

РАСЧЕТ Na^+/Cl^- СЕЛЕКТИВНОСТИ В ПЛОТНЫХ КОНТАКТАХ МЕЖДУ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ МЕТОДАМИ НЕЛОКАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОСТАТИКИ С ПОЛЮСНЫМИ МОДЕЛЯМИ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ БЕЗ ЭФФЕКТА ПЕРЕЭКРАНИРОВАНИЯ

© А. А. Рубашкин,^{1,*} П. Исерович²

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

² Государственный университет Центра медицины, Нью-Йорк, 11203, США;

* электронный адрес: andrey.rubashkin@gmail.com

Разработана математическая модель Na^+/Cl^- селективности в плотных контактах (ПК) между эпителиальными клетками. Показано, что Na^+/Cl^- селективность в ПК зависит от суммарного заряда аминокислотных остатков макромолекул клаудина внутри ПК, а также от коэффициентов распределения ионов между ПК и свободным раствором. Показано, что полученные формулы предсказывают изменение Na^+/Cl^- селективности в ПК на Cl^-/Na^+ селективность, если изменяется знак суммарного заряда аминокислотных остатков в ПК. Рассчитанная величина Na^+/Cl^- селективности для клеток MDCK совпадает с экспериментальными данными работы (Colegio et al., 2002). Для расчета изменения энергии сольватации ионов при их переходе в ПК использованы формулы нелокальной электростатики с одно-, двух- и трехполюсными моделями диэлектрической функции без учета эффекта переэкранирования.

Ключевые слова: Na^+/Cl^- селективность, плотные контакты, эпителиальные клетки, заряд макромолекул клаудина, полюсная модель диэлектрической функции.

Принятые обозначения: НЭ — нелокальная электростатика, MDCK — клетки почки собаки Майдин-Дэрби, ПК — плотные контакты (Tight Junctions — TJ) между эпителиальными клетками.

Плотные контакты (ПК) в монослоях эпителиальных клеток представляют собой каналы шириной около 4 нм между плоскопараллельными плазматическими мембранами, заполненные различными макромолекулами. Для образования большой Na^+/Cl^- селективности в ПК основными являются молекулы клаудина (claudin) (Colegio et al., 2002; Van Itallie, Anderson, 2004; Anderson, Van Itallie, 2009), которые содержат заряженные аминокислотные остатки.

В ПК происходит транспортировка как макромолекул, так и ионов электролита. Барьер, образуемый в ПК молекулами клаудина, контролирует эти потоки. Трансмембранные молекулы клаудина — это белки с мол. массой около 25 кДа, имеющие две внеклеточные петли, которые находятся в ПК между клетками и несут набор заряженных аминокислотных остатков (Van Itallie, Anderson, 2004).

Было показано (Colegio et al., 2002), что белковые молекулы клаудина создают Na^+/Cl^- (зарядовую) селективность в ПК между эпителиальными клетками MDCK. Эти клетки были в 4—5 раз более проницаемы для Na^+ , чем для Cl^- (Colegio et al., 2002). В этой работе показано, что Na^+/Cl^- селективность в ПК возрастает при замене положительно заряженных аминокислотных остатков молекул клаудина в ПК отрицательно заряженными. Наоборот, Na^+/Cl^- селективность в ПК менялась на Cl^-/Na^+ селективность при замене отрицательно заряженных аминокислотных остатков клаудинов положительными. Анали-

зируя эти эксперименты, авторы (Colegio et al., 2002) сделали вывод о том, что молекулы клаудина, несущие отрицательно заряженные аминокислотные радикалы, создают каналы в ПК, обладающие свойством зарядовой селективности за счет электростатического вытеснения анионов из ПК между клетками.

Таким образом, в науке о трансэпителиальном транспорте возникла проблема, которая была сформулирована в виде вопроса следующим образом (Spring, 2002): «Какого вида структура может одновременно быть столь проницаема для крупных молекул и столь селективна для ионов?». Чтобы пропускать крупные макромолекулы, диаметр пор должен быть около 3 нм. Концентрация NaCl физиологического раствора c_0 составляет 0.15 М, при этом дебаевская длина в свободном объеме раствора равна 0.8 нм. Поэтому исследователи в этой области не понимают, как крупные поры могут создавать зарядовую селективность, им кажется, что в таких крупных порах не должно быть большой дискриминации Cl^- при $c_0 = 0.15$ М. Для объяснения этого была предложена модель системы пор большого и малого диаметров (Van Itallie, Anderson, 2004; Anderson, Van Itallie, 2009; Shen et al., 2011; Gunzel, Yu, 2013), согласно которой крупные нейтральные молекулы проходят через крупные поры, а ионы — через малые.

В действительности нет физических причин, по которым ионы не могут двигаться через крупные поры в ПК. Решение проблемы мы видим в том, что ПК между мемб-

рамами эпителиальных клеток представляют собой фазу, отличную от свободного раствора. Предсказания теории, развитой в более ранних работах (Rubashkin et al., 2005; Рубашкин, 2006; Fischbarg et al., 2006), сравнивались нами с экспериментальными данными другой работы (Sanchez et al., 2002) по связанному водно-солевому транспорту в ПК роговицы глаза кролика. В результате такого сопоставления было показано, что коэффициенты распределения ионов n между ПК и свободным раствором составляют около 0.2.

Качественное объяснение зарядовой селективности в плотных контактах состоит в следующем: поскольку величина n в них меньше единицы, дебаевская длина в ПК должна быть больше, чем в свободном растворе. Поэтому электростатическое воздействие заряженных аминокислотных остатков на ионы Na^+ и Cl^- распространяется в ПК на большие расстояния, и крупные поры в ПК также должны обладать зарядовой селективностью.

