

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

М.П. Евстигнеев, О.С. Завьялова, Е.В. Савченко

БИОФИЗИКА МЕМБРАН

Учебное пособие

Севастополь

СевГУ

2019

УДК 577.352(075.8)
ББК 28.071я73
Е26

Р е ц е н з е н т:

Н.В. Петренко – кандидат физико-математических наук, доцент

Евстигнеев М.П.

Е26 Биофизика мембран: учеб. пособие / М.П. Евстигнеев, О.С. Завьялова, Е.В. Савченко. – Севастополь: СевГУ, 2019. – 59 с.

В пособии детально рассматриваются процессы, проходящие внутри клеточной мембраны. В полной мере освещены вопросы структуры и процессов функционирования биологических мембран. Рассмотрены молекулярные механизмы ионных каналов и их функционирования.

Пособие предназначено для обучающихся в магистратуре. Предполагается, что студентами достаточно полно на высоком уровне освоены такие разделы физики как «Молекулярная физика и термодинамика», «Электричество и магнетизм», также общая химия, физическая химия, биоорганическая химия; физика биополимеров; общая биофизика и биология.

Учебное пособие составлено в соответствии с программой дисциплины «Физика» для ГОС 3-го поколения.

Учебное пособие рассмотрено и утверждено на заседании кафедры «Физика», протокол № 6 от 28 февраля 2019 г.

Учебное пособие рассмотрено и утверждено на заседании ученого совета Института радиоэлектроники и информационной безопасности, протокол № 7 от 13 марта 2019 г.

ВВЕДЕНИЕ

РАЗДЕЛ 1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БИОМЕМБРАН.....	5
1.1 Основные функции биомембран.....	6
1.2 Состав биомембран.....	6
1.3 Современные представления о структуре биомембран.....	9
1.4 Образование мембранных структур. Мицеллы. Монослой.....	11
1.5 Фазовые переходы липидов в мембранах.....	13
 РАЗДЕЛ 2. ТЕРМОДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ ФОРМИРОВАНИЯ И УСТОЙЧИВОСТИ МЕМБРАН.....	 16
2.1 Поверхностная активность, работа адсорбции.....	16
2.2 Термодинамика равновесия мембран.....	17
2.3 Особенности межмолекулярных взаимодействий в биомембране.....	19
 РАЗДЕЛ 3. МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОМЕМБРАН.....	 22
3.1. Подвижность молекулярных компонентов.....	22
3.2. Упругие свойства биомембран.....	23
3.3 Механизм разрушения липидного бислоя.....	25
3.4 Дефект типа сквозной поры. Модель критической поры.....	26
 РАЗДЕЛ 4. ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОЛЕЙ НА БИОМЕМБРАНЫ..	 29
4.1. Электропробой биомембраны.....	29
4.2. Пробой как следствие локальных дефектов и электропорация.....	31
4.3. Действие переменного электрического поля на биомембране.....	32

РАЗДЕЛ 5. ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В МЕМБРАННЫХ СИСТЕМАХ.....	33
5.1 Механизм фазового перехода в биомембране. Гипотеза петли.....	33
5.2 Подвижность углеводородных звеньев в биомембране. Диффузия кинков.....	35
5.3 Термодинамические параметры фазовых переходов.....	37
5.4 Доменная структура при фазовом переходе. Гистерезис.....	38
 РАЗДЕЛ 6. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ	
6.1 Общее представление о транспорте веществ через биологические мембраны. Электрохимический потенциал.....	41
6.2 Пассивный перенос веществ через биологические мембраны. Классификация веществ пассивного транспорта.....	42
6.3 Простая диффузия через биологические мембраны. Пассивный транспорт неэлектролитов.....	43
6.4 Пассивный транспорт неэлектролитов. Облегченная диффузия.....	47
6.5 Фильтрация и осмос.....	48
6.6 Пассивный транспорт ионов через биомембрану. Энергетика гидратации ионов.....	49
6.7 Заряженные биомембраны. Двойной электрический слой.....	51
6.8 Решение уравнения Нернста – Планка для заряженных БМ. Приближение постоянного поля для пассивного транспорта электролитов.....	53
6.9 Вольт-амперные характеристики биомембраны в теории постоянного электрического поля.....	54
6.10 Ионные каналы.....	55
 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	59

ВВЕДЕНИЕ

Пособие содержит шесть разделов: Молекулярная организация биомембран; Термодинамика процессов формирования и устойчивости биомембран; Механические свойства биомембран; Влияние электрических полей на биомембраны; Фазовые переходы в мембранных системах; Транспорт веществ через биологические мембраны. Таким образом, детально рассматриваются процессы, проходящие внутри клеточной мембраны. В полной мере освещены вопросы структуры и процессов функционирования биологических мембран. Рассмотрены молекулярные механизмы ионных каналов и их функционирования.

Пособие предназначено для обучающихся в магистратуре. Предполагается, что студентами достаточно полно на высоком уровне освоены такие разделы физики как «Молекулярная физика и термодинамика», «Электричество и магнетизм», также общая химия, физическая химия, биоорганическая химия; физика биополимеров; общая биофизика и биология.

Излагаемый в учебном пособии материал четко структурирован, каждая тема сопровождается пояснительными рисунками. Авторы будут благодарны за пожелания к содержанию и оформлению пособия.

РАЗДЕЛ 1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БИОМЕМБРАН

1.1 Основные функции биомембран

Биомембраны – (от лат. *membrana* – оболочка, кожа) – поверхностные структуры молекулярного размера – в среднем 8-12 нм – отграничивающие клетку от внешней среды или отграничивающие внутриклеточные органеллы/частицы от цитоплазмы. Если биомембрана отделяет клетку от внешней среды, то биомембрана может быть поверхностной, наружной, плазматической. Если биомембрана отделяет внутриклеточные органеллы, то может быть ядерной, митохондриальной, лизосомальной и др.

Три основные функции биомембран:

- барьерная (обеспечивает обмен веществ с окружающей средой). Обмен может быть селективный, регулируемый, пассивный и активный;
- матричная – обеспечивает определенное взаимное положение и ориентацию мембранных белков, соответствующую оптимуму взаимодействия;
- механическая – обеспечивает прочность и целостность клетки.

Кроме этого биомембраны выполняют и другие функции:

- энергетическая (синтез АТФ на внутренних мембранах митохондрий и фотосинтез в мембранах хлоропластов);
- генерация и проведение биопотенциалов;
- рецепторная (механическая, обонятельная, зрительная, акустическая и пр.)

Общая площадь биомембран в организме человека примерно несколько десятков тысяч квадратных метров (больше 50% массы клеток).

1.2 Состав биомембран

В состав биомембран входят липиды (25-75 %), белки (20-75 %), углеводы (10-15 %) и вода.

Липиды – это низкомолекулярные органические соединения, включающие жиры и жироподобные вещества, извлекаемые из клетки органическими растворителями (хлороформ, ацетон, эфир, бензол).

Липиды бывают простые и сложные. Простые – соединения спирта, высокомолекулярных жирных кислот и других компонентов. Сложные – это комплексы с белками (липопротеины). В состав биомембран обычно входят липиды трех основных классов: фосфолипиды, гликолипиды, стероиды.

В структуре мембранных липидов можно выделить единый принцип: липиды построены на базе спиртов (глицерин, этиленгликоль). Молекула липида включает гидрофобные «хвосты» из предельных или непредельных жирных кислот, и полярной «головки», состоящей из фосфорной кислоты и этиленамина, серина, холина и др.

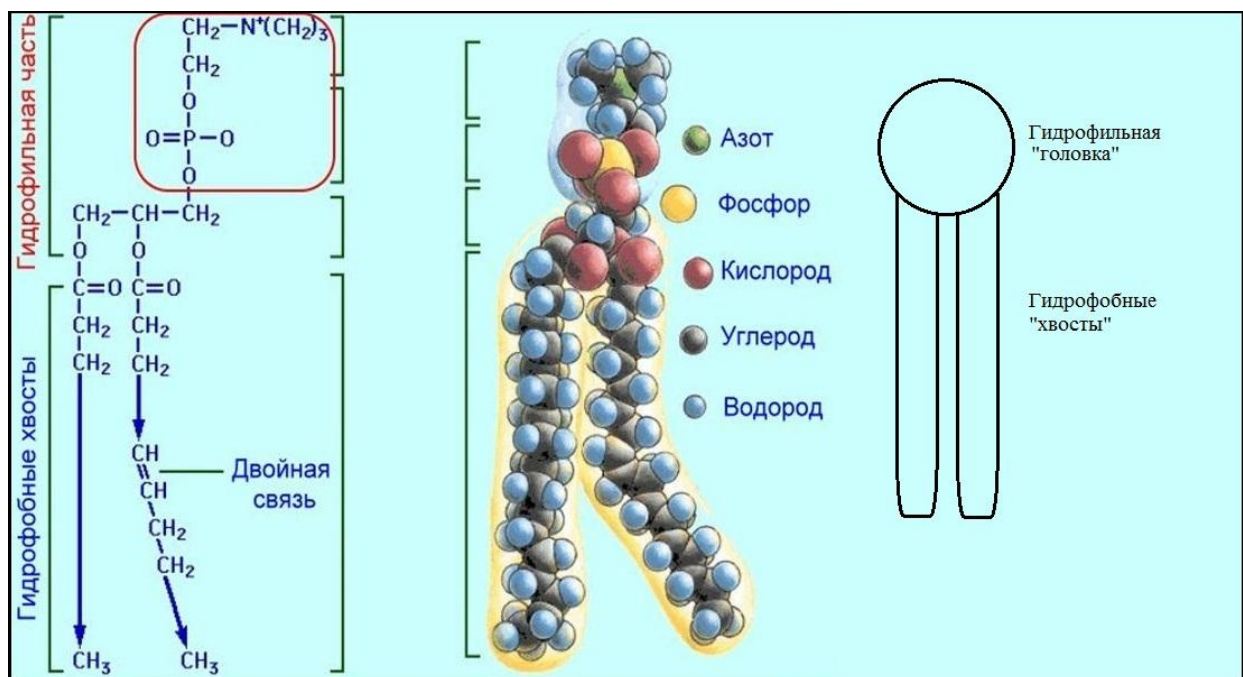


Рисунок 1. Структура биомембран

Поскольку одна часть молекулы липида гидрофобная, а другая – гидрофильная, то она обладает сродством как к полярным так и неполярным растворителям – липид амфифилен. Такие молекулы в воде склонны к агрегации: гидрофобные участки слипаются, вытесняют воду и образуют внутреннюю неполярную область мембраны, а полярные группы располагаются

на границе с водой. Именно амфифильность мембранных липидов определяет стабильность биомембран в воде.

Белковый состав биомембран разнообразен и именно они определяют специфические функции биомембран.

Особенность мембранных белков – их размер большой оси составляет примерно 80-100 Å, а для липида – всего лишь 25-30 Å. Поэтому мембранные белки обычно рассматривают по отношению к мембране в целом.

Белки различают по расположению по отношению к биологическим мембранам: трансмембранное, тангенциальное, частичное погружение.

Мембранные белки классифицируют по их положению на мембране – поверхностные и интегральные: по взаимодействию с липидами и степени погружения и пронизывания мембран – мономонические, бимонические, полимонические.

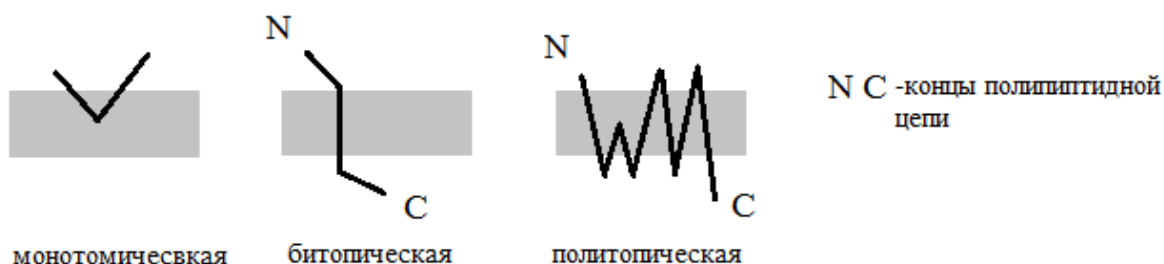


Рисунок 2. Классификация структуры

Углеводы в свободном состоянии в биомембранах практически не обнаруживаются. Они входят в состав белков (гликопротеины) и в состав липидов (гликолипиды). В гликопротеинах и гликолипидах чаще всего моносахариды (глюкоза, галактоза, фруктоза и т.д.). Углеводная часть белковой молекулы обычно находится на внешней стороне биомембран, что связано с их функциональной ролью: осуществление межклеточных взаимодействий, ограничение подвижности белковых молекул, обеспечение иммунных реакций.

Воду, входящую в состав биомембран подразделяют на связанную, свободную и захваченную. Наименьшей подвижностью отличается вода,

присутствующая в виде одиночных молекул в углеводородной зоне биомембран ($\tau_e \approx 10^{-7} \text{с}$). Основная часть связанной воды – это вода гидратных оболочек, образуемых в основном, вокруг полярных частей молекул липидов и белков ($\tau_e \leq (8 \cdot 10)^{-10} \text{с}$). Захваченная вода обнаруживается в центральной части биомембран между липидными бислоями и по подвижности соответствует обычной свободной воде, но медленно обменивается с внешней водой.

Свободная вода входит в состав биомембран в виде самостоятельной фазы и обладает изотропным движением, характерным для жидкой воды.

1.3 Современные представления о структуре биомембран

Совокупность результатов, полученных физическими и химическими методами, дала возможность предложить так называемую жидкостно-мозаичную модель строения биомембраны, которая лежит в основе современных представлений о строении биомембран (Сингер и Никольсон, 1972).

