

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.

Из средней школы известно, что характерными, отличительными чертами твердого тела являются собственный объем, форма, механическая прочность; жидкости – собственный объем, отсутствие упругости по отношению к изменению формы и механической прочности, текучесть.

Твердое тело может быть как кристаллическим (имеется дальний порядок в расположении частиц на расстояниях, много превышающих межмолекулярные расстояния – кристаллическая решетка), так и аморфным, например стекло (нет дальнего порядка в расположении атомов и молекул).

Различие между твердым аморфным телом и жидкостью состоит не в наличии или отсутствии дальнего порядка, а в характере движения частиц. И молекулы жидкости, и молекулы твердого тела совершают колебательные (иногда вращательные) движения около положения равновесия. Через некоторое среднее время – “время оседлой жизни” – происходит перескок молекулы в другое положение равновесия. Различие заключается в том, что время оседлой жизни в жидкости много меньше, чем в твердом теле.

Липидные бислойные мембранны при физиологических условиях – жидкые, время оседлой жизни фосфолипидных молекул в мембране мало: $\tau \approx 10^{-7} - 10^{-8}$ с.

Вместе с тем, молекулы в мембране размещены не беспорядочно, в их расположении наблюдается дальний порядок. Фосфолипидные молекулы находятся в двойном слое, а их гидрофобные хвосты приблизительно параллельны друг другу. Есть порядок и в ориентации полярных гидрофильных голов.

Физическое состояние, при котором есть дальний порядок во взаимной ориентации и расположении молекул, но агрегатное состояние жидкое, называется жидкокристаллическим состоянием.



Рис. 1.9. Расположение молекул в аморфном (а) и жидкокристаллическом состояниях (б, в, г)

Жидкие кристаллы могут образовываться не во всех веществах, а в веществах из “длинных молекул” (поперечные размеры которых меньше продольных). Могут быть различные жидкокристаллические структуры (рис. 1.9, б, в, г): нематическая (нитевидная), когда длинные молекулы ориентированы параллельно друг другу; смектическая (мылообразная) – молекулы параллельны друг другу и располагаются слоями; холестерическая – молекулы располагаются параллельно друг другу в одной плоскости, но в разных плоскостях ориентации молекул разные (поворнуты на некоторый угол в одной плоскости относительно другой).

Бислойная липидная фаза биологических мембран соответствует смектическому жидкокристаллическому состоянию.

Жидокристаллические структуры очень чувствительны к изменению температуры, давления, химического состава, электрическому полю. Это определяет динамичность липидных бислойных мембран – изменение их структуры при различных, даже небольших изменениях внешних условий или химического состава. При изменении условий вещество может перейти в другое фазовое состояние (например, из газообразного в жидкое, из жидкого в твердое, из одной кристаллической модификации в другую).

Как показано физическими методами исследования: дилатометрией (измерение коэффициента объемного расширения) и калориметрией (измерение теплоемкости), методом рентгеноструктурного анализа и др., липидная часть биологических мембран при определенных температурах испытывает фазовый переход первого рода. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, радиоспектроскопии, флюоресцентного анализа, инфракрасной спектроскопии и других физических исследований, в фосфолипидной мемbrane при понижении температуры происходит переход из жидкокристаллического в гель-состояние, которое условно иногда называют твердокристаллическим (рис. 1.10).

В гель-состоянии молекулы расположены еще более упорядочено, чем в жидкокристаллическом. Все гидрофобные углеводородные хвосты фосфолипидных молекул в гель-фазе полностью вытянуты строго параллельно друг другу (имеют полностью транс-конформацию). В жидком кристалле за счет теплового движения возможны транс-гош-переходы, хвосты молекул изгибаются, их параллельность друг другу в отдельных местах нарушается, особенно сильно в середине мембранны.

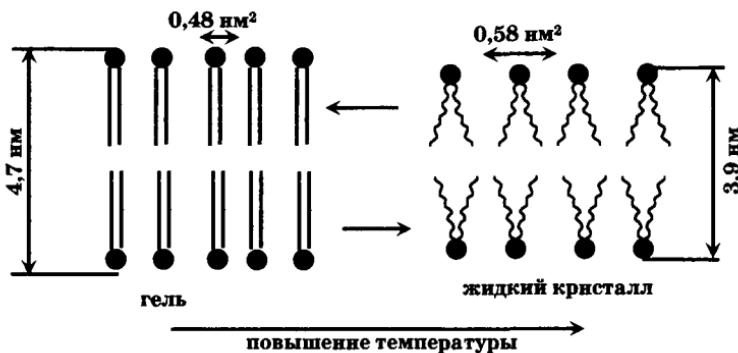


Рис. 1.10. Изменение структуры мембраны при переходе из жидкокристаллического в гель-состояние и обратно при изменении температуры

Толщина мембраны в гель-фазе поэтому больше, чем в жидкокристаллическом состоянии (рис. 1.10). Однако при переходе из твердого в жидкокристаллическое состояние объем несколько увеличивается, потому что значительно увеличивается площадь мембраны, приходящаяся на одну молекулу (от $0,48 \text{ нм}^2$ до $0,58 \text{ нм}^2$). Так как в твердокристаллическом состоянии больше порядок, чем в жидкокристалле, ему соответствует меньшая энтропия.