Целью нашей работы является расчет Na^+/Cl^- селективности в ПК между эпителиальными клетками методами нелокальной электростатики (НЭ), использующими полюсные модели диэлектрической функции воды без учета эффекта переэкранирования. Na^+/Cl^- селективность в этой системе определяется изменением энергий сольватации ионов при их переходе из свободного раствора в ПК, поэтому главной задачей является расчет этого изменения энергии сольватации. К этой системе мы будем применять методы НЭ, чтобы рассчитать изменение энергии сольватации ионов и их коэффициенты распределения между ПК и свободным раствором. Обзор методов НЭ можно найти в монографии Воротынцева и Корнышева (1993). Отметим, что раньше для анализа зарядовой селективности в узких каналах нами использовались формулы НЭ только для 2-модовой модели диэлектрической функции растворителя $\epsilon(k)$, где k — волновой вектор (Рубашкин, и др., 2015). В настоящей работе будет показано, что коэффициенты распределения ионов между свободным раствором и ПК значительно меньше единицы для расчетов по 1-, 2- и 3-модовым моделям $\epsilon(k)$. Отсюда следует, что в ПК должен быть эффект понижения концентраций ионов. В то же время в ПК есть эффект электростатического взаимодействия ионов с зарядами аминокислотных остатков макромолекул клаудина. Сочетание этих двух эффектов и приводит к возникновению зарядовой (Na^+/Cl^-) селективности в ПК.

Математическая модель Na^+/Cl^- селективности в плотных контактах между эпителиальными клетками

В этом разделе НЭ теория ионной сольватации (Kornyshev, 1981) применяется к моделированию Na^+/Cl^- селективности в ПК между эпителиальными клетками. Наш подход к этому электрохимическому явлению основывается на предположении о том, что механизм управления транспортом ионов в ПК определяется изменением энергии сольватации ионов, которую далее будем обозначать как δW , при их переходе из свободного раствора в ПК. В соответствии с теорией НЭ величина δW зависит как от радиусов ионов, так и от параметров воды в ПК (корреляционных длин, коротковолновой и статической диэлектрических проницаемостей), причем эти параметры для воды вокруг протеинов отличаются от объемных (Ebbinghaus et al., 2007). В ПК это приводит к диэлектрическому

исключению ионов из ПК, а в сочетании с электростатическим вытеснением Cl^- — к большой Na^+/Cl^- селективности в ПК.

Важным вопросом является выбор модели, которую следует использовать для расчета энергии сольватации иона. Ни одна из существующих в настоящее время моделей нелокальной электростатики не учитывает одновременно всех эффектов, что было отражено в нашей работе (Vorotyntsev, Rubashkin, 2017). Поэтому для приложений к ионному транспорту в ПК надо использовать различные модели НЭ и сравнить полученные результаты.

Величина δW в этих системах будет вычисляться по формулам теории НЭ, использующим 1-, 2- и 3-модовую модель $\epsilon(k)$. Вывод этих формул можно найти в монографии по НЭ (Воротынцев, Корнышев, 1993). В нашем случае локализации иона в середине ПК расстояние между ионом и ограничивающими стенками канала (2 нм) значительно больше радиусов ионов Na^+ и Cl^- , поэтому электростатическая энергия этих ионов состоит из двух слагаемых. Первое и большее из этих слагаемых определяется величиной δW иона из-за его перехода в среду с другими параметрами, поскольку корреляционная длина воды в ПК отличается от объемной. Второй и значительно меньший эффект, влияющий на энергетику иона в канале, обусловлен ролью ограничивающих стенок ПК. Для иона, находящегося в середине ПК, малость второго эффекта объясняется тем, что расстояние до мембраны ПК от иона (2 нм) значительно больше корреляционной длины воды в ПК, которая близка к 0.3 нм. Поэтому в дальнейшем мы будем считать, что изменение энергии сольватации иона при его переходе в ПК определяется только первым эффектом. Расчет второго эффекта дан в нашей работе ранее (Рубашкин и др., 2015).

Отметим, что теоретический результат для Na^+/Cl^- селективности в ПК представлен ниже в виде простых формул, содержащих только элементарные функции. Поэтому эти формулы удобно использовать для сравнения теоретических результатов с экспериментальными данными.

Расчет δW при переходе иона из свободного раствора в плотные соединения между эпителиальными клетками. Для расчета величин δW мы будем использовать методы НЭ. Приведем формулы для моделей нелокального диэлектрического отклика растворителя (заполняющего все пространство) $\epsilon(k)$. В литературе эти модели называются «приближениями нескольких (1, 2 или 3) дискретных мод» или «полюсными моделями». В этих формулах k — волновой вектор, ϵ_1 — ϵ_3 — диэлектрические проницаемости, а λ_1 — λ_3 — корреляционные длины, соответствующие электронным (индекс 1), инфракрасным (индекс 2) и дебаевским (индекс 3) степеням свободы. Численные значения диэлектрических проницаемостей для воды: $\epsilon_1 = 1.8$, $\epsilon_2 = 4.9$, $\epsilon_3 = \epsilon_s = 78$ (ϵ_s — статическая диэлектрическая проницаемость). Значения величин корреляционной длины: $\lambda_1 = 0.05$ нм, $\lambda_2 = 0.1$ нм.

Значение параметра λ_3 для воды, которая является корреляционной длиной в цепочках водородной связи в свободном растворе, равно $\lambda_3 = \Lambda_0 = 0.3$ нм. Значение этой корреляционной длины в ПК из-за наличия в них молекул клаудина отличается от Λ_0 в β раз ($1 < \beta < 2$). Обозначим эту величину как Λ_{TJ} , где нижний индекс TJ означает ПК (Tight Junction). При этом ее связь с Λ_0 имеет вид

$$\Lambda_{\text{TJ}} = \beta \Lambda_0. \quad (1)$$

Отметим, что приведенные ниже формулы для расчета δW можно применять как для свободного раствора, так и для ПК, если заменить в них параметр λ_3 для свободного раствора на корреляционную длину Λ_0 или на Λ_{TJ} для ПК, используя формулу (1).