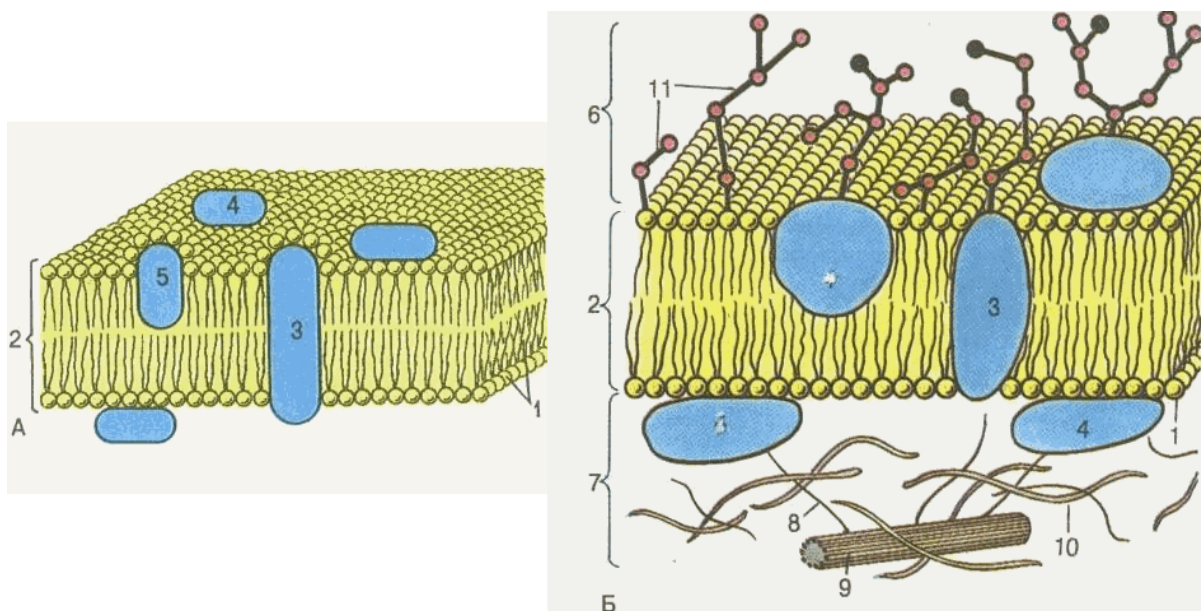


Рисунок 3. Структура биомембраны:

- 1 — молекула липида; 2 — липидный бислой; 3 — интегральные белки; 4 — периферические белки; 5 — полуинтегральные белки; 6 — гликокаликс; 7 — субмембранный слой;
8 — актиновые микрофиламенты; 9 — микротрубочки; 10 — промежуточные филаменты;
11 — углеводные молекулы гликопротеинов и гликолипидов.

Структурную основу биомембран образует двойной липидный слой (фосфолипиды), инкрустированный белками. При физиологических условиях липидный слой является жидким агрегатным состоянием. Это позволяет сравнивать биомембраны с фосфолипидным «морем», по которому «плавают» белковые «айсберги». Соотношение белков и липидов во всех биомембранах примерно одинаковое.

Существует четыре основных способа ассоциации мембранных белков с липидным бислоем:

- 1 - интегральные белки пронизывают мембрану насквозь
- 2 - поверхностные белки погружены в липидный бислой частично
- 3 - белки удерживаются ковалентной связью с другими мембранными белками (микрофиламенты и микротрубочки)
- 4 - белки, ковалентно соединенные с одной или двумя цепями жирных кислот

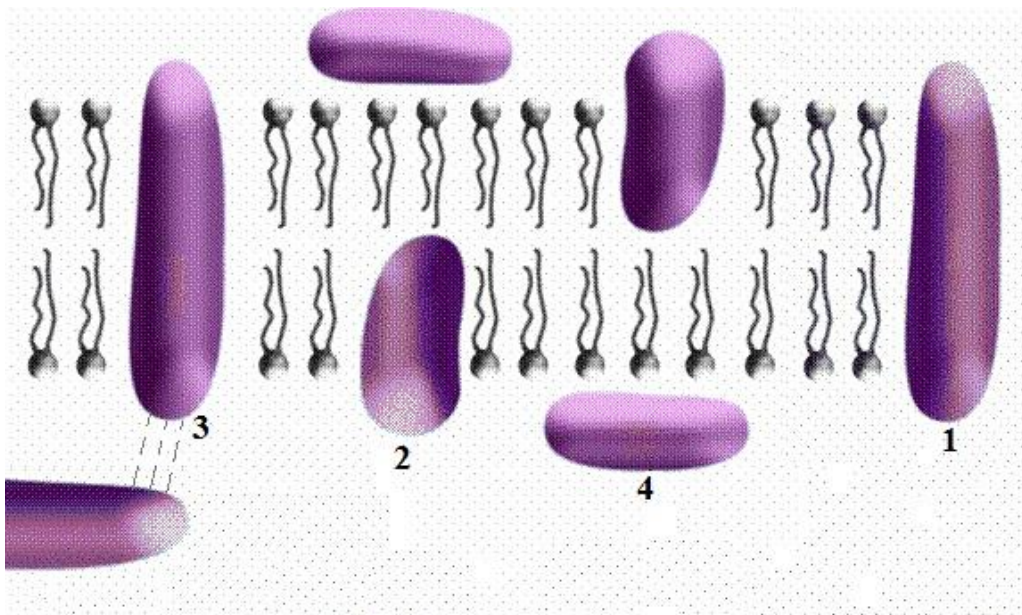


Рисунок 4. Способы ассоциации мембранных белков

Липидная фаза мембран содержит также участки, где липидные молекулы не образуют двойной слой.

Липидный бислой может рассматриваться как плоский конденсатор с ёмкостью примерно 5 мФ/м^2 , сопротивлением 10^{-7} Ом*м^2 , расстоянием между пластин 5 нм и диэлектрической проницаемостью равной 2.

1.4 Образование мембранных структур. Мицеллы. Монослои

В силу природной амфифильности липидов их молекулы могут ориентироваться определенным образом на поверхности и внутри полярных (вода) и неполярных (ацетон, хлороформ) растворителей, образуя монослой (липидные пленки), бислой (мембраны) и в объеме растворителя – мицеллы. Способность липидов образовывать различные структуры при изменении концентрации или температуры, называемая концентрационной, или температуру мезоморфизма. Обычно структурные переходы в липидах можно наблюдать при исследовании зависимости размера S от величины поверхностного давления.

При нанесении на поверхность воды раствора липидов, молекулы свободно распределяются на ее поверхности – полярные головки погружены в воду, а углеводородные хвосты ориентированы в воздух, молекулы липидов не взаимодействуют между собой, что эквивалентно газообразному состоянию называемое газобразный монослой.

По мере сжатия пленки происходит повышение плотности упаковки и взаимодействия молекул липидов. Возникает сплошная пленка липидов, соответствующая состоянию «двумерной жидкости», называемое «жидкий монослой», при котором хвосты ориентированы случайным образом.

При дальнейшем сжатии пленки достигается максимальная упаковка молекул липидов, при котором площадь на липид минимальна возможна. Дальнейшее сжатие пленки невозможно, хвосты ориентированы строго вверх, взаимодействие максимально – «твердый монослой».

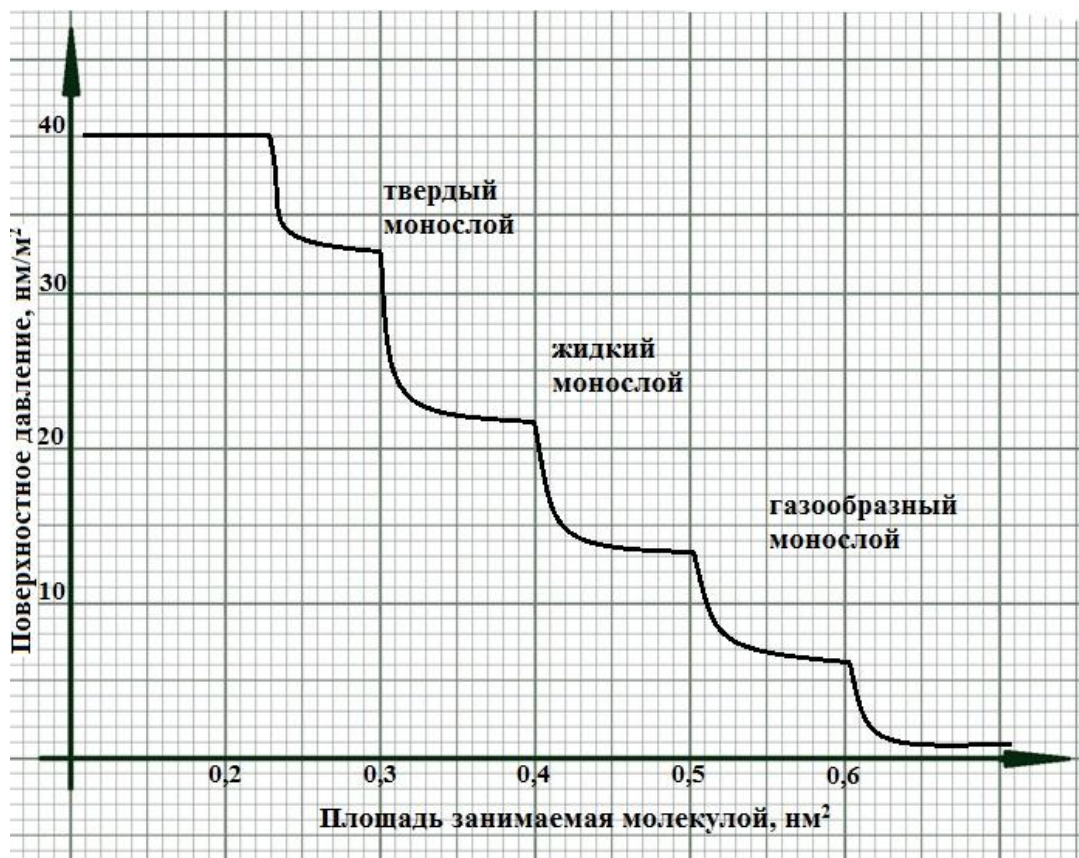


Рисунок 5. Поверхностное давление

При достижении определенного давления происходит сдвиг слоев пленки и их наполнение друг на друга и в итоге образование бислойной мембраны.

Рассмотренные выше липидные монослои являются великолепной моделью для изучения структуры биомембран, взаимодействий в них и фазовых переходов.

Однако не все липиды могут в водном растворе образовывать бислой. Бислой легко образуют липиды, у которых соизмеримы площади полярной головки и поперечное сечение углеводородных цепей (например, фосфолипиды). Если это условие не выполняется, то липиды образуют мицеллы.

Мицеллы — это простейшие надмолекулярные агрегаты липидов в объеме растворителя. В воде образуются классические мицеллы (внутри -

гидрофобные «хвосты», вне - полярные «головки»). В неполярных растворителях обращенные мицеллы.

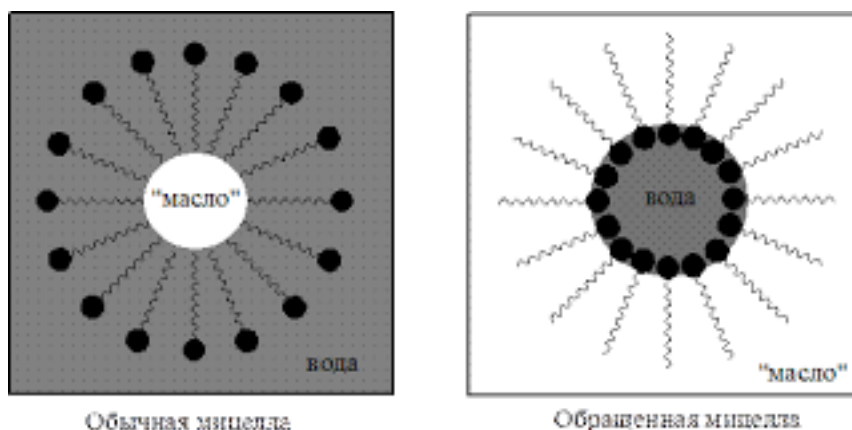


Рисунок 6. Мицеллы

В каждую мицеллу входит от нескольких десятков до нескольких сотен липидов. Формы мицелл разнообразны – сфера, цилиндр, эллипс, диск и др. Образование мицелл – это кооперативный процесс, который запускается при достижении критической мицелльной концентрации СМС (critical micelle concentration).

1.5 Фазовые переходы липидов в мембранах

Вещество в зависимости от внешних факторов (температура, концентрация, давление) может находиться в различных агрегатных состояниях – газ, жидкость, твердое тело.

Твердое тело – наличие дальнего порядка (порядок в расположении частиц превышает межмолекулярные расстояния) и слабое, невыраженное поступательное/вращательное движение атомов (но есть колебания).

Жидкость – нет порядка, но к колебательному добавляются вращательное и поступательное движения ($\tau_{\text{оседлой жизни}} \approx 10^{-12}$ с).

Газ – нет порядка, нет колебаний, есть только поступательное и вращательное движения.

Однако существуют промежуточные состояния: аморфное твердое тело (нет дальнего порядка, но нет и поступательного движения частиц). По сути, параметр порядка и $\tau_{\text{оседлой жизни}}$ и определяют различие между агрегатными состояниями вещества.

Липидные бислойные мембраны при физиологических условиях имеют $\tau_{\text{оседлой жизни}} \approx (10^{-7} \dots \approx 10^{-8})$ с, что соответствует жидкому состоянию. Поэтому мембрана – это жидкость. При этом липиды в мембране упорядочены, т.е. имеет место дальний порядок. Физическое состояние, при котором есть дальний порядок во взаимной ориентации и расположении молекул, но агрегатное состояние жидкое, называется жидкокристаллическим.

