

Очень существенным является то обстоятельство, что молекулы фосфолипидов имеют два хвоста. Такая молекула в пространстве имеет форму, близкую к цилиндру (рис. 1.3). Из молекул фосфолипидов в водной среде происходит самосборка бислойной мембраны. Присутствие молекул с одним хвостом (лизолецитин), имеющих в пространстве форму, близкую к конусу, разрушает клеточные мембранны (рис. 1.4). Фосфолипидные молекулы, лишенные одного из хвостов, образуют поры в бислойной мембране, нарушаясь барьераная функция мембран.

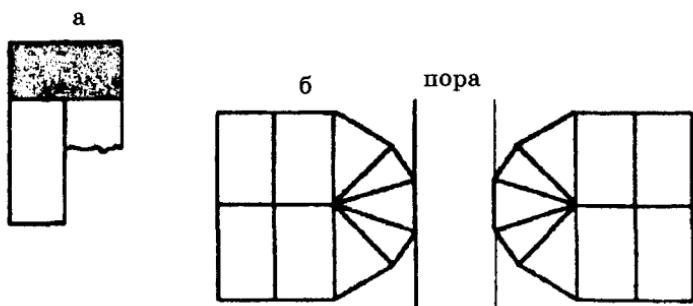


Рис. 1.4. Схематичное изображение “однохвостовой” фосфолипидной молекулы (а) и схема образования поры в мембране из “однохвостовых” молекул

§ 3. Динамика мембран. Подвижность фосфолипидных молекул в мембранах

Режим функционирования мембраны сильно зависит от: микровязкости липидного бислоя и подвижности фосфолипидных молекул в мембране, фазового состояния мембранных липидов. Отклонения биофизических характеристик липидного бислоя от нормы связано с разного рода патологиями. Важную роль в физиологии клетки играют фазовые переходы в биологических мембранах.

Липидная фаза биологических мембран при физиологических условиях (температуре, давлении, химическом составе окружающей среды) находится в жидкок агрегатном состоянии. Это доказано методами флюоресцентного анализа (с использованием флюоресцентных зондов и меток), электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), с использованием спиновых зондов и меток, и ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

В нормальном состоянии мембрана не флюоресцирует. Чтобы провести исследования мембранны флюоресцентным методом, надо вводить в мембрану молекулы или молекулярные группы, способные к флюоресценции. В качестве флюоресцентных зондов используются: ДМХ – диметиламинохалкон; МБА – 3-метоксибензантрон; АНС – I-анилин-нафталин-сульфонат и др. (рис. 1.5).

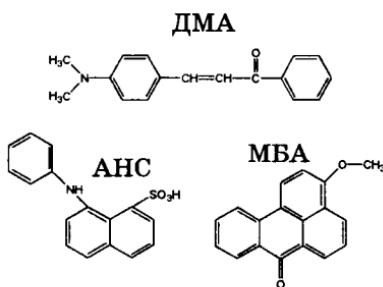


Рис. 1.5. Структура некоторых флюоресцентных зондов, применяемых при изучении биологических мембран

Флюоресцентный анализ дает возможность исследовать подвижность фосфолипидных молекул в мембране, оценить вязкость липидной фазы мембраны (так называемую микровязкость мембран). Микровязкость мембраны можно оценить по изменениям спектров флюоресценции, а также по степени поляризации Р флюоресцентного излучения при освещении мембраны поляризованным светом. Связь степени поляризации Р и микровязкости мембраны η выражается формулой Перрена и Яблонского:

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right),$$

где P_0 – степень поляризации света на неподвижных молекулах, $R = 8,31$ Дж / (К · моль) – универсальная газовая постоянная, T [К] – температура, V – молярный объем флюоресцирующих молекул, τ – время жизни возбужденного состояния.

Наиболее полные сведения об агрегатном состоянии липидных бислоев дают методы радиоспектроскопии ЭПР и ЯМР.

Электронный парамагнитный резонанс – это явление резко-го возрастания поглощения энергии электромагнитной волны

системой парамагнитных частиц (электронов с некомпенсированными спинами), помещенных во внешнее магнитное поле, при резонансной частоте волны $\nu_{\text{рез}}$.