Формулы для одно- и мультимодовых моделей диэлектрической функции растворителя. Приведем ниже различные модели зависимости диэлектрического отклика воды от модуля волнового вектора k , используемые в НЭ. Их подробное обсуждение можно найти в монографии Воротынцева и Корнышева (1993). Физически обоснованной является 3-модовая модель диэлектрической функции, для которой $\varepsilon(k)$ имеет вид

$$\frac{1}{\varepsilon_{3M}(k)} = 1 - \frac{1 - 1/\varepsilon_1}{1 + (k\lambda_1)^2} - \frac{1/\varepsilon_1 - 1/\varepsilon_2}{1 + (k\lambda_2)^2} - \frac{1/\varepsilon_2 - 1/\varepsilon_3}{1 + (k\lambda_3)^2}, \quad (2)$$

1- и 2-модовые модели являются приближенными вариантами модели (2). В 2-модовой модели (Kornyshev, Volkov, 1984) диэлектрический отклик имеет вид

$$\frac{1}{\varepsilon_{2M}(k)} = \frac{1}{\varepsilon_1} - \frac{1/\varepsilon_1 - 1/\varepsilon_2}{1 + (k\lambda_2)^2} - \frac{1/\varepsilon_2 - 1/\varepsilon_3}{1 + (k\lambda_3)^2}, \quad (3)$$

который получается в пренебрежении пространственной дисперсии электронной моды в формуле (2): $\lambda_1 = 0$. В 1-модовой (или 1-полюсной) модели диэлектрической функции, $\varepsilon_{1M}(k)$, согласно (Kornyshev, Sutmann, 1996), имеет вид

$$\frac{1}{\varepsilon_{1M}(k)} = \frac{1}{\varepsilon_2} - \left(\frac{1}{\varepsilon_2} - \frac{1}{\varepsilon_3} \right) \frac{1}{1 + (k\lambda_3)^2} \quad (4)$$

и отвечает нулевым длинам корреляции для электронной и инфракрасной мод в формуле (2): $\lambda_1 = \lambda_2 = 0$.

Формулы для расчета энергий δW . Приведем формулы для δW в теории Корнышева (Kornyshev, 1981; Kornyshev, Volkov, 1984) для модели, когда заряд иона равномерно распределен по поверхности сферы радиуса, совпадающего с радиусом иона (борновская модель иона). Энергия выражается через вспомогательную функцию $f(y_j)$, в которой аргумент y связан с радиусом иона r_i и корреляционными длинами λ_j ($j = 1, 2, 3$) как $y_j = 2r_i/\lambda_j$:

$$f(y_j) = 1 - [1 - \exp(-y_j)]/y_j. \quad (5)$$

В настоящей работе корреляционная длина воды λ_3 является единственным параметром, который меняется при переходе иона в ПК. Для 3-модовой модели диэлектрической функции $\varepsilon(k)$ (формула (2)) энергия сольватации иона (W_{3M}) зависит от радиуса иона r_i и от корреляционной длины λ_3 как

$$W_{3M}(r_i, \lambda_3) = (e^2/2r_i)[C_1 f(2r_i/\lambda_1) + C_2 f(2r_i/\lambda_2) + C_3 f(2r_i/\lambda_3)], \quad (6)$$

где e — заряд электрона, r_i — радиус иона, который выбирается по шкале (Gourary, Adrian, 1960), а коэффициенты C_i ($i = 1, 2, 3$) определяются через диэлектрические константы ε_i :

$$C_1 = 1 - 1/\varepsilon_1 = 0.444; \quad C_2 = 1/\varepsilon_1 - 1/\varepsilon_2 = 0.352;$$

$$C_3 = 1/\varepsilon_2 - 1/\varepsilon_3 = 0.191. \quad (7)$$

Значения параметров ε_i в формуле (7) такие же, как и для диэлектрической функции (2). Согласно Корнышеву и Волкову (Kornyshev, Volkov, 1984), в 2-модовой модели $\varepsilon_{2M}(k)$ имеет вид (3), а энергия сольватации (W_{2M}) зависит от радиуса иона r_i :

$$W_{2M}(r_i, \lambda_3) = (e^2/2r_i)[C_1 + C_2 f(2r_i/\lambda_2) + C_3 f(2r_i/\lambda_3)]. \quad (8)$$

Для 1-модовой модели диэлектрической функции (4) энергия сольватации имеет вид

$$W_{1M}(r_i, \lambda_3) = (e^2/2r_i)\{C_1 + C_2 + C_3 f(2r_i/\lambda_3)\}. \quad (9)$$

Формулы для δW при переходе иона в ПК и коэффициентов распределения ионов между ПК и свободным раствором. Изменение стандартного химического потенциала иона при его переходе из свободного раствора в ПК равно δW :

$$\delta W(r_i, \Lambda_{TJ}) = W(r_i, \Lambda_0) - W(r_i, \Lambda_{TJ}). \quad (10)$$

Корреляционная длина Λ_{TJ} в ПК больше, чем $\Lambda_0 = \lambda_3$ в свободном растворе, из-за наличия в них белковых макромолекул клаудина. Энергия сольватации в ПК (W_{TJ} , формулы (6), (8) и (9)) зависит от радиуса иона и от корреляционной длины Λ_{TJ} в ПК, которая связана с корреляционной длиной Λ_0 в свободном растворе по формуле (1). Используя формулу (6) в выражении (10), получим для расчетов изменения энергии сольватации по 3-модовой модели $\varepsilon(k)$, а также для 2-модовой или 1-модовой модели $\varepsilon(k)$ (формулы (8), (9)) одинаковые выражения:

$$\begin{aligned} \delta W_{1M}(r_i, \beta) &= \delta W_{2M}(r_i, \beta) = \\ &= \delta W_{3M}(r_i, \beta) = [e^2/2r_i] C_3 g(r_i, \beta), \end{aligned} \quad (11)$$

где вспомогательная функция g определяется формулой

$$g(r_i, \beta) = f(2r_i/\Lambda_0) - f(2r_i/[\beta\Lambda_0]),$$

в которой функция f была определена соотношением (5). Коэффициенты распределения иона между ПК и свободным раствором связываются с величиной δW :

$$n(r_i, \beta) = \exp[-\delta W(r_i, \beta)/k_B T], \quad (12)$$

где k_B — постоянная Больцмана, а T — абсолютная температура.