Возможные типы жидкокристаллических структур (для вытянутых молекул):

- нематическая (нитевидная), когда молекулы параллельны друг другу;
- смектическая, когда молекулы параллельны друг другу и располагаются слоями;
- холестерическая, когда молекулы параллельны друг другу в одной плоскости, но в разных плоскостях ориентации молекул различны.

Бислойная липидная фаза биомембраны соответствует смектическому жидкокристаллическому состоянию. Жидкокристаллическое состояние **БИОМЕМБРАНЫ** очень сильно чувствительно к температуре, давлению, химическому составу. При понижении температуры в фосфолипидной биомембране наблюдается переход из жидкокристаллического в гель-состояние, называемое твердокристаллическим.

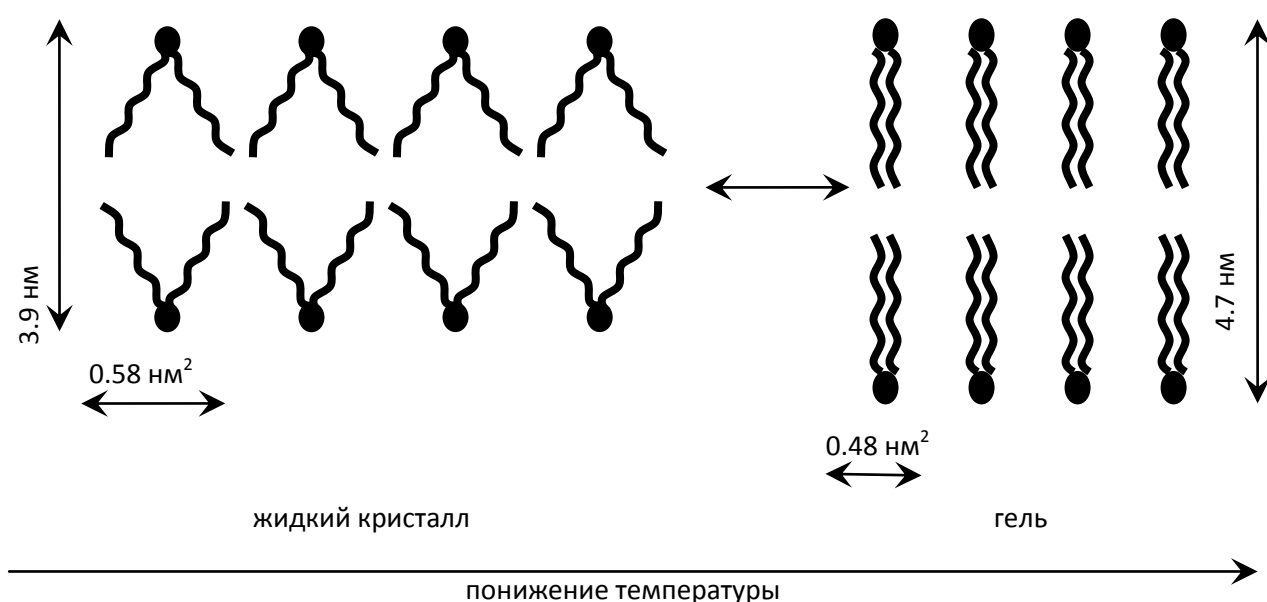


Рисунок 7. Зависимость состояния от температуры

В гель-состоянии молекулы липидов располагаются более упорядоченно, «хвосты» полностью вытянуты параллельны друг другу. В жидкокристаллическом состоянии из-за теплового движения «хвосты» могут изгибаться и быть непараллельными. Толщина биомембраны в гель фазе больше, но площадь поверхности каждого липида меньше, и энтропия меньше, чем в жидкокристаллическом.

Нормальное функционирование биомембраны требует жидкокристаллическое состояние. Поэтому при длительном понижении температуры окружающей среды в живых системах наблюдается адаптационное изменение химического состава биомембраны, обеспечивающее понижение температуры фазового перехода.

Пример: ноги полярного оленя. Температура вдоль ноги меняется от -20°C до +30 °C. В итоге химический состав мембран нижней части ноги существенно отличается от верхней.

РАЗДЕЛ 2

ТЕРМОДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ ФОРМИРОВАНИЯ И УСТОЙЧИВОСТИ МЕМБРАН

2.1 Поверхностная активность, работа адсорбции

Формирование мембран, их стабилизация во многом определяются поверхностными явлениями и межмолекулярными взаимодействиями.

Теоретическое изучение свойств высокоорганизованных биомембран проводят на примере углеводородных пленок и структур, образуемых липидами в водных средах.

Поведение различных соединений в растворах подчиняется адсорбционному уравнению Гиббса:

$$-d\sigma = \sum_{i=1}^m \Gamma_i d\mu_i,$$

где σ – межфазное поверхностное натяжение;

Γ_i – степень адсорбции i -го компонента в поверхностном слое;

μ_i – химический потенциал i -го компонента.

Для бинарной системы (пример: «липид – вода») адсорбционное уравнение Гиббса записывается в виде:

$$-d\sigma = \Gamma_1 d\mu_1 + \Gamma_2 d\mu_2.$$

При низкой концентрации растворенного вещества, сильно адсорбирующегося на поверхности раздела (типично для системы «липид – вода»), адсорбцию самого растворителя можно приравнять к нулю ($\Gamma_2=0$). Тогда $-d\sigma = \Gamma_1 d\mu_1$. Для разбавленных растворов $\mu_1 \approx RT \ln a_1 \approx RT \ln C_1$, где a_1 и C_1 – активность и концентрация растворенного вещества. Тогда

$$\Gamma_1 = -\frac{a_1 d\sigma}{RTda_1} \approx -\frac{C_1 d\sigma}{RTdC_1}.$$

Величина $-\left(\frac{d\sigma}{dC}\right)\bigg|_{C \rightarrow 0}$ называется поверхностной активностью.

Поверхностно-активными называются вещества, понижающие поверхностное натяжение. Для таких веществ $\frac{d\sigma}{dC} < 0$ и $\Gamma > 0$. К этим соединениям, хорошо адсорбирующимся в поверхностном слое и понижающие поверхностное натяжение, относятся органические амфифильные соединения, в частности, липиды.

2.2 Термодинамика равновесия мембран

Для термодинамического описания мембранных систем используют подход Гиббса, в котором рассмотрены реальные свойства системы вблизи границы раздела фаз, обусловленные особенностями межмолекулярных взаимодействий у поверхности.

В рамках подхода Гиббса мембрану представляют в виде слоя α , разделенного плоскостями с внешней средой – слоями β . α и β – две разных фазы, например, водная гидрофильная фаза β и неводная гидрофобная фаза α внутренности биомембраны. Если внутри биомембраны сохраняется слой со свойствами объемной фазы, то такую биомембрану называют толстой.

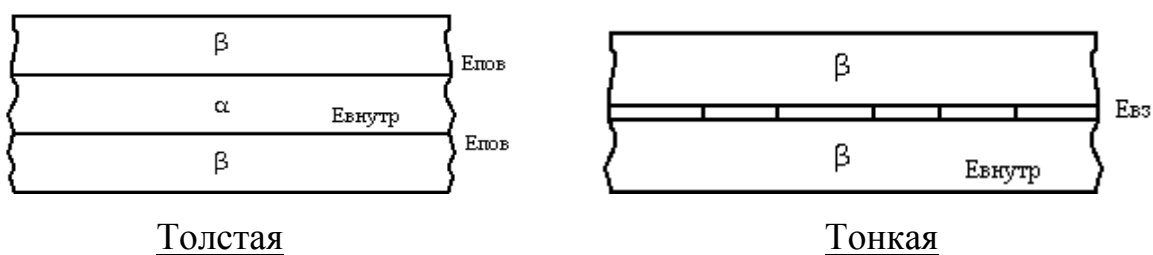


Рисунок 8. Толстая и тонкая мембраны

Для толстой биомембраны характерно свойство аддитивности, когда значение энергии складывается из E для объемной и E для поверхностных слоёв.

Если выделить слой со свойствами объемной фазы нельзя, то в такой пленке наблюдается взаимодействие между поверхностными слоями и условие аддитивности не выполняется. Такие пленки называют тонкими.

подавляющая часть природных биомембран удовлетворяет термодинамическим критериям тонкой пленки. Важная особенность тонкой пленки – давление в фазе, из которой сформирована мембрана, и давление в окружающей среде не одинаковы.

Эту разницу давлений называют расклинивающим давлением.

Это давление обусловлено обобщенным эффектом всех молекулярных поверхностных сил в тонком слое. Знак $\Pi > 0$ – отталкивание поверхностных слоев, $\Pi < 0$ – притяжение.

Помимо Π , тонкие биомембраны характеризуются межфазным и полным натяжением. Межфазное представляет собой работу изотермического изменения площади A пленки при неизменной толщине.

$$\sigma = \frac{1}{2 \left(\frac{\delta F}{\delta A} \right)_{T, h, n}}$$

где F – свободная энергия,

T – температура,

h – толщина пленки,

n – число молекул пленки,

Π – const.

Полное натяжение пленки характеризуют как работу изотермического изменения пленки при постоянном объеме.

$$v = \left(\frac{\delta F}{\delta A} \right)_{T, V, n}$$

В этом случае так же меняется и толщина пленки, и данное выражение включает составляющую работы за счет изменения и расклинивающего давления.

В наиболее простом виде взаимосвязь всех этих параметров пленки определяется уравнением:

$$v = 2\sigma + P_h.$$

Здесь коэффициент 2 для учета межфазового натяжения обеих поверхностных пленок.

2.3 Особенности межмолекулярных взаимодействий в биомембране

Термодинамическая стабильность биомембраны определяется набором стандартных видов межмолекулярных взаимодействий: гидрофобные, электростатические, Ван-дер-Ваальсовы. Рассмотрим особенности их проявления в биомембране.

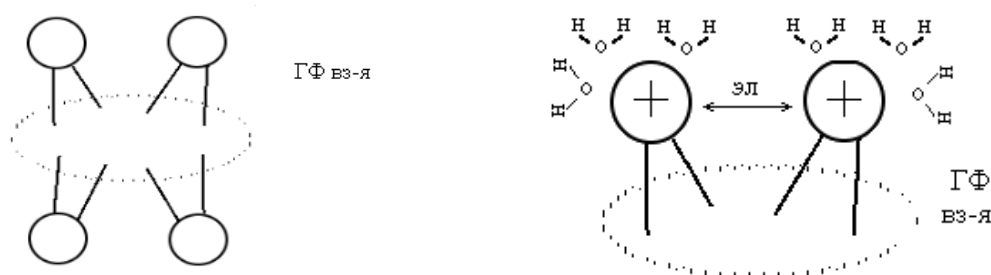


Рисунок 9. Межмолекулярные взаимодействия

Формирование тонких пленок липидов обычно связывают с действием гидрофобных взаимодействий. Однако в полной мере гидрофобность проявляется при взаимодействии «хвостов» липидов, состоящих из гидрофобных-групп CH_2CH_3 . Головки липидов содержат как положительные (NH^+ или $\text{N}(\text{CH}_3)_3$) группы, так и отрицательные (отрицательно заряженные фосфаты фосфолипидов).

В итоге, к гидрофобному взаимодействию добавляется ещё вклад гидратации липидов, т.е. взаимодействие с водной средой (электростатические, Н-связи, ВДВ) и электростатическое взаимодействие самих головок. Анализ показывает, что энергия электростатического взаимодействия головок $E_{вз} \sim 10..20$ кДж/моль, а энергия гидратации 200-800 кДж/моль. Таким образом, считается, что основной вклад в модуляцию гидрофобного взаимодействия дают силы гидратации.

Условно выделяют три типа электростатических взаимодействий в мембранных системах: латеральное или тангенциальное взаимодействие заряженных групп молекул, которые расположены в одном полуслое мембран; трансмембранное взаимодействие – группы расположены по разные стороны БИОМЕМБРАНЫ; межмембранное взаимодействие – группы расположены на поверхности двух соседних мембран.

Теоретическое описание латеральных взаимодействий разработано недостаточно, из-за необходимости знания топологии размещения зарядов и диэлектрической проницаемости среды, разделяющей заряды.

Глубже разработана теория межмембранных электростатических взаимодействий. Их особенность в очень быстром затухании величины электростатической силы. Для эритроцитов энергия отталкивания на $r > 10$ нм = 0, а при $d \leq 2$ нм на 3 порядка больше теплового движения.

Трансмембранные электростатические взаимодействия обычно рассматривают используя модель плоского конденсатора. Однако, и эта теория плохо разработана.

В структуре ВДВ взаимодействий биомембраны наибольшее значение имеют дисперсионные силы. Эти силы преобладают во взаимодействии фаз, разделенных мембраной. Особенность ВДВ в биомембране заключается в том, что сумма парных взаимодействий приводит к резкому возрастанию дальнего действия дисперсионных взаимодействий.

Это приводит к тому, что дисперсионные взаимодействия клеток обнаруживаются на расстояниях, превышающих толщину биомембраны, вплоть до 100 нм.

В общем случае в биомембране

$$P = P_{\text{дисп}} + P_{\text{эл}}.$$

$P_{\text{дисп}}$ – носит характер притяжения

$P_{\text{эл}}$ – отталкивания, следовательно, при реальных взаимодействиях клеток наблюдается минимум энергии взаимодействия на расстоянии уравнивания ВДВ и электростатических $\sim 3-8$ нм. Отсюда следует, что во взвеси можно наблюдать стабильные пары клеток, уравновешенные взаимным притяжением. Такие пары действительно наблюдаются в эксперименте и отличаются подвижностью.

РАЗДЕЛ 3

МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОМЕМБРАН

3.1. Подвижность молекулярных компонентов

Гидрофобный эффект, объединяющий молекулярные компоненты в биомембране, препятствует их выходу в водную фазу за пределы мембраны. В то же время силы межмолекулярного взаимодействия обычно не мешают молекулам в биомембране обмениваться друг с другом местами, поскольку SASA при этом не меняется. Вследствие этого молекулярные компоненты в биомембране обладают индивидуальной подвижностью и могут диффузионным путем передвигаться в пределах биомембраны.