Резонансное значение частоты

$$\nu_{\text{рез}} = \frac{g\beta B}{h},$$

где B – индукция магнитного поля, h – постоянная Планка, g – гидромагнитное отношение, или g -фактор, зависящий от природы парамагнитных частиц. Для свободного электрона $g \approx 2$. Магнетон Бора $\beta = 0,927 \cdot 10^{-23}$ Дж / Тл. Практически удобнее оставлять частоту ν электромагнитной волны постоянной, а медленно менять индукцию магнитного поля B . Резонансное поглощение энергии будет наблюдаться при

$$B_{\text{рез}} = \frac{\hbar\nu}{g\beta}.$$

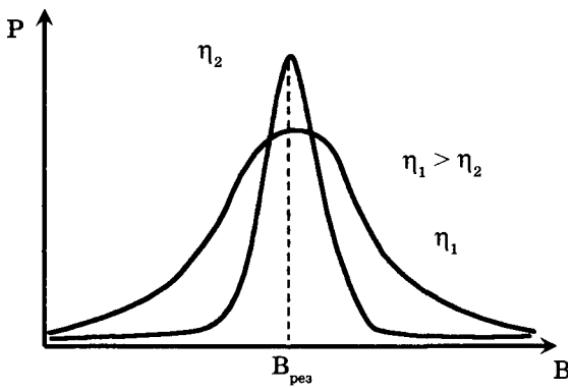


Рис. 1.6. Изменение спектров ЭПР при уменьшении микровязкости η (увеличении подвижности молекул) – схематичное изображение

В ЭПР используются частоты электромагнитного поля $\nu \sim 10^{10}$ Гц и индукция $B \sim 0,3$ Тл.

Спектром ЭПР называется зависимость мощности поглощения P электромагнитной волны от величины магнитной индукции B .

Чем сильнее взаимодействие между атомами и молекулами образца, тем спектры ЭПР шире. Чем слабее взаимодействие между частицами (больше подвижность молекул), тем уже спектры ЭПР (рис. 1.6). По ширине спектров ЭПР можно судить о подвижности молекул вещества.

Так как молекулы фосфолипидов диамагнитны, для ЭПР-исследований биомембран используются *спин-зонды* и *спин-метки* – молекулы или молекулярные группы с неспаренными электронами. Формула одного из таких соединений, часто используемого при ЭПР-спектроскопии мембран, дана на рис. 1.7.

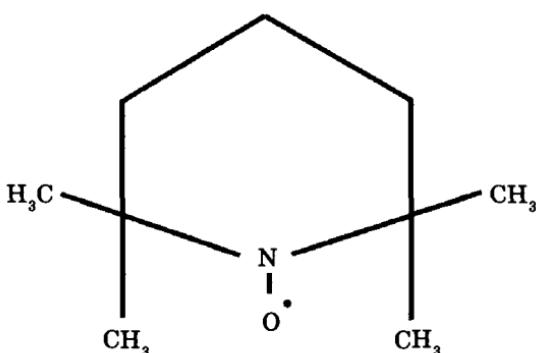


Рис. 1.7. Формула спинового зонда ТЕМПО
(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксин)

Парамагнитные спин-зонды вводятся в липидную мембрану, спектры поглощения спин-зондами электромагнитной волны дают информацию о свойствах липидного окружения, в частности о подвижности липидных молекул в мембране.

Несмотря на ценную информацию, которую удалось получить при исследовании биологических объектов методом ЭПР с использованием спиновых зондов, этот метод обладает существенным недостатком – внесение в биологический объект чужеродных молекул-зондов может изменять структуру объекта. От этого недостатка свободен метод ЯМР.

Ядерный магнитный резонанс – это явление резкого возрастания поглощения энергии электромагнитной волны системой атомных ядер, обладающих магнитным моментом, помещенных во внешнее магнитное поле, при резонансной частоте волны $\nu_{рез}$:

$$v_{\text{рез}} = g_a \frac{\mu_a B}{h},$$

где g_a – ядерный множитель Ланде, имеющий разные значения для разных парамагнитных ядер, для протона $g_a = 5,58$; μ_a – ядерный магнетон составляет $1/1836$ часть магнетона Бора.

Магнитным моментом обладают, например, такие ядра, как ${}_1^1\text{H}$, ${}_6^{13}\text{C}$, ${}_{15}^{31}\text{P}$. Не обладают магнитным моментом такие ядра, как ${}_2^4\text{He}$, ${}_8^{16}\text{O}$, ${}_6^{12}\text{C}$. В биологическом объекте содержится много ядер ${}_1^1\text{H}$ – протонов, что дает возможность применять для их исследования ЯМР. В ЯМР используются более сильные магнитные поля ($B \approx 1$ Тл), а частоты переменного электромагнитного поля меньше ($5 \cdot 10^7$ Гц), чем в ЭПР.