Пользуясь формулами (11) и (12), определим коэффициенты распределения Na^+ и Cl^- и их энергии пересольватации с помощью соотношений

$$n_{\text{Na}}(\beta) = n(r_{\text{Na}}, \beta); \quad n_{\text{Cl}}(\beta) = n(r_{\text{Cl}}, \beta);$$

$$\delta W_{\text{Na}}(\beta) = \delta W(r_{\text{Na}}, \beta); \quad \delta W_{\text{Cl}}(\beta) = \delta W(r_{\text{Cl}}, \beta). \quad (13)$$

Расчет Na^+/Cl^- селективности в ПК. Из условия равенства электрохимических потенциалов

ионов в свободном растворе и в ПК получим выражения для их концентраций в ПК

$$\begin{aligned} c_{\text{Na}}^{\text{ТJ}} &= n_{\text{Na}} c_o \exp(-e\phi_{\text{ТJ}}/k_B T); \\ c_{\text{Cl}}^{\text{ТJ}} &= n_{\text{Cl}} c_o \exp(e\phi_{\text{ТJ}}/k_B T). \end{aligned} \quad (14)$$

Запишем условие электронейтральности в плотных контактах как

$$c_{\text{Na}}^{\text{ТJ}} + [\text{NH}_3^+] = c_{\text{Cl}}^{\text{ТJ}} + [\text{COO}^-], \quad (15)$$

где квадратными скобками обозначены концентрации положительно и отрицательно заряженных фиксированных центров, обусловленных диссоциацией аминокислотных остатков макромолекул клаудина. Подставляя выражения для концентраций из (14) в (15) и решая уравнение (15) относительно потенциала, получим для него следующую формулу:

$$\phi_{\text{ТJ}} = -(kT/e) \ln \{ X_f / (2n_{\text{Na}}) + [(X_f / (2n_{\text{Na}}))^2 + n_{\text{Cl}} / n_{\text{Na}}]^{1/2} \}, \quad (16)$$

в которую введена безразмерная результирующая концентрация X_f фиксированных отрицательно заряженных центров по отношению к концентрации c_o в свободном растворе:

$$X_f = ([\text{COO}^-] - [\text{NH}_3^+]) / c_o, \quad c_o = 0.15 \text{ M}, \quad (17)$$

причем величина X_f положительна, если преобладают отрицательно заряженные центры. Величины n_{Na} , n_{Cl} в формуле (16) рассчитываются по выражениям (12) и (13). Отношение потоков Na^+ и Cl^- в плотных контактах имеет вид

$$J_{\text{Na}}^{\text{ТJ}} / J_{\text{Cl}}^{\text{ТJ}} = (D_{\text{Na}}^{\text{ТJ}} / D_{\text{Cl}}^{\text{ТJ}}) (c_{\text{Na}}^{\text{ТJ}} / c_{\text{Cl}}^{\text{ТJ}}), \quad (18)$$

где в первых скобках — отношение коэффициентов диффузии ионов в ПК. Поскольку электрический ток через монослой эпителиальных клеток вызывается транс-эпителиальной разностью электрических потенциалов, притом что концентрации ионов по обе стороны монослоя эпителиальных клеток одинаковы, в формуле (18) речь идет о миграционных потоках. В экспериментальной литературе по транспорту ионов в ПК (Colegio et al., 2002) в качестве меры Na^+/Cl^- селективности используется величина $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ (отношение проницаемостей ПК), которая считается равной отношению потоков (18). Получим для этой величины формулу (19), подставив в (18) концентрации ионов из соотношения (14), а отношение коэффициентов диффузии в плотных контактах будем считать равным их отношению для свободного раствора, которое, согласно Сухотину (1981), равно 0.66.

$$P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}} = 0.66 \exp[(\delta W_{\text{Cl}} - \delta W_{\text{Na}} - 2e\phi_{\text{ТJ}}) / k_B T]. \quad (19)$$

Величины δW в формуле (19) рассчитываются по формуле (11), а $\phi_{\text{ТJ}}$ по формуле (16).

Результаты расчета Na^+/Cl^- селективности ПК эпителиальных клеток

Для всех расчетов, представленных на рис. 1—5, мы использовали полные модели диэлектрической функции растворителя (формулы (2)—(4)). Все расчеты выполнены для корреляционной длины в свободном растворе $\Lambda_o = 0.3$ нм. Поскольку величины δW , рассчитанные по 1-, 2- и 3-полюсным моделям (рис. 1, а), в соответствии с формулой (11) одинаковы, и другие характеристики системы, зависящие от δW (рис. 1, б; 2—5), такие как коэффициенты распределения ионов, электростатический потенциал в ПК, а также зарядовая селективность, не зависят от выбора числа полюсов модели.

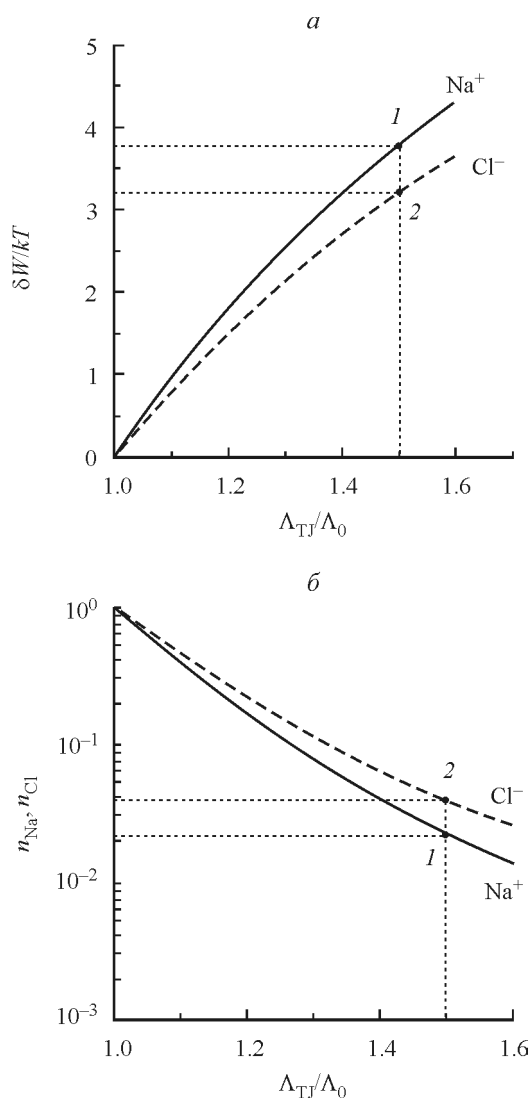


Рис. 1. Зависимости изменения энергии сольватации δW (в единицах $k_B T$) и коэффициентов распределения n_{Na} и n_{Cl} ионов Na^+ и Cl^- при их переходе из свободного раствора в плотный контакт (ПК) между эпителиальными клетками от изменения корреляционной длины Λ_{TJ} в ПК.