Различают три основных вида движения мембранных компонент: вращательное движение, латеральная диффузия, трансбислойное движение.

Молекулы липидов могут совершать вращательное движение относительно своей длинной оси. Время вращательной корреляции $\tau_c \approx 10^{-9} \text{ с}$ – быстрое.

Диффузионное движение липидов вдоль слоя, называемое латеральной диффузией, также относится к быстрым движениям. $D \approx 10^{-7} \div 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ – по спиновому мечению флуоресцирующим зондом. Расстояние проходимое молекулой липида можно оценить $\bar{l} = \sqrt{4Dt}$. За одну секунду будет 5000 нм, то есть может «обежать» всю плазматическую мембрану таких клеток, как эритроцит. Скорость латеральной диффузии сильно зависит от белкового состава биомембран и Т.

Третий тип движения липидов в биомембране – это трансбислойное движение (flip-flop переход). Это медленное движение вследствие высокого барьера для пересечения полярной головкой липида углеводородной зоны биомембран. Полупериод перехода (время перехода половины всех меченых в

ЯМР и ЭПР липидов) составляет приблизительно от 3 до 30 минут в природных биомембранах.

Отдельное рассмотрение должно быть в отношении подвижности белков в липидном бислое. Молекулы белков также проявляют диффузионную подвижность, однако вследствие большой массы они движутся значительно медленнее. Вращение $\tau_c \approx 10^{-4} \div 10^{-6} \text{ с}$. Латеральная подвижность биомембран также ниже, чем у липидов. В природных биомембранах $D \approx 10^{-10} \div 10^{-12} \text{ см}^2/\text{с}$.

Наличие вращательной и латеральной диффузии для липидов и биомембран позволяет рассматривать биомембраны как двумерные жидкости, характеризующиеся своей вязкостью:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \implies \eta = \frac{kT}{6\pi D r};$$

Поскольку реальные биомембраны неоднородны и ассиметричны, то скорость вращения и латеральная диффузия определяется микроструктурой их непосредственного окружения, следовательно, вязкость (η) рассмотрим как микровязкость. Значения η могут очень сильно варьировать с белковым составом и быть сильно неоднородными по объему биомембран (например, увеличение из-за белок-липидных взаимодействий).

Совокупность всех полученных к настоящему времени результатов по оценке η биомембран позволяет сделать вывод, что для нормального функционирования природных биомембран углеводородная зона должна находиться в жидком состоянии с $\eta \approx \eta$ (оливкового масла).

3.2. Упругие свойства биомембран

Под упругостью мембран понимают их способность изменять свое натяжение при растяжении (сжатии). В общем случае реакция биомембран на внешнее механическое воздействие оказывается сложной и описывается эмпирическими уравнениями. Однако при малых амплитудах и низких

скоростях деформации биомембран процесс с достаточной степенью точности можно рассмотреть, как термодинамически обратимый.

В равновесных условиях при постоянной температуре (T) упругая потенциальная энергия биомембран совпадает со свободной энергией Гельмгольца: $F = U - TS$. Упругий потенциал dF при $T = \text{const}$ равен работе ω , совершенной над системой: $(dF)_T = dU - TdS = d\omega$.

Допуская, что биомембрана изотропна вдоль поверхности, позволяет представить упругий потенциал как функцию двух независимых переменных, характеризующих два типа деформации:

- относительного изменения площади поверхности α за счёт изотропного растяжения (сжатия), и
- параметра β , отражающего деформационное растяжение (сдвиг) поверхности при постоянной площади (растяжение круглой области в эллипсоидную).

Отсюда, упругий потенциал можно представить через частные производные по этим двум параметрам:

$$(dF)_T = \left(\frac{\partial F}{\partial \alpha} \right)_{\beta, T} d\alpha + \left(\frac{\partial F}{\partial \beta} \right)_{\alpha, T} d\beta.$$

Биомембрана в равновесном состоянии обладает начальным изотропным натяжением:

$$\tilde{T}_0 = \left(\frac{\partial F}{\partial \alpha} \right)_{\beta, T}.$$

Малые изменения изотропного натяжения T относительно начального состояния $\tilde{T}_0$, задаются модулем поверхностного изотермического сжатия (модуль Юнга).

$$E_{II} = \left(\frac{\partial T}{\partial \alpha} \right)_{\beta, T} = \frac{\partial^2 F}{\partial \alpha^2}$$

В природных биомембранах. Однако упругие свойства могут сильно меняться из-за белкового состава.

При деформационном растяжении (μ) (при постоянной площади) накопление энергии и сопротивление деформации характеризуется поверхностным модулем упругости биомембран при сдвиге μ .

$$\mu = \left(\frac{\partial F}{\partial \beta} \right)_{\alpha, T}$$

В природных биомембранах $\mu \sim 10^{-5} \frac{\text{Н}}{\text{см}}$, то есть значение модуля сдвига μ примерно на четыре порядка ниже по сравнению с поверхностным модулем упругого сжатия. Это означает, что клеточные биомембраны сильно сопротивляются изменению поверхностного ρ или площади, но легко деформируются без изменения площади биомембраны.

Модуль упругости при сжатии E_{II} и при сдвиге μ являются важнейшими характеристиками биомембраны при механических воздействиях. Их измерение – чрезвычайно сложная экспериментальная задача.

3.3 Механизм разрушения липидного бислоя

Исследования упругих свойств мембранных систем свидетельствуют о том, что липидный бислой мембран представляет достаточно жесткое структурное образование. Это чрезвычайно важно для поддержания формы различных клеточных структур и выполнения биомембраной барьерных функций. Однако в природных биомембранах в процессе их функционирования могут возникать различные механические нарушения и дефекты, причем эти явления сопряжены с такими важными биологическими процессами как слияние клеток, лизис, секреция, гемолиз.

Общее условие устойчивости мембран к действию внешних факторов может быть записано в виде:

$$(\delta v / \delta A)_{T, V, n} > 0 \quad (\delta v / \delta h)_{T, V, n} < 0 \quad (\delta \Pi / \delta h)_{T, A, n} < 0$$

$[v = (\delta F / \delta A)_{T, V, n}$ - полное натяжение].

Неравенства (2) и (3) означают, что изменение Π и v должны препятствовать изменению толщины биомембраны, в то время как изменение v

должно наоборот способствовать изменению площади. На балансе этих двух противоположных тенденций и достигается стабильность биомембраны.

Можно условно выделить 3 источника нарушения механических свойств биомембраны и ее стабильности:

- тепловые флуктуации ведут к случайным локальным сжатиям в продольном или поперечном направлении;
- действие внешнего электрического поля – явления электропорации, электропробоя и электрослияния клеток;
- фазовые переходы в биомембране вследствие изменения внешнего фактора (температуры).

Наиболее признанным в настоящее время механизмом возникновения механических дефектов в биомембране под действием трех указанных источников является механизм образования дефектов типа сквозной поры.

3.4 Дефект типа сквозной поры. Модель критической поры

Считается, что в результате действий любого из трех рассмотренных выше факторов в мембране возникает локальный механический дефект, сопровождающийся переориентацией молекул липида, расположенных вблизи границы дефекта.

Такая пора является гидрофильной и характеризуется закруглением как в горизонтальной, так и в вертикальной плоскостях. Наличие такой поры может приводить к высвобождению веществ изнутри клетки, либо их всасыванию извне и как следствие изменение функциональной активности клетки. Рассмотрим энергетику такой поры на основании модели критической поры. Будем считать, что боковая поверхность поры имеет форму кругового

цилиндра, изогнута и имеет радиус кривизны $h/2$, т.е. пора имеет два радиуса кривизны r и $h/2$.

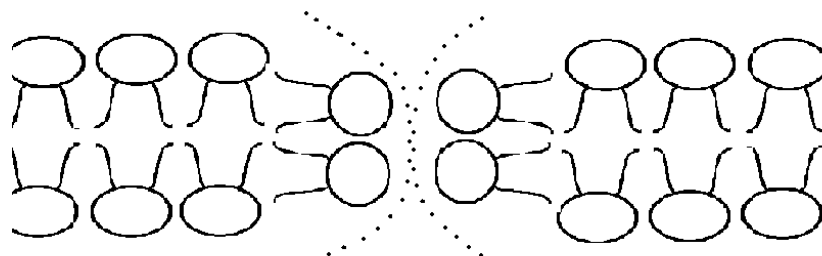


Рисунок 10. Образование поры

Искривление поверхности на границе раздела «липид – вода» приводит к появлению добавочного давления (лапласово). $\Delta p = 2\sigma/r$, σ – межфазное натяжение внутри поры ($\delta F/\delta A$ при $h - \text{const}$).

Очевидно, что лапласово натяжение $p(h/2)$ способствует расширению поры, а $p(r)$ – сжатию. Баланс этих двух тенденций определяет стабильность поры.

$p(h/2)$ – поверхностное натяжение бислоя – способствует расширению;

$P(r)$ – краевое линейное натяжение периметра поры – способствует затеканию поры.

Полная энергия поры

$$E(r) = 2\pi r\gamma - \pi\delta r^2 (*)$$

σ – линейное натяжение кромки поры, т.е. энергия кромки поры;

γ – энергия поверхностная, межфазное натяжение.

В точке равновесия $\delta E/\delta r = 0 \rightarrow r_{кр.} = \gamma/\sigma$ – критический радиус поры.

Подставляя $r_{кр.}$ в (*) получаем критическое значение энергии поры

$$E_{кр.} = \pi\gamma^2 / \sigma.$$

Таким образом, появление пор с $r > r_{кр.}$ приведет к расширению, а с $r < r_{кр.}$ – к сжатию.

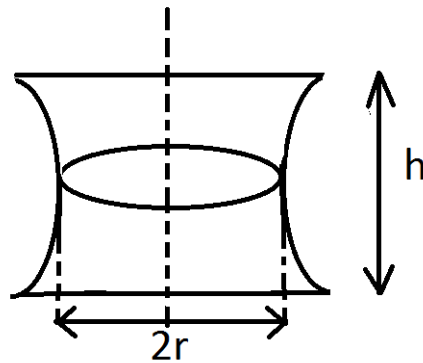


Рисунок 11. Размеры поры

Опыт показывает, что если $r \sim h$ – возможен механический разрыв биомембраны. Расчет $r_{кр}$ для биомембраны в жидкокристаллическом состоянии дает $r_{кр} \sim 9$ нм. Это очень большая величина, из которой следует, что вероятность механического разрыва биомембраны при физиологических условиях очень мала. Типичные размеры пор в природных биомембранах 0,2..4 нм.

Понижение температуры приводит к фазовому переходу из жидкокристаллического в гель-состояние. Для большинства липидов при этом наблюдается рост поверхностного натяжения σ . В итоге $r_{кр}$ в гель-состоянии значительно меньше по сравнению с жидкокристаллическим и как правило ≤ 2 нм.

Это приводит к дестабилизации биомембраны и увеличению вероятности ее разрыва. Изменение σ иногда рассматривают как реакцию биомембраны на стрессовое воздействие. В процессе биологической эволюции состав биомембраны менялся таким образом, чтобы минимизировать увеличение σ при возникновении стресса. Наличие холестерина, состав жирнокислотных радикалов в молекуле фосфолипида – все это расширяет температуру для поры фазового перехода, поддерживает биомембрану в жидкокристаллическом состоянии и поддерживает $\sigma = \text{const}$.

РАЗДЕЛ 4

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОЛЕЙ НА БИОМЕМБРАНЫ

Биомембраны выполняют естественные функции фильтрации избирательной для различных ионов и микроэлементов. В частности биомембраны поддерживают постоянный баланс ионов и противоионов внутри и вне биомембраны. В результате этого на биомембране постоянно находится некоторый потенциал ($\Delta\phi \approx 0,1..0,3\text{В}$) и электрическое поле является нормальным фактором функционирования биомембраны.

Условно можно выделить следующие эффекты действия электрического поля на биомембрану:

- 1) электропробой биомембраны;
- 2) электропорация;
- 3) электрослияние;
- 4) деформация биомембраны.

4.1. Электропробой биомембраны

Наличие потенциалов на биомембране ϕ означает наличие заряда и, следовательно, силы электрического напряжения слоев биомембраны F_E – сжимающая сила.

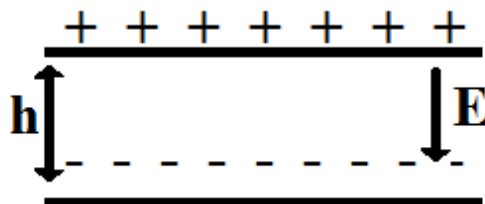


Рисунок 12. Электропробой мембраны

Рассмотрим липидный бислой в виде плоского конденсатора с емкостью C_M , тогда работа сжимающей силы F_E по растяжению биомембраны на толщину h равна

$$F_E \cdot h = \frac{C_M \varphi^2}{2} = \frac{\varepsilon_M \varepsilon_0 S_M \varphi^2}{2h} \Rightarrow F_E = \frac{\varepsilon_M \varepsilon_0 \varphi^2}{2h^2}$$

Поверхностную силу можно выразить через поперечный модуль упругости Юнга:

$$E_{\perp} \frac{\Delta h}{h} = \frac{\varepsilon_M \varepsilon_0 \varphi^2}{2h^2}$$

Интегрируя, получаем выражение:

$$E_{\perp} \ln \frac{h_0}{h} = \frac{\varepsilon_M \varepsilon_0 \varphi^2}{2h}$$

где h_0 – исходная толщина биомембраны при $\varphi=0$.

Уравнение является трансцендентным и не имеет решение при $\varphi > \varphi_{кр}$, где

$$\varphi_{кр} = \sqrt{\frac{0.376 E_{\perp} h_0^2}{\varepsilon_M \varepsilon_0}}$$

Отсутствие решения означает, что сила F_E не компенсируется силой упругости $E_{\perp} \frac{\Delta h}{h}$. Это означает возникновение электропробоя.

