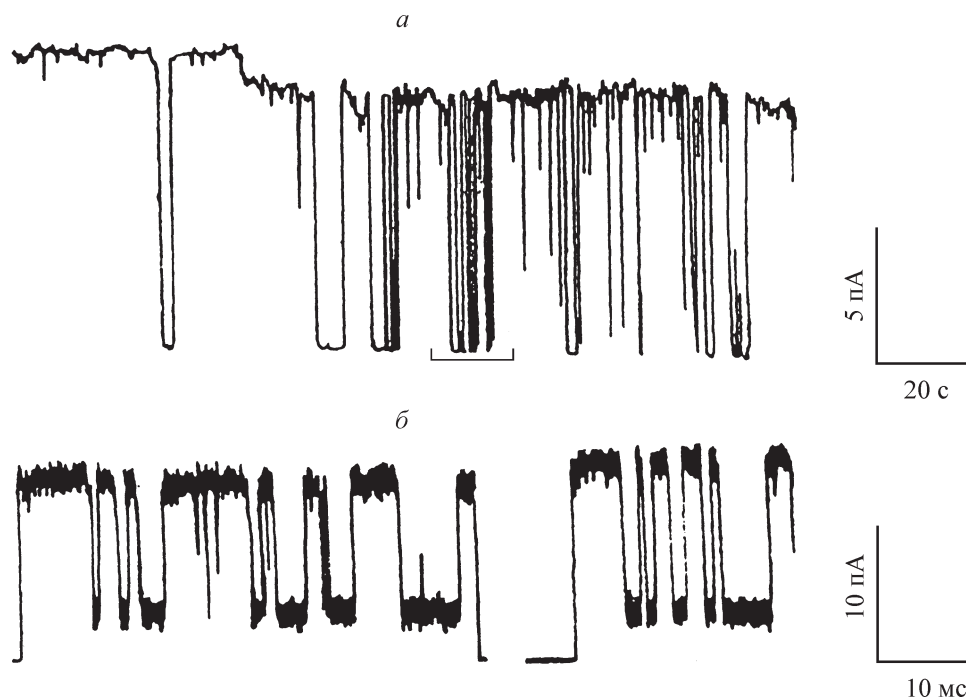


Рис. 3. Дискретные токи, зарегистрированные для одиночной нанометровой цилиндрической поры в ПЭТФ-мембране при относительно малой (а) и большей (б) скоростях записи.

а — квадратной скобкой внизу отмечен участок записи, который представлен при большей скорости развертки (б). Подаваемое напряжение 200 мВ; базовый раствор 0.1 М КСl. По данным и с любезного разрешения Ю. Е. Корчева.

В записях дискретных токов, протекающих через нанометровые одиночные поры в ПЭТФ-мембранах, особенно четко выделяются токи, отвечающие относительно высокой проводимости, которые сохраняются в течение времени, намного превосходящем время так называемого открытого состояния ионных калиевых, натриевых (но не кальциевых) каналов клеточных мембран. Однако на участках таких относительно высоких значений дискретных токов очень часто обнаруживаются быстрые их флуктуации. Эти быстрые флуктуации, как это показано на рис. 3, б, при большей скорости развертки оказываются также достаточно четко выраженными дискретными токами с участками постоянной проводимости. Так как в этих случаях длительности относительно высоких значений дискретных токов уже совпадают с теми, которые наблюдаются для одиночных калиевых и натриевых ионных каналов клеточных мембран, можно с достаточным основанием считать предлагаемую нами модель адекватной и для этих токов одиночных ионных каналов клеточных мембран.

Наиболее важным фактом, следующим из представленного выше экспериментального материала, является обнаружение дискретных, спонтанных изменений проводимости в сверхузких (нанометровых) порах, пронизывающих мембрану из ПЭТФ. Такие спонтанные дискретные изменения проводимости в нанометровых порах, сформированных в ПЭТФ-мембранах, были подтверждены в серии работ, выполненных в лаборатории Пастернака (Lev et al., 1993; Pasternak et al., 1993; Korchev et al., 1997).

Вполне идентичные дискретные спонтанные изменения проводимости были найдены американскими учеными Саксом и Квином (Sachs, Qin, 1993) при исследовании системы, образованной ширококостенным капилляром,

прижатом к слою гидрофобного пластика (silgard). В этой последней работе выраженные дискретные изменения проводимости оказались обратно пропорциональными ширине щели между стеклянным капилляром и изолирующим слоем силгарда, что также с достаточным основанием позволяет отнести эти дискретные изменения проводимости к категории спонтанных флуктуаций поверхностной проводимости в этой системе. Детальный анализ физической природы указанных выше дискретных изменений проводимости в сверхузких пространствах потребует еще дальнейших исследований.

Ранее сходные спонтанные дискретные изменения проводимости обнаруживали на полупроводниковых системах. Вероятные теоретические обоснования такого рода переходов в полупроводниковых системах обсуждаются в работе Шкловского и Эфроса (1979). В этих системах носителем тока являлись электроны. Однако спонтанные дискретные изменения проводимости (дискретные изменения величин токов, переносимых сравнительно медленно движущимися частицами — ионами) были показаны в наших работах впервые.