а — величины δW рассчитаны по 1-, 2- и 3-модельным $\epsilon(k)$ (формула (11) в тексте), как и для всех рисунков ниже; б — величины n_{Na} и n_{Cl} для Na^+ и Cl^- рассчитываются по формуле (13) (см. текст). Сплошные кривые 1 соответствуют Na^+ , штриховые 2 — для Cl^- . Расчет выполнен для корреляционной длины в свободном растворе $\Lambda_o = 0.3$ нм, как и для всех других рисунков.

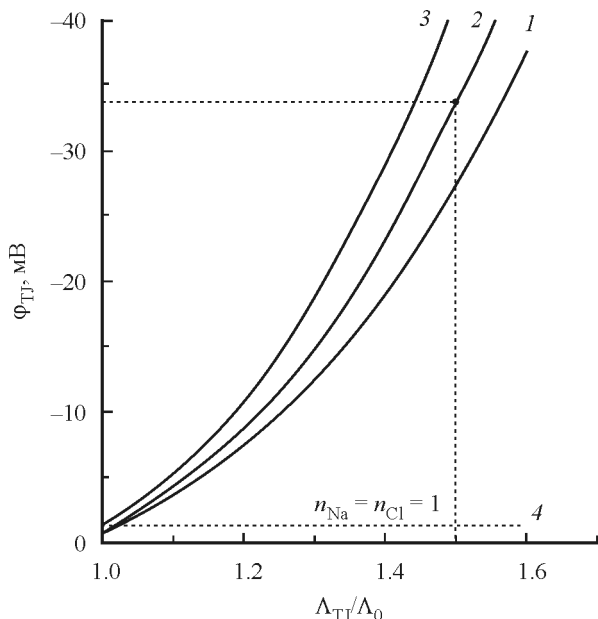


Рис. 2. Зависимости изменения электростатического скачка потенциала $\varphi_{ТJ}$ между ПК и свободным раствором от изменения корреляционной длины $\Lambda_{ТJ}$ в ПК, рассчитанные по формуле (16) для различных значений параметра X_f : 0.05 для кривой 1, 0.07 для кривой 2, 0.1 для кривой 3.

Штриховая горизонтальная линия 4 соответствует потенциалу, рассчитанному по формуле (16) при $X_f = 0.1$ и $n_{Na} = n_{Cl} = 1$. Параметр X_f определяется по формуле (17) — это относительная результирующая концентрация фиксированных отрицательно заряженных аминокислот в ПК.

Для данных, приведенных на рис. 1, а, δW рассчитывали по формулам (10) и (11). Зависимости δW в единицах $k_B T$ при переходе иона из свободного раствора в ПК от изменения корреляционной длины $\Lambda_{ТJ}$ в ПК представлены на рис. 1, а. Как видно на этом рисунке, энергии пересольватации δW_{Na} и δW_{Cl} увеличиваются с ростом $\Lambda_{ТJ}$ для расчета по всем моделям $\epsilon(k)$, в то время как коэффициенты распределения n_{Na} и n_{Cl} ионов Na^+ и Cl^- в ПК (рис. 1, б), рассчитанные по формулам (12) и (13), уменьшаются с ростом $\Lambda_{ТJ}$. Отношение корреляционных длин $\beta = \Lambda_{ТJ}/\Lambda_0$, при котором рассчитанная по формуле (19) величина Na^+/Cl^- селективности в ПК совпадает с экспериментально найденной (Colegio et al., 2002), равна 1.5 для расчета по всем моделям $\epsilon(k)$.

На рис. 1, а нанесены точки на кривых 1 и 2, которые соответствуют изменению энергий сольватации $\delta W_{Na} = 3.77 kT$, $\delta W_{Cl} = 3.22 kT$ и коэффициентам распределения $n_{Na} = 0.022$, $n_{Cl} = 0.04$ (рис. 1, б). Следствием этого роста энергий пересольватации δW в ПК и уменьшения коэффициентов распределения ионов в ПК являются значительное увеличение дебаевской длины экранирования в ПК и уменьшение концентраций ионов в них, что приводит к возникновению значительной Na^+/Cl^- селективности, которая будет обсуждаться ниже.

На рис. 2 показано изменение разницы электростатических потенциалов $\varphi_{ТJ}$ между ПК и свободным раствором. Изменение электростатического потенциала при увеличении корреляционной длины $\Lambda_{ТJ}$ в ПК рассчитывалось по формуле (16) для трех значений параметра X_f , определенного по формуле (17). Параметр X_f — это разность относительных концентраций отрицательно и положительно заряженных аминокислотных остатков в мо-

лекулах клаудина, находящихся в ПК. Потенциал $\varphi_{ТJ}$ растет по абсолютной величине при увеличении $\Lambda_{ТJ}$, а также растет с увеличением концентрации X_f , как это видно из рис. 2. Электростатический потенциал $\varphi_{ТJ}$, соответствующий точке на кривой 2, для которой параметры равны: $X_f = 0.07$ и $\Lambda_{ТJ}/\Lambda_0 = 1.5$, равен: $\varphi_{ТJ} = -33.7$ мВ. Потенциал, рассчитанный по формуле (16) для параметров $n_{Na} = n_{Cl} = 1$ и для максимальной концентрации, соответствующей кривой 3 ($X_f = 0.1$), показан штриховой горизонтальной линией 4 и равен -1.3 мВ. Подчеркнем, что в отличие от $\varphi_{ТJ}$ этот потенциал не зависит от корреляционной длины в ПК. Увеличение потенциала $\varphi_{ТJ}$, показанное на рис. 2, в соответствии с формулой (16) приводит к возникновению значительной Na^+/Cl^- селективности в ПК.

Подставив определенные выше коэффициенты распределения n_{Na} и n_{Cl} , а также значение электростатического потенциала в формулы (14), получим значения относительных концентраций Na^+ и Cl^- в ПК по отношению к концентрации в свободном растворе:

$$c_{Na}/c_0 = 0.022 \exp[-33.7(\text{мВ})e/k_B T] = 0.078,$$

$$c_{Cl}/c_0 = 0.04 \exp[33.7(\text{мВ})e/k_B T] = 0.011. \quad (20)$$

Из этих расчетов видно, что концентрация Na^+ в ПК значительно превышает таковую Cl^- .