Подобная электромеханическая модель в настоящее время носит больше исторический смысл, поскольку не позволяет объяснить многие эффекты действия электрического поля. В настоящее время интенсивно развиваются представления, согласно которым пробой биомембраны в электрическом поле обусловлен особенностями поведения локальных дефектов типа сквозной поры.

4.2. Пробой как следствие локальных дефектов и электропорация

Рассмотрим как изменится энергия биомембраны при появлении в ней цилиндрической поры радиуса r . Поре будет способствовать поверхностная энергия стенок $\pi r^2 \sigma$ и препятствовать линейное натяжение периметра. Кроме этого гидрофильная, что эквивалентно замене диэлектрика биологического с $\epsilon_M = 2.1$ на воду $\epsilon_S = 80$, т.е. изменение емкости ΔC биологического будет способствовать образованию поры $\frac{\Delta C \varphi^2}{2}$.

$$E = 2\pi r \gamma - \pi r^2 \sigma - \frac{\Delta C \varphi^2}{2}$$

$$\Delta C = C_{\text{поры}}(\text{вода}) - C_{\text{поры}}(\text{липидный слой})$$

Исходная емкость биомембраны до образования поры:

$$C = \left(\frac{C_0}{S_M} \right) \left(\frac{\epsilon_S}{\epsilon_M} - 1 \right)$$

Отсюда следует, что наличие электрического поля на биомембране уменьшает $r_{кр}$, т.е. способствует порации и повышает вероятность электрического пробоя. Это явление повышения вероятности образования пор в электрическом поле называется электропорацией. Электропорация приводит к увеличению проводимости биомембраны и появлению флуктуаций проводимости, что регистрируется в эксперименте.

Возникновение пор в электрическом поле сопровождается таким эффектом как набухание клеток: поры пропускают воду и малые ионы. Однако осмотическое давление поддерживается постоянным, следовательно, идет набухание.

4.3. Действие переменного электрического поля на биомембране

В общем эффект действия электрического поля на биомембране сводится к индуцированию зарядов в биомембране и, следовательно, появлению дополнительной разности потенциалов. При низких частотах мембрана имеет емкостное сопротивление, но по мере возрастания частоты до десятков, сотен МГц и выше, сопротивление падает и биомембрана становится больше проводником. Соответственно генерируемый на биомембране потенциал с возрастанием частоты уменьшается.

$$\Delta\varphi = \frac{1.5RE\cos\theta}{1 + (\omega\tau)^2}$$

Наличие индуцирования в электрическом поле зарядов на биомембране означает наличие дипольного момента. Две мембраны, сблизившиеся в пространстве будут взаимодействовать в электрическом поле за счет диполь-дипольного взаимодействия диполей и сближаться – явление электрослияния.

РАЗДЕЛ 5

ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В МЕМБРАННЫХ СИСТЕМАХ

5.1 Механизм фазового перехода в биомембране. Гипотеза петли

Выше было показано, что природные биомембраны могут находиться в двух основных фазовых состояниях: в гелеобразном состоянии (твердый двумерный кристалл) или в жидкокристаллическом (расплавленном). Температурная точка фазового перехода $T_{\text{фп}} < 0^{\circ}$, т.е. в естественных условиях они находятся в жидком состоянии. При плавлении среднее расстояние между липидами увеличивается, а толщина углеводородного слоя уменьшается. Относительное изменение объема биомембраны при этом невелико $\Delta V/V \approx 1.5\%$, т.е. латеральное расширение компенсируется утоньшением слоя. Экспериментально установлено, что $T_{\text{фп}}$ в основном зависит от структурных особенностей углеводородных цепей липидов: $T_{\text{фп}}$ увеличивается с увеличением длины цепей и уменьшается с увеличением степени ненасыщенных жирнокислотных остатков (т.е. чем меньше двойных $\text{C}=\text{C}$ связей, тем меньше $T_{\text{фп}}$).

Согласно современным представлениям фазовый переход «гель $\rightarrow$ жидкость» происходит в результате плавления жирнокислотных цепей липидов. В свою очередь механизм плавления обусловлен вращательной изомеризацией $\text{C}-\text{C}$ связей – их переходу из транс-конформации в гош.

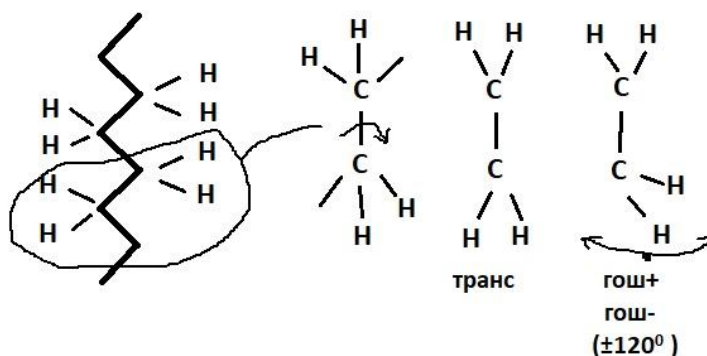


Рисунок 13. Изомеры

Углеводородные цепи липидов в основном состоят из ненасыщенных одинарных С-С связей, которые могут испытывать вращение (внутреннее) относительно связи, что и приводит к изомеризации: транс, гош, цис. Наименьшей энергией обладает транс-конформация, наибольшей – цис-конформация.

Гош-конформация (поворот на $\pm 120^\circ$ относительно транс) по энергии мало превышает транс-конформацию (на 2-3 кДж/Моль), т.е. переход «гош-транс» не является механизмом плавления. Однако состояние гош⁺ и гош⁻ уже разделены между собой барьером 12-17 кДж/Моль).

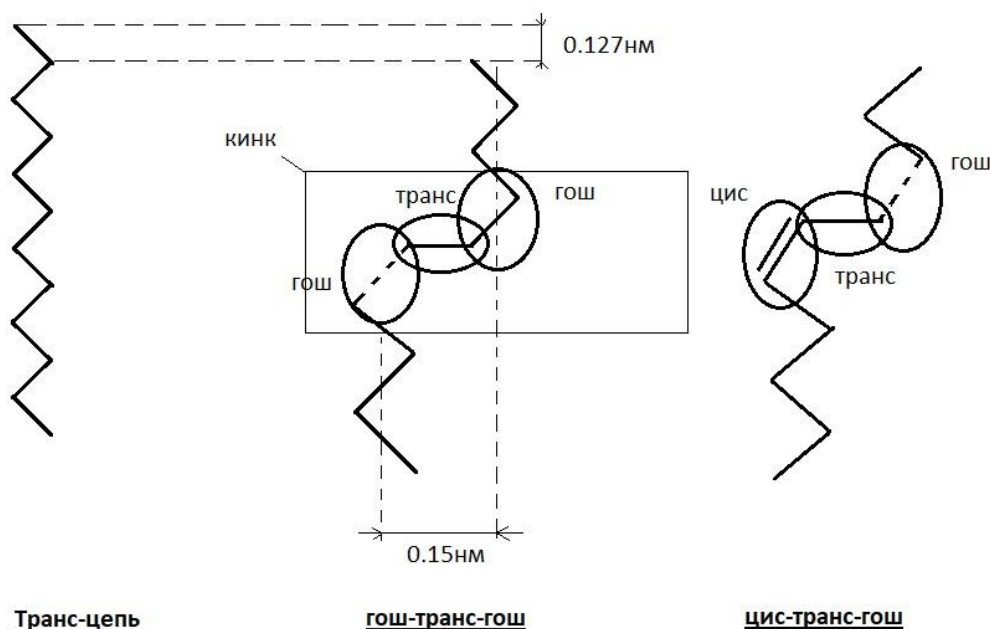


Рисунок 14. Конформации цепей

Если углеводородные цепи в полностью транс-конфигурации представляют собой линейные цепи (именно поэтому твердое гелевое состояние характеризуется упорядоченным расположением хвостов липидов.), то появление хотя бы одной гош-конформации приводит к искривлению пространственной конфигурации цепи на 120° . Это создает жесткие стерические ограничения, следовательно, гош-конформации не возникают поодиночке, а парами гош⁺ и гош⁻, разделенных транс-конформацией. Последовательный поворот С-С связей на $+120^\circ$ и -120° сохраняет линейную

конфигурацию цепи и не приводит к существенному расширению липидного слоя. Однако сам образованный участок гош-транс-гош представляет собой выступ или петлю, или кинк. Образование кинка приводит к уменьшению длины цепи и ее смещению. Появление одного кинка недостаточно для плавления всей цепи, однако одиночные кинки облегчают возникновение кинков в соседних углеводородных цепях, формируя чередующиеся кинк-блоки.

Такие блоки могут возникать либо в одном полуслое биомембраны, либо в двух противоположно расположенных углеводородных цепях. Рассмотренный механизм образования кинка составляет основу гипотезы петли, используемой для объяснения механизма плавления.

При увеличении числа кинков разупорядоченность углеводородной зоны возрастает, что и вызывает плавление.

Наличие двойных цис связей $C=C$ в жирнокислотных ненасыщенных цепях могут играть роль зародышей для образования кинка. Наличие $C=C$ связи создает определенные стерические ограничения на ее расположение в области ненасыщенных $C-C$ связей. Эти ограничения снимаются при образовании даже одной гош-конформации.

5.2 Подвижность углеводородных звеньев в биомембране. Диффузия кинков

Вращательная изомеризация $C-C$ связей и образование кинков в углеводородных цепях липидов определяют общую подвижность этих цепей в биомембране, которая наиболее велика в жидкокристаллическом состоянии, а также другие свойства биомембраны как физического объекта. Дадим оценку вероятности возникновения транс-гош при температурах до фазового перехода.

Частота крутильных колебаний вокруг $C-C$ связи $(6 \div 8) \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$. Пусть величина барьера, разделяющая гош-транс-гош конформации в кинке равна

12 кДж/Моль. Тогда частота возникновения кинка $\nu = \frac{kT}{h} \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT}\right) \approx 10^{10} \text{ с}^{-1}$. Из этого следует, что гош+ гош-пары действительно могут возникнуть с высокой вероятностью именно вследствие крутильных осцилляций. При повышении температуры амплитуда этих крутильных осцилляций увеличивается, следовательно, увеличивается вероятность кинка (кроме того, амплитуды суммируются, увеличиваясь к концу цепи, следовательно, увеличивается угол отклонения цепи) из этого следует плавление, а также понижение вязкости и повышение текучести углеводородной зоны биомембраны. – Все это определяет общую подвижность.

Высокая текучесть в частности проявляется в том, что кинк может перемещаться вдоль углеводородной цепи. Такое перемещение кинка можно рассматривать как одномерную диффузию с

$$D_k = \frac{1}{2} \nu_k (\Delta L)^2$$

ν_k - частота скачка кинка,

ΔL - шаг одного скачка.

Пусть $\nu_k \approx 10^{10} \text{ с}^{-1}$ (совпадает с частотой появления гош± конформаций), следовательно, $D_k \approx 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$ ($\Delta L \approx 0.13 \text{ нм}$ – дискретное смещение кинка вдоль углеводородной цепи).

Полученное значение совпадает с известными коэффициентами проницаемости липидных мембран для O_2 , H_2O и небольших молекул электролитов. Это совпадение, а также геометрическое соответствие размеров таких молекул и свободного объема, возникающего при образовании кинка, служит основанием для утверждения, что трансмембранный перенос малых молекул осуществляется внутри свободного объема, образуемого кинком.

5.3 Термодинамические параметры фазовых переходов

С термодинамической точки зрения фазовые переходы в биомембране можно рассматривать как превращения агрегатных состояний. При фазовом переходе в биомембране изменяются скачком упорядоченность системы, т.е. энтропия S и ее объем. Таким образом производные от свободной энергии $\frac{\partial G}{\partial T} = -S$ и $\left(\frac{\partial G}{\partial p}\right) = V$ претерпевают разрыв в точке фазового перехода, следовательно, фазовые переходы в биомембране относятся к переходам первого рода.

Типичные экспериментальные кривые для изменения теплоемкости и энтальпии как функции T , измеренные на DSC, приведены на рисунке.

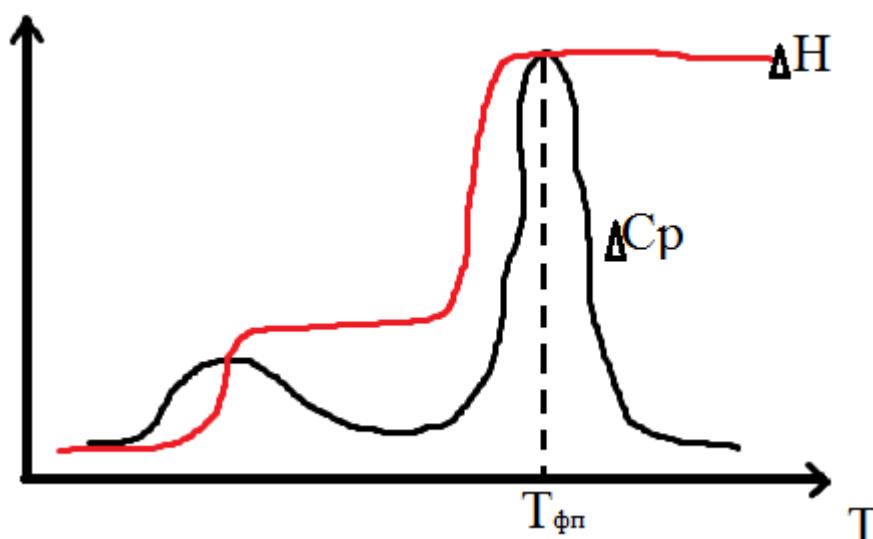


Рисунок 15. Кривые для изменения теплоемкости и энтальпии

DSC измеряет $\frac{\Delta Q}{\Delta T}$ - т.е. теплоемкость системы.