Как и в случае ЭПР, спектры ЯМР тем шире, чем больше вязкость и меньше молекулярная подвижность исследуемого объекта.

Флюоресцентные, ЭПР- и ЯМР-исследования показали, что подвижность фосфолипидных молекул в мембране сравнительно велика, а вязкость мала. В нормальных физиологических условиях липидная часть мембранны находится в жидким агрегатном состоянии. Вязкость липидной мембранны сравнима с вязкостью подсолнечного масла:

$$\eta \approx (30 - 100) \text{ мПа} \cdot \text{с}$$

(для сравнения: вязкость воды при 20°C составляет 1 мПа · с).

Изменение микровязкости липидного окружения мембранных белков-ферментов резко сказывается на их функционировании. Некоторые экспериментальные данные свидетельствуют о том, что канцерогенез связан со снижением вязкости липидной фазы мембранны, а при старении вязкость, напротив, увеличивается. Разрабатываются диагностические методы, основанные на измерении микровязкости мембранны с помощью спин-зондов.

Любопытно, что микровязкость мембранны у концов липидных хвостов меньше, чем около поллярных голов. Это доказано методом ЭПР с использованием спин-меток. Спиновые метки присоединялись к разным местам фосфолипидной молекулы. Как видно из рис. 1.8, второму положению спиновой метки соответствует более узкий спектр ЭПР, а следовательно, подвижность участка 2 фосфолипидной молекулы больше, чем участ-

ка 1. Поэтому в середине мембраны упорядоченность во взаимном расположении хвостов фосфолипидных молекул меньше.

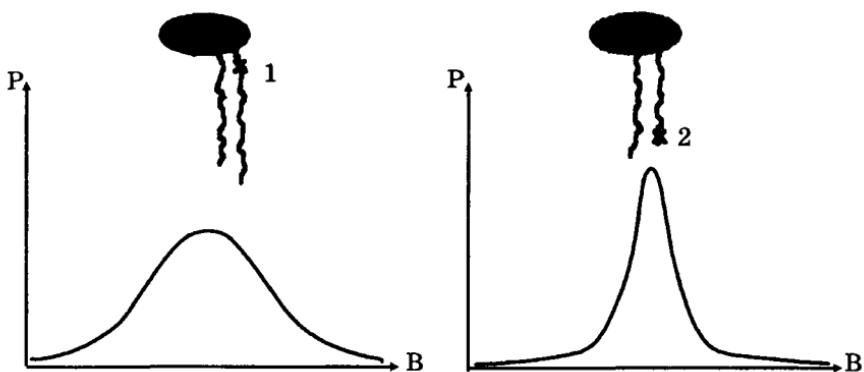


Рис. 1.8. Два способа прикрепления спиновой метки к фосфолипидной молекуле и различие спектров ЭПР для этих двух случаев – схематичное изображение

Высокая подвижность липидных молекул обусловливает латеральную (боковую) диффузию. Латеральная диффузия – это хаотическое тепловое перемещение молекул липидов и белков в плоскости мембраны. При латеральной диффузии рядом расположенные молекулы липидов скачком меняются местами и вследствие таких последовательных перескоков из одного места в другое молекула перемещается вдоль поверхности мембраны. Среднее квадратичное перемещение $S_{\text{кв}}$ молекул при диффузии за время t можно оценить по формуле Эйнштейна:

$$S_{\text{кв}} = 2\sqrt{Dt}.$$

Зная $S_{\text{кв}}$, можно найти значение коэффициента латеральной диффузии D .

Перемещение молекул по поверхности мембранны клетки за время t определено экспериментально методом флюоресцентных меток – флюоресцирующих молекулярных групп. Флюоресцентные метки делают флюоресцирующими молекулы, движение которых по поверхности клетки можно изучать, например, исследуя под микроскопом скорость расплывания по поверхности клетки флюоресцирующего пятна, созданного такими молекулами. Остроумный прием, используемый с целью определения скорости перемещения флюоресцирующих

молекул – фотообесцвечивание. В клетку вводят молекулы, меченные флюoresцентными метками, а затем небольшой участок клеточной поверхности (несколько квадратных микрометров) облучают лазерным лучом. Под действием лазерного излучения молекулы теряют способность флюoresцировать. Измеряя скорость восстановления флюoresценции в обесцвеченной области по скорости уменьшения радиуса обесцвеченного пятна, получают оценку скорости латеральной диффузии.