На рис. 3 приведена зависимость отношения проницаемостей P_{Na}/P_{Cl} в ПК между эпителиальными клетками для ионов Na^+ и Cl^- от изменения корреляционной длины $\Lambda_{ТJ}$ в них, а на рис. 4 — от изменения результирующей

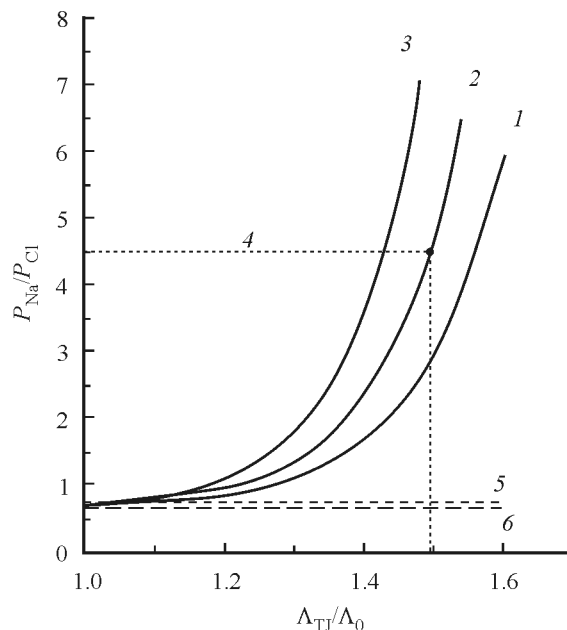


Рис. 3. Зависимость отношения проницаемостей P_{Na}/P_{Cl} ионов Na^+ и Cl^- в ПК между эпителиальными клетками от изменения корреляционной длины $\Lambda_{ТJ}$ в них.

Величина P_{Na}/P_{Cl} рассчитана по формуле (19). Значения параметра X_f для кривых 1—3 указаны в подписи к рис. 1, а. Пунктирная горизонтальная линия 4 соответствует экспериментально измеренной (см.: Colegio et al., 2002) величине P_{Na}/P_{Cl} для ПК клеток MDCK. Штриховая линия 5 рассчитана по формуле (19) при $X_f = 0.1$ и соответствует P_{Na}/P_{Cl} , когда n_{Na} и n_{Cl} равны 1. Пунктирная горизонтальная линия 6 соответствует случаю, когда нет Na^+/Cl^- селективности в ТЖ. При этом отношение проницаемостей $P_{Na}/P_{Cl} = 0.66$ равно отношению коэффициентов диффузии Na^+ и Cl^- .

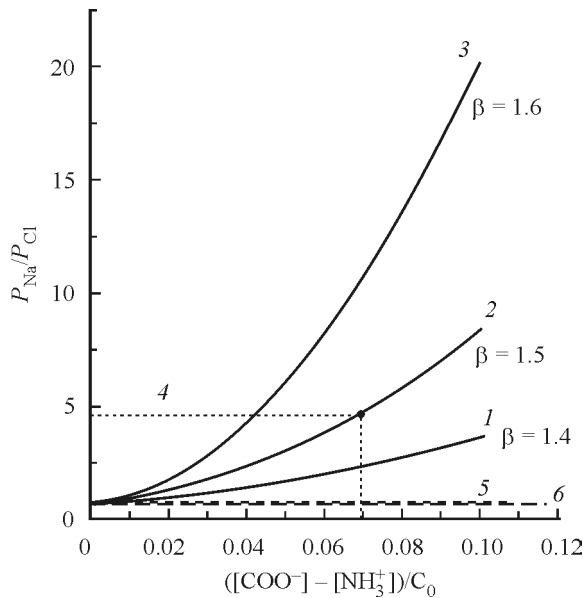


Рис. 4. Зависимость Na^+/Cl^- селективности $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ от изменения относительной результирующей концентрации X_f отрицательно заряженных аминокислотных остатков в ПК.

Величина $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ рассчитана по формуле (19). Значения параметра $\beta = \Lambda_{\text{TJ}}/\Lambda_0$, при котором построены кривые 1–3, равны 1.4, 1.5 и 1.6 соответственно. Горизонтальные линии 4–6 соответствуют описанию на рис. 3.

концентрации X_f фиксированных отрицательных зарядов. Величина $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ рассчитана по формуле (19), в которой электростатический потенциал в ПК вычисляется по формуле (16), а коэффициенты распределения ионов n_{Na} и n_{Cl} — по формулам (12) и (13). Отношение $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ растет как с ростом корреляционной длины в ПК, так и с увеличением концентрации X_f , как это видно на рис. 3 и 4. Горизонтальные пунктирные линии 4 на рис. 3 и 4 соответствуют экспериментально определенной величине $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}} = 4.5$ для ПК клеток MDCK (Colegio et al., 2002). На рис. 3 нанесена штриховая линия 5, которая соответствует величине $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}} = 0.73$, вычисленной по формуле (19) для $X_f = 0.1$ при условии $n_{\text{Na}} = n_{\text{Cl}} = 1$, что означает очень слабую дискриминацию Cl^- по сравнению с Na^+ .

Таким образом, увеличение корреляционной длины воды в ПК по сравнению с ее величиной в свободном растворе приводит к возникновению энергии пересольватации ионов при их переходе в ПК, как это видно на рис. 1, а. Следствием этого является значительная дискриминация Cl^- по сравнению с Na^+ , при условии что в ПК находятся отрицательно заряженные аминокислотные остатки молекул клаудина. Далее мы будем сравнивать теоретические результаты, представленные выше, с экспериментальными данными опубликованной работы (Colegio et al., 2002).

В работе из литературы (Anderson, Van Itallie, 2009) приведена таблица значений отношения проницаемостей плотных контактов $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ для эпителиальных клеток различных типов, согласно которой разброс $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ составляет от 0.6 до 10. При этом ПК, для которых $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}} > 0.66$, считаются катион-селективными, поскольку отношение коэффициентов диффузии Na^+ и Cl^- в свободном растворе равно 0.66. Приведенные на рис. 3–5 данные по расчету Na^+/Cl^- селективности покрывают этот экспериментальный интервал. На рис. 3 и 4 пунктирная

линия 6, а на рис. 5 сплошная линия 3 соответствуют этой величине 0.66. Относительная концентрация X_f заряженных аминокислотных остатков в ПК равна: $X_f = 0.07$ (кривая 2 на рис. 3), что соответствует данным из литературы (Van Itallie, Anderson, 2004) по топологии размещения заряженных аминокислотных остатков молекул клаудина в ПК.