Измерив ΔQ можно определить энтальпию перехода $\Delta H = \frac{\Delta Q}{M}$ и $\Delta S = \frac{\Delta H}{T_{\text{фл}}}$,

где M – количество образца в пробе.

Обычно ΔH слабо зависит от строения липидов, чего нельзя сказать о ΔS .

Механизм фазового перехода в биомембране обусловлен транс-гош-изомеризацией, следовательно, фазовый переход в биомембране можно рассмотреть как конфигурационное плавление, т.е. вклад в ΔS в основном обусловлен изменением числа изомеров углеводородных цепей.

Для липидов ΔS линейно связано с длиной n углеводородных цепей при $14 \leq n \leq 22$. Инкремент приращения на одну СН-группу составляет $\Delta S_1 \approx 5.25 \text{ Дж/моль} \cdot \text{К}$. Это позволяет оценить вероятность нахождения CH_2 -группы в транс- или гош-конформации. Пусть P_t и P_g вероятности в транс и гош-

$$P_t + 2P_g = 1.$$

Энтропия перехода транс-гош для одной группы

$$\Delta S_1 = -R[P_t \ln P_t + 2P_g \ln P_g] = R\left[P_t \ln \frac{1}{P_t} + (1 - P_t) \ln \frac{2}{1 - P_t}\right] \Rightarrow P_t \approx 0.8 \quad P_g \approx 0.1$$

5.4 Доменная структура при фазовом переходе. Гистерезис

Фазовый переход в биомембране, как и любой реальный переход является квазифазовым, т.е. происходит не мгновенно при $T_{\text{фп}}$, а в некотором интервале температур $\Delta T_{\text{фп}} \approx 0.2 \div 1.0 \text{ } ^\circ\text{C}$. Это обусловлено тем, что при плавлении в бислое образуются участки одновременного существования твердой и жидкой фазы, называемые доменами. Каждый домен образован некоторым количеством N молекул липидов, называемым кооперативной единицей $N = 70 \dots 440$. Кооперативная единица определяет кооперативность фазового перехода $N = \frac{1}{\sqrt{\sigma}}$, где σ -параметр кооперативности, т.е. степень крутизны экспериментальной кривой

На границе домена молекулы липидов находятся в обычной упаковке. Однако поскольку переход из жидкокристаллического состояния в гель

сопровождается изменением V , следовательно, на границе доменов действуют механические силы χ . В результате жидкой кристаллические фазы доменов находятся под влиянием сил сжатия, а гель-объемы будут испытывать растяжение, что определяет изменение внутреннего поверхностного натяжения σ , т.е. для двух сосуществующих фаз 1 и 2 в липидном бислое появляется дополнительная зависимость их энергий G_1, G_2 от внутреннего поверхностного натяжения и механических сил $G_1 = f(T, p, \sigma_{1,2}, x_{1,2})$, $G_2 = f(T, p, \sigma_{2,1}, x_{2,1})$. Это и определяет конечность $T_{\text{фп}}$.

Взаимопревращение жидкокристаллического состояния в гель домены, т.е. фазовый переход может быть описан в рамках обычной реакции 1-го порядка.

Пусть A и B – это жидкокристаллическое состояние и гель домены в концентрации C_a и C_b , тогда фазовый переход задается как $A \xleftrightarrow{k} B^*$.

$$C_a + C_b = C_0,$$

$$\theta = \frac{C_a}{C_a + C_g} - \text{доля липидного слоя в ЖК-состоянии}$$

$$C_b = k \cdot C_a.$$

Получаем $k = \frac{\theta}{1-\theta}$ параметр θ может быть измерен экспериментально

К реакции (*) может быть применен стандартный подход Вант-Гоффа:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{\Delta H_{BG}}{RT^2} \quad \frac{d \ln k}{dT} = \frac{d}{dT} \ln \frac{\theta}{1-\theta} = \left[\frac{1-\theta}{\theta} \frac{d}{dT} \left(\frac{\theta}{1-\theta} \right) \right] = \frac{d\theta}{dT} \frac{1}{\theta(1-\theta)}$$

$$\text{В точке перехода } \theta=0.5 \text{ при } T=T_{\text{фп}} \Rightarrow \frac{\Delta H_{BG}}{4RT_{\text{фп}}^2} = \left(\frac{d\theta}{dT} \right)_{T_{\text{фп}}}$$

По наклону экспериментальной кривой определяют ΔH_{BG} . По измеренному удельному тепловому эффекту ΔQ определяют N как $\Delta H_{BG} = N \cdot \Delta Q$.

Особенности протекания фазовых переходов в биомембране связаны с проявлением у них гистерезиса, т.е. смещение $T_{\text{фл}}$, регистрируемой при нагревании или охлаждении системы. Одной из причин появления гистерезиса является ситуация, когда кинетический барьер для фазового перехода очень высок, т.е. время установления равновесия жидкокристаллических и гелевых доменов для данной температуры T внутри интервала плавления велико. Это затрудняет установление термодинамического равновесия между фазами при $T \approx T_{\text{фп}}$ и переход осуществляется через метастабильное состояние. Гистерезис обнаружен как в синтетических, так и природных биомембранах.

РАЗДЕЛ 6

ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

6.1 Общее представление о транспорте веществ через биологические мембраны. Электрохимический потенциал

Живые системы на всех уровнях организации - открытые системы, поэтому транспорт веществ через биологические мембраны – необходимое условие жизни. С переносом веществ через биологические мембраны связаны процессы метаболизма клетки, биоэнергетические процессы, образование биопотенциалов и прочее. Нарушение транспорта приводит к различным патологиям.

Ключевым для описания транспорта является электрохимический потенциал.

Химическим потенциалом данного вещества k , μ_k называется величина, численно равная энергии Гиббса, приходящейся на 1 моль этого вещества. Математически химический потенциал определяется как частная производная энергии Гиббса G по количеству k -го вещества при T , p и M_i ($i \neq k$) = *const*.

$$\mu_k = \left(\frac{\partial G}{\partial M_k} \right)_{P, T, M_{i \neq k}}$$

Для разбавленного раствора с концентрацией вещества C , химический потенциал определяется как:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln c \quad (1),$$

где μ_0 химический потенциал данного k -го вещества при $C=1$ моль/л.

В общем случае если исследуемое вещество является заряженным (ион), то энергия Гиббса определяется не только концентрацией, но и взаимодействием с внешними электрохимическими полями. В этом случае

стандартный химический потенциал (1) обобщается на электрохимический потенциал.

$$\mu_{\pm} = \mu_0 + RT \ln c + zF\varphi \quad (2)$$

$F = 96000$ кл/моль – число Фарадея

Z = заряд иона (валентность)

φ = потенциал электрического поля

Таким образом, энергия Гиббса на 1 моль вещества, помещенного в электрическое поле (то есть работа по переносу 1 моля из раствора на бесконечность в вакууме: состоит из химической работы $\mu_0 + RT \ln c$ и электрической работы $zF\varphi$).

Транспорт веществ через биологические мембраны можно разделить на пассивный и активный.

6.2 Пассивный перенос веществ через биологические мембраны.

Классификация веществ пассивного транспорта

Пассивный транспорт – это перенос вещества из мест с большим значением электрохимического потенциала к местам с его меньшим значением. Пассивный транспорт идет с понижением энергии, следовательно, может идти самопроизвольно.

Плотность потока вещества J при пассивном транспорте подчиняется уравнению Теорелла:

$$J = -uc \frac{d\mu_{\pm}}{dx} \quad (3)$$

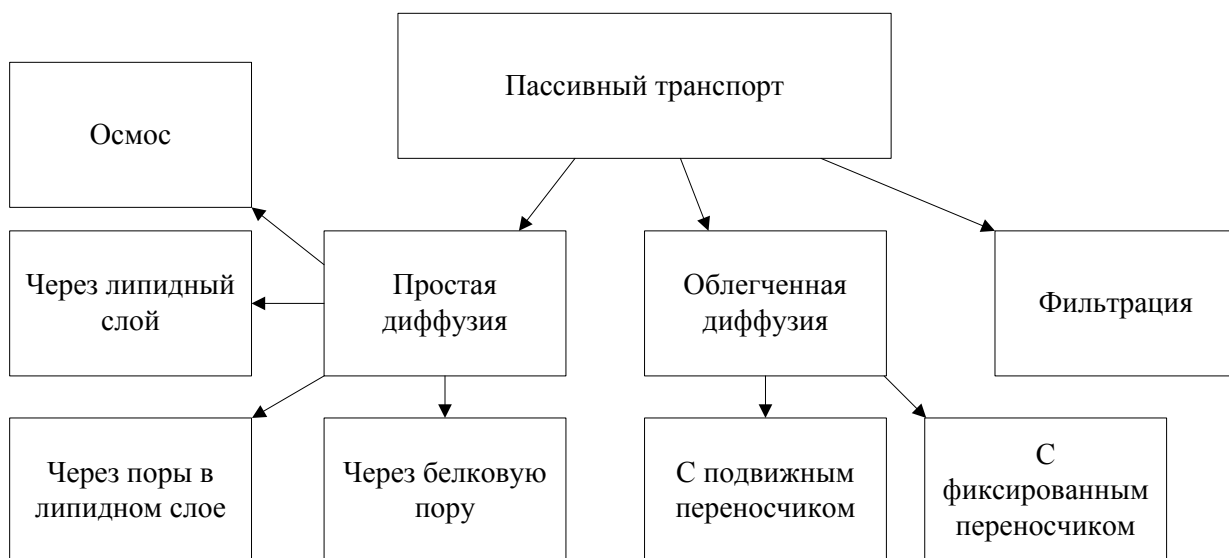
u – подвижность частиц

«-» – указывает, что перенос идет в сторону уменьшения $\bar{\mu}$

J – это величина, численно равная количеству вещества, перенесенного за единицу времени через единицу площади поверхности перпендикулярная направлению переноса [моль/м²с]. Подставляя (2) в (3) получаем уравнение Нернста-Планка:

$$J = -uRT \frac{dC}{dx} - uc_z F \frac{d\phi}{dx} \quad (4)$$

Уравнение отражает два основных движения силы переноса при пассивном транспорте: градиент концентрации (то есть диффузия, движущей силой которой является тепловое движение) и градиент электрического потенциала (движущей силой является электрическое поле). В отдельных случаях возможна конкуренция этих процессов, и перенос, например, возможен от меньшей концентрации к большей за счет преобладания электрической составляющей в (4).



6.3 Простая диффузия через биологические мембраны. Пассивный транспорт неэлектролитов

В случае отсутствия градиенты потенциала, либо если вещество не заряжено в уравнении Нернста:

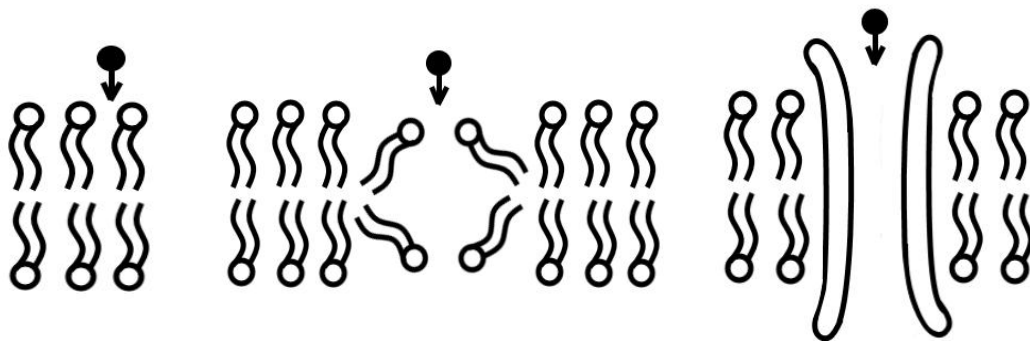
$$\frac{d\varphi}{dx} = 0 \Rightarrow J = -uRT \frac{dC}{d\lambda} = -D \frac{dC}{d\lambda} \quad (1)$$

Получили уравнение Фика (1-е уравнение) в котором D – коэффициент диффузии:

$$D = uRT$$

Таким образом движущая сила – градиент концентрации.

Основные схемы транспорта неэлектролитов:



Через липидный слой Через пору в биологической мембране Через белковую пору

Рисунок 16. Основные схемы транспорта неэлектролитов

Рассмотрим случай стационарной диффузии через биологические мембраны толщиной h .

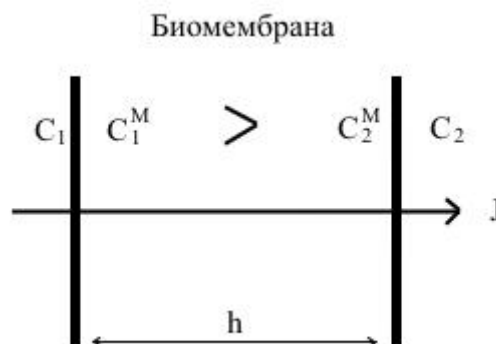


Рисунок 17. Диффузия

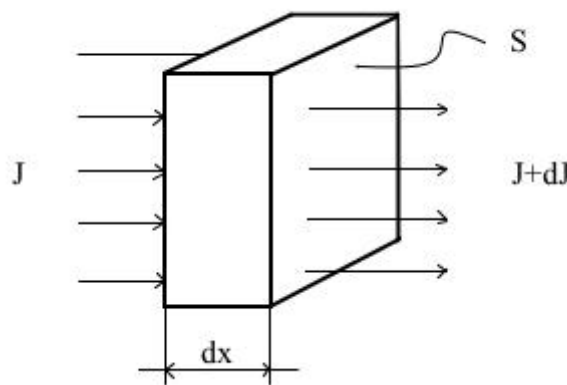
Взаимосвязь концентраций внутри и вне биологической мембраны осуществляется через коэффициент липофильности или коэффициента распределения γ , который может быть измерен экспериментально в водно-органической фазе модельной. Получаем:

$$J = -D \frac{C_1^M - C_2^M}{h} = -\frac{D\gamma}{h} (C_1 - C_2) = -P(C_1 - C_2),$$

где $P = \frac{D\gamma}{h}$ – коэффициент проницаемости биологической мембраны

Коэффициент P тем больше, чем больше коэффициент диффузии (чем меньше вязкость мембраны), чем тоньше биологическая мембрана и чем лучше вещество растворяется в биологической мембране – γ . Корреляция степени растворимости в липидном бислое и проницаемости установлена экспериментально. Как правило, неполярные вещества (органические жирные кислоты, эфиры) достаточно хорошо проходят через биологическую мембрану за счет диффузии.