В настоящей работе предлагается возможное альтернативное объяснение дискретности токов одиночных ионных каналов, связанное с особым свойством поверхностной проводимости в сверхузких пространствах. Блокирование дискретных токов, показанное на модельных системах и наблюдаемое на ионных каналах мембран живых клеток, может иметь аналогичный механизм. Изложенная в работе гипотеза не противоречит традиционно предлагаемому в литературе объяснению механизма дискретности и блокирования токов ионных каналов клеточных мембран, а является иным и более общим объяснением природы дискретности токов и их блокирования в нанометровых пространствах.

Список литературы

Вейнберг И. О. 2006. Механизмы транспорта ионов через нанометровые поры в модельных мембранах: Автореф. канд. дис. СПб. 22 с.

Вейнберг И. О., Готлиб В. А., Анель П. Ю., Лев А. А. 2005. Моделирование блока проводимости катионизбирательных каналов клеточных мембран рутением красным на синтетических нанометровых порах. Докл. РАН. 405 (6) : 822—825.

Лев А. А., Вейнберг И. О. 2004. Моделирование действия амилорида с помощью исследования проводимости нанометровых каналов синтетических трековых мембран. Докл. РАН. 399 (3) : 415—417.

Шкловский Б. И., Эфрос А. Л. 1979. Электронные свойства легированных полупроводников. М.: Наука. 416 с.

Apel P., Korchev Y. E., Siwy Z., Spohr R., Yoshida M. 2001. Diode-like single-ion track membrane prepared by electro-stopping. Nucl. Instrum. Methods B. 184 : 337—350.

Korchev Y. E., Bashford C. L., Alder G. M., Apel P. Y., Edmonds D. T., Lev A. A., Nandi K., Zima A. V., Pasternak C. A. 1997. A novel explanation for fluctuations of ion current through narrow pores. FASEB J. 11 : 600—608.

Lev A. A., Korchev Y. E., Rostovtseva T. K., Bashford C. L., Edmonds D. T., Pasternak C. A. 1993. Rapid switching of ion cur-

rent in narrow pores: implications for biological ion channels. Proc. R. Soc. Lond. 252 : 187—192.

Lev A. A., Korchev Y. E., Rostovtseva T. K., Bashford C. L., Pasternak C. A. 1992. Lipid impregnated nuclear filters as a model for studies of surface conductance and single channel phenomena. In: Biophysics of membrane transport. Agricultural University of Wroclaw, Poland. 321—349.

Paternak C. A., Bashford C. L., Korchev Y. E., Rostovtseva T. K., Lev A. A. 1993. Modulation of surface flow by divalent cations and protons. Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects. 77 : 119—124.

Sachs F., Qin F. 1993. Gated, ion selective channels observed with patch pipettes in the absence of membranes: novel properties of a gigaseal. Biophys. J. 65 : 1101—1107.

Siwy Z., Gu Y., Spohr H. A., Baur D., Wolf-Reber A., Spohr R., Apel P., Korchev Y. E. 2002. Rectification and voltage gating of ion currents in a nanofabricated pore. Europhys. Lett. 60 : 349—355.

Smoluchowski M. 1903. Contribution a la theorie de l'endosmose electrique et de quelques phenomenes correlatifs. Bull. Intern. de l'Academ. des Sciences de Cracove. Class des Sci. Mathem. et Naturell. Cracovie Imr. De Universite. 3 : 182—199.

Поступила 23 VIII 2007

MODELING OF DISCRETE CURRENTS OF SINGLE ION CHANNELS OF CELL MEMBRANES USING SYNTHETIC NANOMETER PORES IN POLYETHYLENE TEREPHTHALATE FILMS

A. A. Lev, V. A. Gotlib, N. E. Lebedeva

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: lev@mail.cytspb.rssi.ru

In studying of conductivity of single supernarrow pores (varying 1 to 15 nm in diameter), formed in thin membranes (10—12 μm in the thickness) from polyethylene terephthalate (PETP), there were revealed discrete changes of currents passing through such pores when applied from external source of potential difference from 200 to 1000 mV. By several characteristics, such discrete currents (discrete conductivity changes) appeared to be identical the so-called current of single ionic channels in the cell membranes. Supernarrow pores which properties are described in the present work were obtained as a result of alkaline etching of tracks in thin PETP membranes (a variant of the so-called nuclear filters). Alkaline etching leads to formation of negative fixed charges on the walls of the pores compensated by positive counterions. When setting potential difference onto the PETP membrane, the latter cation layer is able to transfer the current and this transfer was called the surface conductance. In the case of nanometer pores, such surface conductance may be dominating. We have shown that these discrete changes of currents passing through nanometer pores are associated with metastability of the surface conductance. In the case of highly cation-selective channels in the cell membranes it is inevitable, that at least a part of these channels should have dominating cation surface conductance and mentioned above conductance metastability as well. Our findings allow us to propose a new explanation of the origin of the characteristic discreteness of the currents of cation-selective ionic channels in the cell membranes.

Key words: nanometer pores, synthetic membranes, polyethylene terephthalate, discrete currents, surface conductance.