Было показано (Colegio et al., 2002), что белковые молекулы клаудина создают Na^+/Cl^- селективность в ПК между эпителиальными клетками. Изучаемые ПК клеток MDCK были в 4.5 раза более проницаемы для Na^+ , чем для Cl^- . Точки на кривых на рис. 3 и 4 соответствуют этой величине. Повышение концентрации фиксированных отрицательно заряженных аминокислот в ПК путем замены положительно заряженной аминокислоты отрицательно заряженной (мутация K65D) привело к увеличению Na^+ проницаемости в ПК по сравнению с Cl^- . Сплошные кривые на рис. 3 и 4, построенные с учетом изменения энергии сольватации ионов при их переходе в ПК, соответствуют этому выводу. Штриховые линии 5 на этих рисунках, рассчитанные по формуле (19) в предположении, что энергия сольватации не меняется ($n_{\text{Na}} = n_{\text{Cl}} = 1$), показывают, что в этом случае селективность мала.

В экспериментах по замене отрицательно заряженных аминокислотных остатков положительно заряженными в позициях первого домена клаудина-15 было показано, что такая замена обращала зарядовую селективность в ПК от Na^+ к Cl^- . (Colegio et al., 2002). Переход на рис. 5 от кривой 1 к кривой 4 иллюстрирует смену катионной селективности ПК на анионную при изменении знака заряда аминокислотных остатков в ПК. При этом концентрации

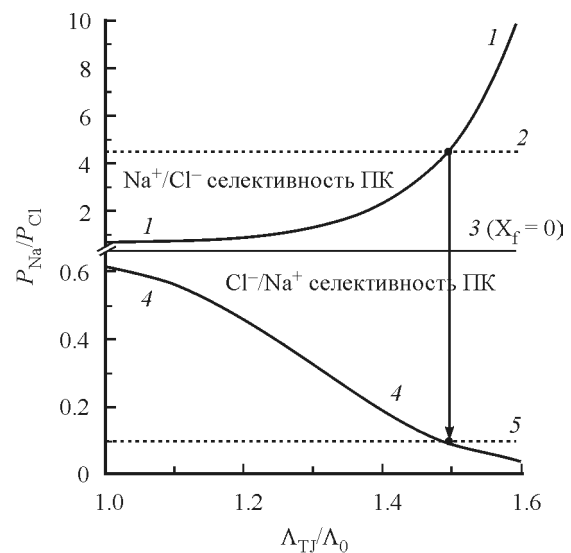


Рис. 5. Зависимость Na^+/Cl^- селективности $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ от изменения корреляционной длины Λ_{TJ} в ПК для случаев, когда в них находятся отрицательные (кривая 1) и положительные (кривая 4) фиксированные заряженные центры.

Корреляционная длина в свободном растворе $\Lambda_0 = 0.3$ нм. Значения параметра X_f : $X_f = 0.07$ для кривой 1 и $X_f = -0.07$ для кривой 4. Величина $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ рассчитана по формуле (19). При этом для кривых 1 и 4 изменения энергий сольватации рассчитаны по формулам (10) и (11) и соответствуют 1-, 2- и 3-модовой моделям $\epsilon(k)$. Пунктирные горизонтальные линии 2 и 5 соответствуют экспериментально измеренным величинам $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ для плотных контактов клеток MDCK (Colegio et al., 2002). Сплошная горизонтальная линия 3 соответствует случаю, когда нет Na^+/Cl^- селективности плотных контактов. При этом отношение проницаемостей равно отношению коэффициентов диффузии Na^+ и Cl^- ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}} = 0.66$).

заряженных аминокислотных остатков в ПК одинаковы для кривых 1 и 4 (0.07C₀). Для кривой 1 это отрицательные фиксированные заряды в плотных контактах, а для кривой 4 — положительные. Область выше *штриховой горизонтальной линии 3* на рис. 5 соответствует случаю, когда плотные контакты более проницаемы для Na⁺, а область ниже *линии 3*, наоборот, когда они более проницаемы для Cl⁻. Расчеты были выполнены по 1-, 2- и 3-модовым моделям $\epsilon(k)$, как и данные, приведенные на предыдущих рисунках.

З а к л ю ч е н и е. Проведенный в данной статье анализ показывает, что фундаментальной причиной значительной величины эффекта дискриминации Cl⁻ по сравнению с Na⁺ в ПК является наличие большого энергетического барьера для входа ионов из раствора внутрь ПК, который обусловлен уменьшением их энергий сольватации в ПК за счет изменения локального значения корреляционной длины воды. Результирующее понижение ионных концентраций резко усиливает эффект поля, создаваемого заряженными группами в ПК. В частности, при отрицательной величине их заряда отношение локальных концентраций ионов Cl⁻ и Na⁺ (0.011 для Cl⁻ и 0.078 для Na⁺ по отношению к их концентрациям в растворе, как это видно из формулы (20)) становится малой величиной, что и приводит к преимущественному потоку ионов натрия в этом случае.

В работе представлено количественное описание явления смены Na⁺/Cl⁻ селективности на Cl⁻/Na⁺ селективность при изменении знака суммарного заряда аминокислотных остатков в ПК. Расчет Na⁺/Cl⁻ и Cl⁻/Na⁺ селективностей внутри ПК методами НЭ теории с 1-, 2- и 3-модовой моделями диэлектрической функции приводит к одинаковым результатам. Выполненные расчеты показывают значительный рост Na⁺/Cl⁻ селективности в ПК при увеличении как концентрации отрицательно заряженных аминокислотных остатков молекул клаудина, так и корреляционной длины воды в ПК. Рассчитанное значение селективности совпадает с экспериментальными результатами работы из литературы (Colegio et al., 2002) при увеличении корреляционной длины воды в ПК в 1.5 раза по сравнению с ее значением в свободном растворе.