Рассмотрим элементарный объем:



Количество вещества, накапливающееся в объеме в единицу времени равно:

$$dJ = -\left(\frac{\partial J}{\partial x}\right)dx$$

И оно же определяется через концентрацию как:

$$\left(\frac{\partial C}{\partial t}\right)dV = \frac{\partial C}{\partial t}Sdx$$

Приравнявая для единицы площади $S=1\text{см}^2$ имеем:

$$-\frac{\partial J}{\partial x} = \frac{\partial C}{\partial t}, \quad \frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

Подставляя в первое уравнение Фика, получаем второе уравнение Фика.

Его решение имеет вид:

$$C(t) = \frac{C_0}{2\sqrt{\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right)$$

Из данного уравнения вытекает, что пик концентрации убывает по закону:

$$C_{max} = \frac{C_0}{2\sqrt{\pi Dt}}$$

И профиль концентрации характеризуется среднеквадратичным отклонением как $\bar{x}^2 = 4Dt$ – уравнение Эйнштейна для одномерной диффузии.

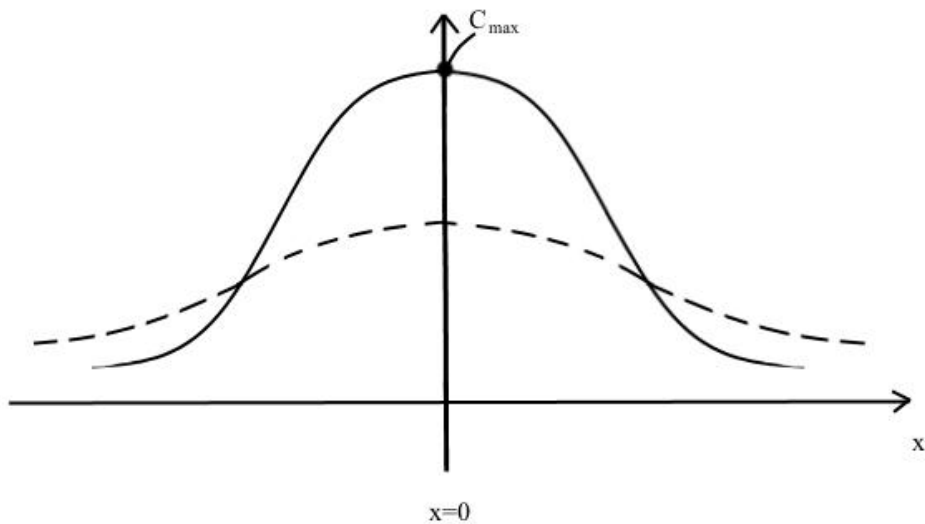


Рисунок 18. Профиль концентрации

6.4 Пассивный транспорт неэлектролитов. Облегченная диффузия

Облегченная диффузия происходит при участии молекул-переносчиков. Например, валинолейцин – переносчик ионов калия. VAL имеет форму манжетки, внутренность которой полярна, а внешняя часть неполярна. В результате K^+ комплексообразуется вовнутрь VAL, который сам по себе хорошо растворим в липидном бислое, т.е. может проникать через биомембрану за счет простой диффузии.

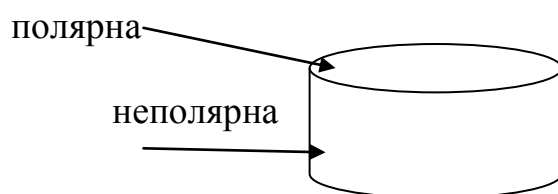


Рисунок 19. Облегченная диффузия

Процесс облегченной диффузии должен учитывать сосуществование и равновесие молекул переносчика C и субстрата S внутри (o) и вне (i) биомембраны.

Общая кинетическая схема облегченной диффузии может быть представлена в виде, учитывающем 4 основных процесса.

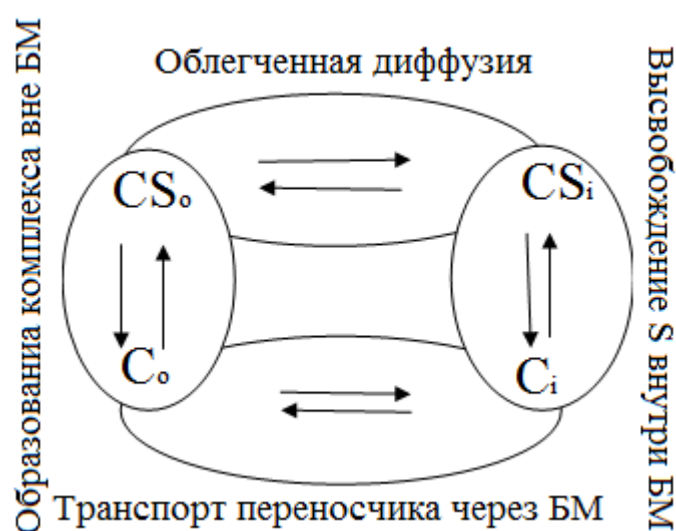


Рисунок 20. Облегченная диффузия

Как правило, облегченная диффузия протекает быстрее простой диффузии. Кроме этого, облегченная диффузия обладает свойством насыщения: при увеличении концентрации переносимого вещества J возрастает лишь до некоторого предела, когда все молекулы переносчика уже заняты. Если переносчик специфичен к различным веществам, то может также наблюдаться эффект конкуренции различных облегченных диффузий для разных веществ.

Рассмотренный пример облегченной диффузии относится к категории диффузии с подвижным переносчиком. Разновидностью облегченной диффузии является транспорт с помощью неподвижных молекул-переносчиков, фиксированных определенным образом поперек мембраны. При этом молекула переносимого вещества передается от одной молекулы-переносчика к другой как по эстафете.

6.5 Фильтрация и осмос

Фильтрацией называется движение раствора через поры в биомембране под действием градиента давления. Скорость переноса при фильтрации подчиняется закону Пуазейля:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{P_1 - P_2}{\omega},$$

где $\omega = \frac{8\eta l}{\pi r^4}$ – гидравлическое сопротивление

l – длина поры, r – ее радиус.

Явление фильтрации играет важную роль в процессах переноса воды через стенки кровеносных сосудов.

Осмос – преимущественное движение молекул воды через полупроницаемые мембраны (непроницаемые для растворенного вещества и проницаемая для воды) с мест с большей концентрацией в места с меньшей

концентрацией. Осмос - простая диффузия воды из мест с ее большей концентрацией в места с меньшей концентрацией.

6.6 Пассивный транспорт ионов через биомембрану. Энергетика гидратации ионов

В отличие от транспорта неэлектролитов, транспорт ионов через биомембрану осуществляется за счет градиента электрохимического потенциала движущимися силами, которого является градиент концентрации и градиент электрического поля.

Возможные механизмы прохождения ионов через биомембрану:

1. Растворение иона в липидной фазе биомембраны.
2. Движение по ионным каналам, являющимся структурными компонентами биомембраны.
3. Транспорт с участием переносчиков.

Основные закономерности транспорта ионов определяются характером взаимодействия ионов с молекулами воды, т.е. гидратацией ионов.

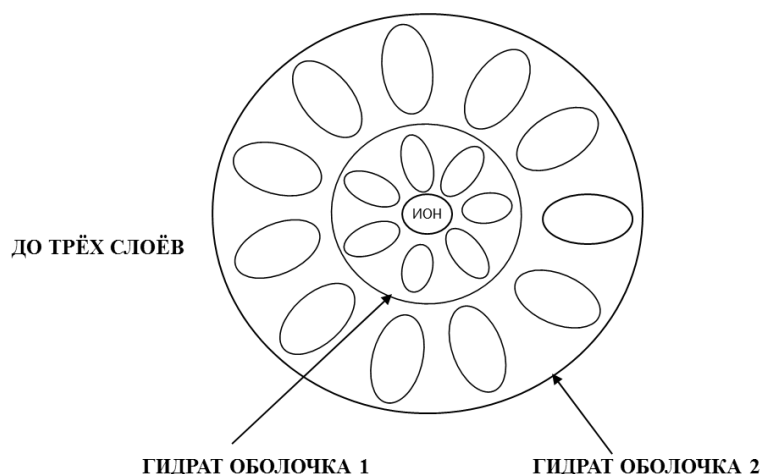


Рисунок 21. Гидратация ионов

Основу взаимодействия ионов с водой составляет ион-дипольные взаимодействия, приводящие к ориентационному упорядочиванию молекул воды как вблизи, так и вдали от иона.

Электрические поля вблизи ионов очень велики (10^6 - 10^7 В/см), следовательно, ближайшие к иону молекулы воды практически полностью ориентированы и ближайший гидратный слой молекул воды является диэлектрически насыщенным: вода в следующем слое уже менее упорядочена. И так далее по мере удаления от иона гидратные слои теряют диэлектрическое упорядочивание.

Переход иона из водной среды в неполярную внутренность биомембраны представляет собой процесс удаления гидратной оболочки, т.е. дегидратация. Энергия гидратации K^+ и $Na^+ \sim -280..400$ кДж/моль, т.е. очень велика приближается к энергетике ковалентной СН-связи. Наличие дискретных гидратных оболочек (до трех) у ионов приводит к эффекту «квантования» ионов по степени проницаемости через биомембрану. Пора будет хорошо проницаема для иона, если её диаметр соответствует размеру любой из гидратных оболочек. Эффективный радиус иона с гидратной оболочкой определяется как что в 2 раза больше его ВДВ радиуса. Изменение энергии при переносе иона через биомембрану может быть рассчитано в рамках электростатической теории Бора.

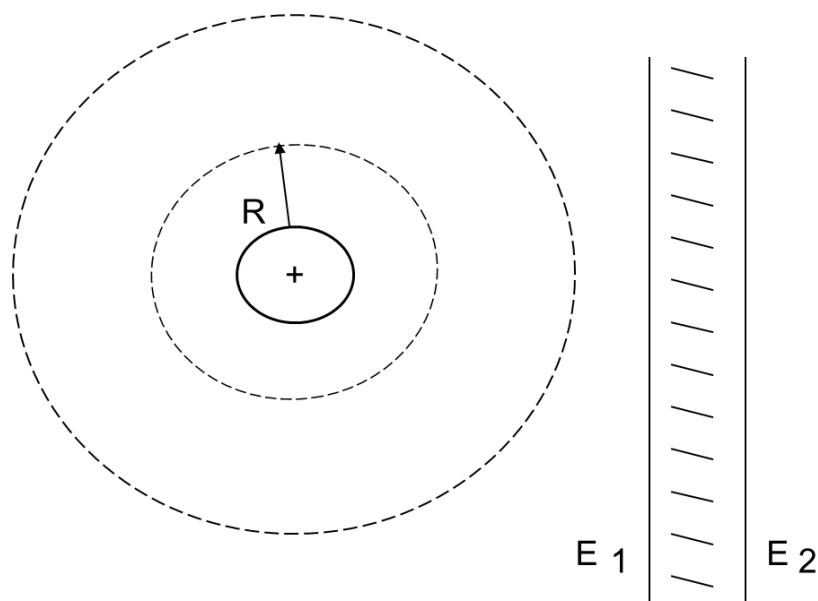


Рисунок 22. Изменение энергии

Рассмотрим перенос из среды ε_1 в ε_2 . Рассчитаем энергию электрического поля, созданного ионом в сферическом приближении.

Объемная плотность энергии $\omega = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 E^2}{2}$ $\omega = \int \frac{\varepsilon \varepsilon_0 E^2}{2} dV$ - энергия иона

Напряженность поля, созданного ионом с зарядом Ze на расстоянии R :

Выделяем сферический сегмент и определяем его $dV = 4\pi R^2 dR$

Окончательно $W = \int \frac{\varepsilon \varepsilon_0 E^2}{2} dV = \frac{Z^2 e^2}{8\pi r \varepsilon \varepsilon_0}$

Изменение свободной энергии при переносе 1 моля ионов через биомембрану определяется как $\Delta\omega = \frac{Z^2 e^2 N_A}{8\pi \varepsilon_0 r} (-)$

6.7 Заряженные биомембраны. Двойной электрический слой

Рассмотренный выше случай транспорта электролитов относится к ситуации незаряженной биомембраны. Как правило, такие ситуации связаны с $\varphi = \text{const}$ и тривиальным диффузионным механизмом транспорта электролитов.

Однако биологические фосфолипидные биомембраны несут на поверхности отрицательные заряды фосфатов.

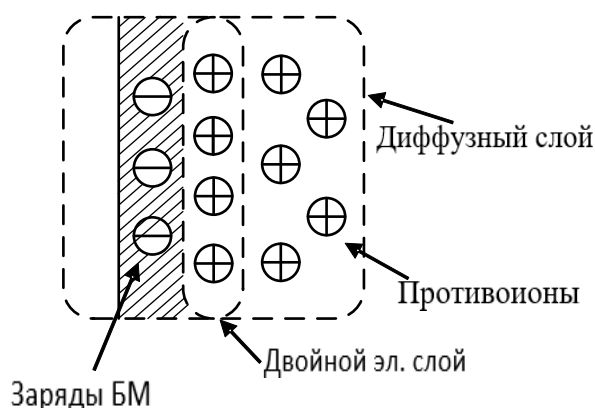


Рисунок 23. Фосфолипидные биомембраны

Наличие фиксированных поверхностных зарядов клеточных биомембран приводит к вытягиванию из свободного раствора положительных противоионов и образованию двойного электрического слоя, который является важным фактором в протекании многих биоэлектрохимических процессов. Именно этот двойной электрический слой создает градиент электрического потенциала в биомембранах, определяющий пассивный транспорт электролитов.