Для нормального функционирования мембрана должна быть в жидкокристаллическом состоянии. Поэтому в живых системах при продолжительном понижении температуры окружающей среды наблюдается адаптационное изменение химического состава мембран, обеспечивающее понижение температуры фазового перехода.

Температура фазового перехода понижается при увеличении числа ненасыщенных связей в жирно-кислотных хвостах. В хвосте молекулы может быть до четырех ненасыщенных связей.

В зависимости от химического состава липидных мембран температура фазового перехода гель – жидккий кристалл может меняться от -20°C (для мембран из ненасыщенных липидов) до $+60^\circ\text{C}$ (для насыщенных липидов). Увеличение числа ненасыщенных липидов в мембране при понижении температуры обитания наблюдается у микроорганизмов, растительных и животных клеток. Любопытный пример приспособления клеточных мембран к температурным условиям – изменение температуры фазового перехода (за счет изменения химического состава мембранных липидов) ноги полярного оленя. Темпера-

тура вдоль ноги полярного оленя от копыта до туловища может зимой меняться от -20°C до $+30^{\circ}\text{C}$. Клеточные мембранны у дистальной части ноги оленя содержат больше ненасыщенных фосфолипидов.

По-видимому, первичный механизм криоповреждений (повреждений при охлаждении) биологических мембран связан с фазовым переходом в гель-состояние. Поэтому биологические мембранны содержат большое количество холестерина, уменьшающего изменения в мембране, сопровождающие фазовый переход.

У некоторых микроорганизмов биологические мембранны находятся при температурах, лишь на немного превышающих температуру фазовых переходов липидов. Мембрана содержит десятки разных липидов, которым соответствуют разные температуры фазового перехода, в том числе близкие к физиологическим. При понижении температуры в мембране происходят фазовые превращения в липидном бислое.

В работах В.Ф. Антонова доказано, что при фазовых переходах из гель- в жидкокристаллическое состояние и обратно в липидном бислое образуются сквозные каналы, радиусом 1 – 3 нм, по которым через мембрану могут переноситься ионы и низкомолекулярные вещества. Вследствие этого при температуре фазового перехода резко увеличивается ионная проводимость мембранны.

Увеличение ионной проводимости мембран может спасти клетку от криоповреждений за счет увеличения выхода из клетки воды и солей – привести к нарушению ее барьерной функции, что препятствует кристаллизации воды внутри клетки. Повышение ионной проводимости мембран при фазовом переходе, возможно, позволяет поддерживать метаболический обмен некоторых микроорганизмов. Большой интерес представляет этот эффект для объяснения термо- и хеморецепции. Известно, что перенос ионов через мембрану лежит в основе формирования биопотенциалов, изменение ионной проводимости обусловливает нервный импульс. Не исключено, что нервный импульс, свидетельствующий о понижении или повышении температуры, образуется за счет изменения ионной проницаемости липидного бислоя при фазовом переходе мембранных липидов.

По-видимому, и некоторые виды хеморецепции могут быть связаны с фазовым переходом мембранных липидов, поскольку фазовый переход может быть вызван не только изменением температуры, но и изменением химического состава окружаю-

щей среды. Например, доказано, что при данной температуре фазовый переход из жидкокристаллического состояния в гель-состояние может быть вызван увеличением концентрации Ca^{2+} в физиологическом диапазоне от 1 до 10 ммоль/л в водном растворе, окружающем мембрану.

§ 5. Модельные липидные мембранны

Липосомы, или фосфолипидные везикулы (пузырьки), получают обычно при набухании сухих фосфолипидов в воде или при впрыскивании раствора липидов в воду. При этом происходит самосборка бимолекулярной липидной мембранны. Минимуму энергии Гиббса отвечает замкнутая сферическая одноламеллярная форма мембранны. При этом все неполярные гидрофобные хвосты находятся внутри мембранны и ни один из них не соприкасается с полярными молекулами воды (рис. 1.11). Однако чаще получаются несферические многоламеллярные липосомы, состоящие из нескольких бимолекулярных слоев, – многослойные липосомы.

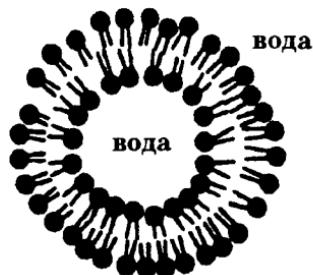


Рис. 1.11. Схема строения однослойной липосомы

Отдельные бимолекулярные слои многослойной липосомы отделены водной средой. Толщина липидных слоев составляет, в зависимости от природы липидов, 6,5 – 7,5 нм, а расстояние между ними – 1,5 – 2 нм. Диаметр многослойных липосом колеблется в пределах от 60 нм до 400 нм и более.

Однослойные липосомы можно получить различными методами, например из суспензии многослойных липосом, если обработать их ультразвуком. Диаметр однослойных липосом, полученных этим методом, составляет 25 – 30 нм. Разработаны и другие методы получения однослойных липосом, в том числе диаметром до 400 нм и более.