Приведенные в настоящей работе расчеты являются первой попыткой оценить зарядовую селективность в плотных соединениях между эпителиальными клетками. В дальнейшем для расчета изменения энергии сольватации и ионной селективности в ПК надо использовать более сложные модели, учитывающие как эффект переэкранирования диэлектрической функции растворителя (Kornyshev, Sutmann, 1996; Rubashkin, Vorotyntsev, 2016), так и эффект вырезания растворителя из объема, занятого ионом (Vorotyntsev, 1978; Vorotyntsev, Rubashkin, 2017).

Список литературы

Vorotyntsev M. A., Kornyshev A. A. 1993. Электростатика сред с пространственной дисперсией. М.: Наука. 240 с. (Vorotyntsev M. A., Kornyshev A. A. 1993. Electrostatics of media with spatial dispersion. Moscow: Nauka. 240 p. (Russ.))
 Рубашкин А. А. 2006. Модель электроосмоса для случая протекания жидкости в плотных контактах эпителиальных клеток. Докл. РАН. 407 (3) : 408—410. (Rubashkin A. A. 2006. A model of electro-osmosis in a leaky tight junction of epithelial cells. Dokl. Biochem. Biophys. 407 (3) : 71—73.)

Рубашкин А. А., Конев Д. В., Цыганов А. Б. 2015. Моделирование ионного транспорта в нанометровых каналах с заряженными макромолекулами клаудина: нелокально-электростатический подход. Электрохимическая энергетика. 15 (4) : 149—159. (Rubashkin A. A., Konev D. V., Tsyganov A. B. 2015. Modelling of ion transport in nanometric channels with charge claudin macromolecules: nonlocal electrostatic approach. Electrochemical Energetics. 15 (4) : 149—159. (Russ.))

Сухотин А. М. (ред.). 1981. Справочник по электрохимии. Л.: Химия. 486 с. (Sukhotin A. M. (Ed.). 1981. Guide to electrochemistry. Leningrad: Khimiya. 486 p. (Russ.))

Anderson J. M., Van Itallie C. M. 2009. Physiology and function of the tight junction. Cold Spring Harb Perspect. Biol. 1 : a002584-1—a002584-16.

Colegio O. R., Van Itallie C. M., McCrea H. J., Rahner C., Anderson J. M. 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 283 : C142—C147.

Ebbinghaus S., Kim S. J., Heyden M., Yu X., Heugen U., Greubele M., Leitner D. M., Havenith M. 2007. An extended dynamical hydration shell around proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104 (52) : 20 749—20 752.

Fischbarg J., Dikce F. P., Iserovich P., Rubashkin A. A. 2006. The role of the tight junction in paracellular fluid transport across corneal endothelium. electro-osmosis as a driving force. J. Membr. Biol. 210 : 117—130.

Gourary B. S., Adrian F. J. 1960. Wave functions for electron-excess color centers in alkali halide crystals. Solid State Phys. 10 : 127—247.

Günzel D., Yu A. S. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol. Rev. 93 : 525—569.

Kornyshev A. A. 1981. On the evaluation of standard Gibbs energies of ion transfer between two solvents. Electrochim. Acta. 26 : 1—27.

Kornyshev A. A., Sutmann G. 1996. The shape of the nonlocal dielectric function of polar liquids and the implications for thermodynamic properties of electrolytes: a comparative study. J. Phys. Chem. 104 : 1524—1625.

Kornyshev A. A., Volkov A. G. 1984. On the evaluation of standard Gibbs energies of ion transfer between two solvents. J. Electroanal. Chem. 180 : 363—381.

Rubashkin A. A., Iserovich P., Hernandez J. A., Fischbarg J. 2005. Epithelial fluid transport: protruding macromolecules and space charges can bring about electro-osmotic coupling at the tight junctions. J. Membr. Biol. 208 : 251—263.

Rubashkin A. A., Vorotyntsev M. A. 2016. Electrostatic contribution to the ion solvation energy: overscreening effect in the nonlocal dielectric response of the polar medium. Curr. Phys. Chem. 6 : 120—129.

Sánchez J. M., Li Y., Rubashkin A., Iserovich P., Wen Q., Ruberti J. W., Smith R. W., Rittenband D., Kuang K., Diecke F. P. J., Fischbarg J. 2002. Evidence for a central role for electro-osmosis in fluid transport by corneal endothelium. J. Membr. Biol. 187 : 37—50.

Shen L., Weber C. R., Raleigh D. R., Yu D., Turner J. R. 2011. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. Annu. Rev. Physiol. 73 : 283—309.

Spring K. R. 2002. Focus on «Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells». Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 283 : C29—C30.

Van Itallie C. M., Anderson J. M. 2004. The molecular physiology of tight junction pores. Physiology. 19 : 331—338.

Vorotyntsev M. A. 1978. Model nonlocal electrostatics. II. Spherical interface. J. Phys. C: Solid State Physics. 11 : 3323—3331.

Vorotyntsev M. A., Rubashkin A. A. 2017. Electrostatic contribution to the ion solvation energy: cavity effects. Phys. Chem. Liq. 55 : 141—152.

CALCULATION OF Na^+/Cl^- SELECTIVITY IN TIGHT JUNCTIONS BETWEEN EPITHELIAL CELLS
BY METHODS OF NONLOCAL ELECTROSTATICS WITH POLE MODELS
OF DIELECTRIC FUNCTION WITHOUT OVER SCREENING EFFECT

A. A. Rubashkin^{1, *} *P. Iserovich*²

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

² SUNY Downstate Medical Center, New York, USA;

* e-mail: andrey.rubashkin@gmail.com

A mathematical model of Na^+/Cl^- selectivity in tight junction (TJ) between epithelial cells was developed. It is shown that Na^+/Cl^- selectivity in TJ depends on the total charge of amino acid residues of claudin macromolecules inside TJ, as well as on the ion distribution coefficients between TJ and free solution. It is shown that when the sign of the total charge of amino acid residues in TJ changes, the obtained formulas predict the change of Na^+/Cl^- selectivity in TJ to Cl^-/Na^+ selectivity. The calculated value of Na^+/Cl^- selectivity coincides with the experimental data for MDCK cells, which is available in the literature on epithelial transport. To calculate the change in the ion solvation energy upon their transition to TJ, non-local electrostatics formulas with one, two and three-pole models of the dielectric function were used without taking into account the overscreening effect.

Key words: Na^+/Cl^- selectivity, tight junctions, epithelial cells, charge of claudin macromolecules, pole model of dielectric function.