Оказалось, что среднее квадратичное перемещение за секунду фосфолипидной молекулы по поверхности мембранны эритроцита составило около 5 мкм, что сравнимо с размерами клеток. Таким образом, за секунду молекула может обежать всю поверхность небольшой клетки. Обнаруженное среднее квадратичное перемещение белковых молекул составило около 0,2 мкм за секунду.

Рассчитанные по формуле Эйнштейна коэффициенты латеральной диффузии для липидов $D_{лип} \approx 6 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2 / \text{с}$, для белков $D_b \approx 10^{-14} \text{ м}^2 / \text{с}$.

Частота перескоков (число перескоков в секунду) молекулы с одного места на другое вследствие латеральной диффузии может быть найдена по формуле:

$$v = 2\sqrt{3} \frac{D}{f},$$

где f – площадь, занимаемая одной молекулой на мемbrane.

Для молекул фосфолипидов $D_{лип} = 6 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2 / \text{с}$, $f \approx 7 \cdot 10^{-19} \text{ м}^2$. Для этих значений частота перескоков $v = 3 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$. Каждая молекула, таким образом, в среднем претерпевает десятки миллионов перестановок в плоскости мембранны за секунду, то есть характерное время одного перескока $\tau = 10^{-7} - 10^{-8} \text{ с}$.

Флип-флоп – это диффузия молекул мембранных фосфолипидов поперек мембранны.

Скорость перескоков молекул с одной поверхности мембранны на другую (флип-флоп) определена методом спиновых меток в опытах на модельных липидных мембранных – липосомах (см. § 5).

Часть фосфолипидных молекул, из которых формировались липосомы, метились присоединенными к ним спиновыми метками. Липосомы подвергались воздействию аскорбиновой кислоты, вследствие чего неспаренные электроны на молекулах пропадали: парамагнитные молекулы становились диамагнитными, что можно было обнаружить по уменьшению площади под кривой спектра ЭПР.

Сначала “нейтрализовались” неспаренные электроны молекул, расположенных на внешних поверхностях липосом, что приводило к уменьшению числа неспаренных электронов в два раза. ЭПР затем определялся спин-метками на внутренних, не доступных действию аскорбиновой кислоты поверхностях липосом. Однако площадь под спектрами ЭПР продолжала понижаться, что свидетельствовало об уменьшении числа неспаренных электронов. Это объяснялось перескоками меченых спин-метками молекул с внутренней поверхности бислойной мембраны липосомы на внешнюю – флип-флопом. По скорости уменьшения интенсивности сигнала ЭПР установлено, что половина меченых молекул претерпевает флип-флоп примерно за 6,5 часов, поскольку примерно через это время площадь под кривой спектра ЭПР (а следовательно, число неспаренных электронов) уменьшалась в два раза.

Таким образом, перескоки молекул с одной поверхности бислоя на другую (флип-флоп) совершаются значительно медленнее, чем перескоки при латеральной диффузии. Среднее время, через которое фосфолипидная молекула совершает флип-флоп ($T \sim 1$ час), в десятки миллиардов раз больше среднего времени, характерного для перескока молекулы из одного места в соседнее в плоскости мембранны.

Сочетание быстрой диффузии молекул вдоль мембраны и очень медленной диффузии поперек мембраны имеет большое значение для функционирования мембран, а именно для матричной функции мембранны (см. § 1). Благодаря затрудненному переходу поперек мембраны поддерживается упорядоченность в молекулярной структуре мембранны, ее анизотропия, асимметрия (относительно плоскости мембранны) расположения липидных и белковых молекул, определенная ориентация белков-ферментов поперек мембраны. Это имеет большое значение, например, для направленного переноса веществ через мембрану.

§ 4. Физическое состояние и фазовые переходы липидов в мембранах

Вещество при разных температуре, давлении, концентрациях химических компонентов может находиться в различных физических состояниях, например газообразном, жидком, твердом, плазменном. Кристаллическому твердому состоянию вещества могут соответствовать разные фазовые состояния (кристаллические модификации). В качестве примера разных кристаллических модификаций одного и того же вещества – углерода – можно назвать графит и алмаз.