Равновесие ионов всех знаков вблизи заряженной поверхности биомембран определяется двумя факторами: кулоновским притяжением и тепловым хаотическим движением.

Кулоновский фактор задается уравнением Пуассона: $\frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} = -\frac{\rho(x)}{\varepsilon \varepsilon_0}$

где $\rho(x) = F \sum z c_x$ — плотность электрических зарядов вдоль x

6.8 Решение уравнения Нернста – Планка для заряженных БМ. Приближение постоянного поля для пассивного транспорта электролитов

Выше было показано, что транспорт электролитов через заряженную биомембрану определяется двумя уравнениями: уравнение Нернста – Планка (1), уравнение Пуассона (2):

$$J = -uRT \frac{dc}{dx} - ucZF \frac{d\varphi}{dx} \quad (1)$$

$$\frac{d^2\varphi}{dx^2} = -\frac{F}{\varepsilon\varepsilon_0} \sum zc_0 \exp\left(-\frac{zF\varphi}{RT}\right) \quad (2)$$

Существуют несколько подходов к решению данной системы, из которых приближение постоянного поля является наиболее применимым по отношению к биомембране. Этот подход основан на предположении о постоянстве напряжённости поля по всей толщине биомембраны: $E = \text{const}$, $\frac{d\varphi}{dx} = \text{const}$. Это условие выполняется для тонких биомембран, в которых концентрация носителей зарядов мала, а толщина двойного электрического слоя очень велика.

Решение дает величину потока J ионов данного типа через биомембрану

$$J = \frac{zF\varphi P}{RT} \frac{c_0 - c_i \exp\left(\frac{zF\varphi}{RT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{zF\varphi}{RT}\right)} \quad \text{ - уравнение Гольдмана,}$$

где $p = \frac{uRT\gamma}{h}$ коэффициент проницаемости, c_0 , c_i – концентрации ионов во внутреннем и внешнем растворах, омывающих биомембрану;

γ – коэфф. распределения;

u – подвижность иона.

Знание J позволяет рассчитать величину тока иона $I = zFJ$ и проводимость

биомембраны $g = \frac{dI}{d\varphi}$.

6.9 Вольт-амперные характеристики биомембраны в теории постоянного электрического поля

Выведенное выше уравнение Гольдмана позволяет получить величину ионного тока I и проводимости g биомембраны. Это позволяет охарактеризовать биомембрану с помощью понятия вольт-амперной характеристики, отражающей зависимость J от приложенной разности потенциалов.

Характерные точки ВАХ вытекают из упрощения уравнения Гольдмана: при $\varphi \rightarrow -\infty$ и $\varphi \rightarrow \infty$ получаем

$$J_{-} = \frac{P c_o z F \varphi}{RT} \quad \text{и} \quad J_{+} = \frac{P c_i z F \varphi}{RT}$$

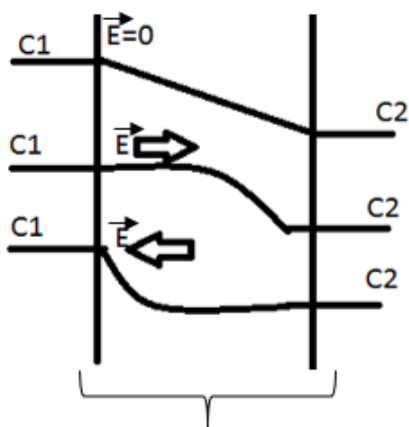
т.е. ВАХ линейна.

Из анализа вытекает, что ВАХ биомембраны может быть нелинейной и степень нелинейности определяется величиной перепада концентрации $c_o - c_i$ ионов на внутренней и внешней сторонах биомембраны. Нелинейность ВАХ указывает на то, что приложенный потенциал φ изменяет проводимость биомембраны, то $g=f(\varphi)$.

Физическая природа нелинейности ВАХ заключается в том, что приложенное электрическое поле E перераспределяет концентрации ионов внутри биомембраны. Профиль концентрации из-за этого может быть разным, следовательно, проводимость, вытекающая из решения уравнения Нернста-Планка (3) будет меняться.

Профиль концентрации

ионов



БМ

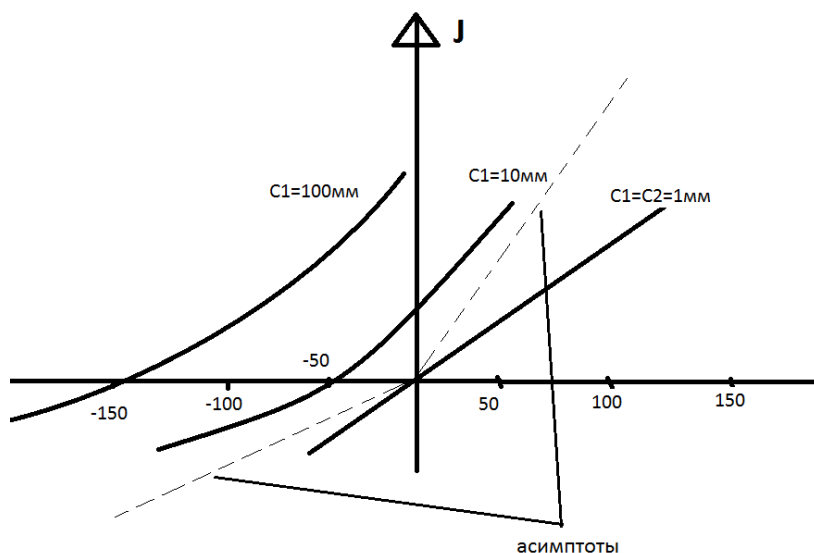


Рисунок 24. Вольт-амперная характеристика

6.10 Ионные каналы

Рассмотренный выше механизм пассивного транспорта ионов за счет электродиффузии опирается на представление о том, что биомембрана – это гомогенная структура. Вместе с тем, в большинстве случаев транспорт ионов реализуется не через электродиффузионный механизм, а через специальные ионные каналы – например, Na^+ , K^+ -каналы.

Согласно современным представлениям ион-селективный канал состоит из следующих частей: погруженный в бислой каналный белок, селективный фильтр и воротное устройство.

Тело канала состоит из трансмембранного белка, погруженного в липидный бислой (~ 2000 – 4000 аминокислот, остатков, уложенных в одну или несколько полипептидных цепей, несколько сотен сахарных остатков). Селективный фильтр представляет совокупность отрицательно заряженных атомов кислорода, расположенных на определенном расстоянии друг от друга и

фильтрующих ионы по размерам. Сенсор состоит из заряженных групп, движущихся под действием электрического поля.

Ион положительного знака подходит к каналу. Если он подходит по размеру, то сбрасывает водную оболочку. Потеря энергии при этом компенсируется энергетически выгодным взаимодействием иона с полярными группами самого канала.

Электрическое поле иона меняет конформацию сенсора, который вызывает механическое раздвижение белковых частей – ворот канала. Канал открывается и ион проходит через него.

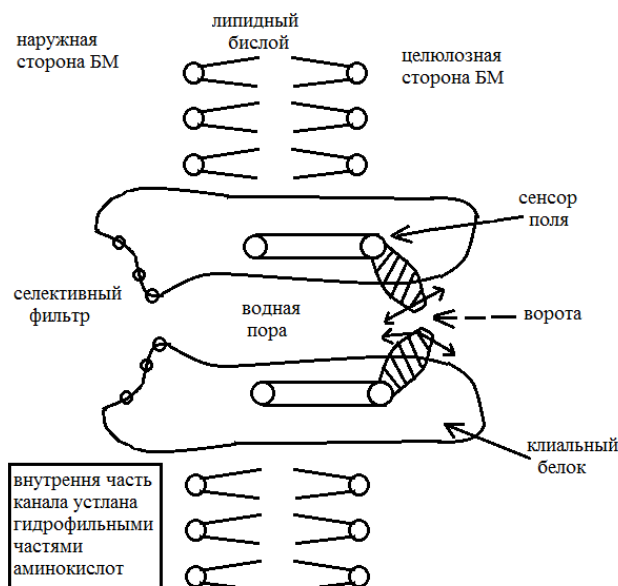


Рисунок 25. Ионный канал

Важнейшими особенностями ионных каналов является следующее:

1. Движение ионов в канале однородное и определяется не только электродиффузией, но и взаимодействием ионов друг с другом и с полярными группами канала.
2. Перемещение иона в канале определяется взаимодействием с полярными группами внутренней части, расположенными дискретно. Следовательно,

движение иона представляет собой перескок от одной группы к другой, от одной потенциальной яме, к другой. Перескок индуцируется тепловыми флуктуациями, а его вероятность – величиной действующего электрического поля.

3. Ион достаточно долго (по сравнению со временем тепловых флуктуаций) задерживается в каждой потенциальной яме. Перескок возможен только в пустую яму. Если яма уже занята ионом, то другой ион туда уже попасть не может. Это приводит к эффекту насыщения канала по достижению концентрации ионов определенного значения.
4. Скорость транспорта ионов зависит от вероятности связывания иона как со входом, так и с выходом канала, т. е. зависит от концентрации ионов как вне, так и внутри клетки. Если эти концентрации велики, то вход и выход с высокой вероятностью могут быть связаны с ионами независимо, в результате чего наблюдается эффект блокировки канала.

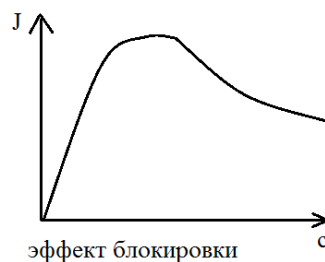


Рисунок 26. Скорость транспорта ионов

Движение иона в канале определяется его взаимодействием с молекулярными группами канала, что может быть охарактеризовано профилем потенциальной энергии иона в канале в виде ряда последовательных потенциальных ям и барьеров, в связи с этим уравнение для движения ионов можно вывести путем записи кинетических уравнений перескоков через барьеры в канале. Наиболее простым и достаточно общим оказывается случай, когда в биомембране существует всего 3 кинетических барьера: боковые барьеры соответствуют входным участкам канала, где происходит первичный процесс дегидратации, центральный барьер – селективному фильтру.

Возможны 2 варианта: внутренняя (сплошная) и граничная (пунктир) лимитирующие стадии

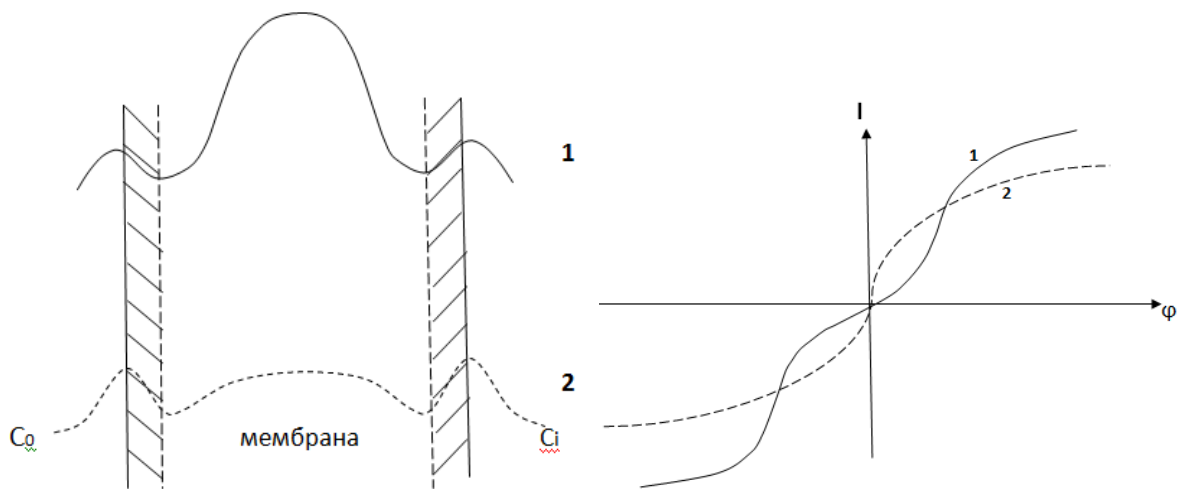


Рисунок 27. Ток через канал

Если ток через канал определяется переносом через центральный барьер (1), то ВАХ близка к линейной для относительно небольших полей. Если же ток определяется скоростью входа в канал, то при больших ϕ на биомембране все ионы, входящие в канал, будут переноситься через него, а ток стремиться к насыщению. Константы скорости переноса ионов через боковые барьеры слабо зависят от электрического поля, поскольку приложенная к биомембране разность потенциалов практически вся падает на внутренние части биомембраны, а падение ϕ на границе незначительно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.Ф. , Черныш А. М. , Пасечник В.Н. , Вознесенский С.А., Козлова Е.К. Биофизика. - М.: Владос, 2003. - 287 с.
2. Рубин А.Б. Биофизика. Кн. 2. Биофизика клеточных процессов. - М.: Высш. шк. 2000. - 467 с.
3. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии [Электронный ресурс] / редакторы К. Уилсон и Дж. Уолкер; пер. с англ. - 2-е изд. (эл.). - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. - 848 с.
4. Твердислов В.А. и др. Физические механизмы функционирования биологических мембран. - М.: МГУ, 1986. - 189 с.

У ч е б н о е и з д а н и е

**Евстигнеев Максим Павлович
Завьялова Оксана Стефановна
Савченко Елизавета Викторовна**

БИОФИЗИКА МЕМБРАН

Учебное пособие

В авторской редакции

Изд. № 196/19. Объем 3,75 п.л.
РИИЦМ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»