

встроенными в нее транспортными системами, включающими ионные насосы, систему молекул-переносчиков и высокоселективные ионные каналы.

Такое обилие систем переноса на первый взгляд кажется излишним, ведь работа только ионных насосов позволяет обеспечить характерные особенности биологического транспорта: высокую избирательность, перенос веществ против сил диффузии и электрического поля. Парадокс заключается, однако, в том, что количество потоков, подлежащих регулированию, бесконечно велико, в то время как насосов всего три (см. рис. 2.11). В этом случае особое значение приобретают механизмы ионного сопряжения, получившие название вторичного активного транспорта, в которых важную роль играют диффузные процессы. Таким образом, сочетание активного транспорта веществ с явлениями диффузационного переноса в клеточной мембране – та основа, которая обеспечивает жизнедеятельность клетки.

§ 9. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран

Бимолекулярный слой фосфолипидов составляет основу любой клеточной мембраны. Непрерывность его определяет барьерные и механические свойства клетки. В процессе жизнедеятельности непрерывность бислоя может нарушаться с образованием структурных дефектов типа сквозных гидрофильных пор. Вполне естественно ожидать при этом изменения всех функций клеточной мембраны, включая проницаемость и стабильность. Ранее эти проблемы обсуждались раздельно, однако создание модели липидной поры позволяет рассмотреть их с единых позиций. Важен тот факт, что липидные поры, помимо проницаемости, оказались причастными к стрессовым воздействиям внешних сил на уровне клеточных мембран.

Фосфолипиды, составляющие основу клеточных мембран, относятся к жидким кристаллам. Как в любом реальном кристалле, в пленке из фосфолипидов могут быть дефекты, в месте которых и развиваются основные события структурных перестроек. Виды дефектов многообразны, но и наиболее естественным для бислоя является дефект типа сквозной гидрофильной поры. Эти поры и будут предметом дальнейшего рассмотрения (рис. 2.13).

Липидные поры и стабильность мембран. Очевидное внешнее сходство любой шаровидной клетки с мыльным пузырем,

оказывается на самом деле более глубоким. В том и другом случае речь идет о важной роли пограничной бимолекулярной липидной пленки, свойства которой определяют стабильность и проницаемость частиц.

Различие заключается лишь в том, что мыльная пленка образуется на границе раздела с воздухом, а липидный бислой – в воде. Не удивительно поэтому, что часто липидные везикулы – липосомы – широко используются с целью моделирования мембранных свойств живой клетки. В настоящее время выяснено, что механическая прочность живой клетки наряду с липидным бислоем обеспечивается системой белковых микротрубочек и сетью мембранных белков. Однако это не умаляет роли самих липидных пор и связанного с ними механизма дестабилизации мембран, особенно в тех случаях, когда система микротрубочек отсутствует или не развита.

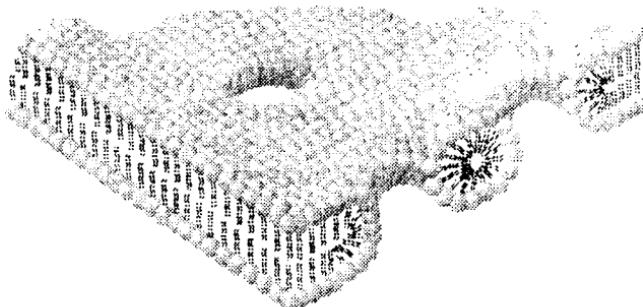


Рис. 2.13. Бислойная липидная мембрана с липидными порами

Известна нестабильность мыльного пузыря, причиной которой может стать любая пылинка. Началом дестабилизации является прокол стенки пузыря и образование поры. В липидной бимолекулярной пленке клеточной мембранны поры появляются, если исключить чисто механические повреждения, в результате тепловых флуктуаций поверхности бислоя, электрического пробоя, замораживания пленки, действия поверхностно-активных веществ, осмотического давления, перекисного окисления липидов и др. Один из наиболее типичных и хорошо изученных примеров дестабилизации биологических мембран – гемолиз эритроцитов. Это явление включает на начальном этапе набухание клеток в гипотонической среде в результате действия сил осмотического давления. Во время набухания клетки мембрана растягивается, что обуславливает рост мембранныго натяжения. При определен-

ном пороговом уровне натяжения появляются гидрофильные липидные поры. Размеры пор достаточны для выхода молекул гемоглобина и низкомолекулярных веществ. Выход веществ сопровождается в свою очередь снижением разности осмотического давления, при этом натяжение мембранны уменьшается и поры заливаются. Белки цитоскелета позволяют эритроциту сохранить форму, при этом образуется так называемая тень эритроцита. Тень сохраняет осмотическую активность и таким образом процесс дестабилизации приобретает циклический характер. Полного механического разрушения клетки подобного мыльному пузырю в этом случае не происходит. В отсутствие цитоскелета или его недостаточного развития механическая прочность клетки целиком определяется судьбой липидных пор. Если пора имеет размер меньше критического, то она заливается. В противном случае неограниченный рост поры приводит к разрушению мембранны.

Модель критической поры. Рассмотрим модель липидной поры (рис. 2.14). Будем считать, что боковая поверхность поры имеет форму кругового цилиндра. Более того, предположим, что боковая поверхность цилиндра изогнута и имеет радиус кривизны $h/2$. Радиус поры равен r . Как видно на рис. 2.14, липидный бислой в целом является плоским, а пора имеет два радиуса кривизны $h/2$ и r . Из физики известно, что искривление поверхности на границе раздела липид-вода сопровождается появлением добавочного давления, называемого лапласовым и равного

$$\Delta P = \frac{2\sigma^1}{r},$$

где σ^1 – межфазное натяжение внутри поры, r – радиус кривизны.

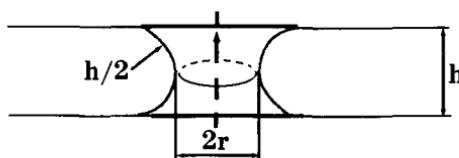


Рис. 2.14. Строение гидрофильной липидной поры: h – толщина липидного бислоя; $h/2$ – радиус кривизны стенки; r – радиус поры.

В рассматриваемой модели таких радиусов два ($h/2$ и r) и, следовательно, два давления. Одно из них $P(h/2)$ способствует расширению, а другое $P(r)$ – сжатию поры. Дальнейшая судьба

ба поры зависит от соотношения этих двух давлений. Если $P(h/2) > P(r)$, пора будет расширяться, а если $P(h/2) < P(r)$, то пора будет затекать.

Рассмотрим энергетику поры. Как установлено выше, на границе поры действуют две противоположные силы, одна из которых – краевое линейное натяжение периметра поры – способствует росту поры, а вторая сила – поверхностное натяжение бислоя – вызывает сжатие поры. Краевая энергия поры пропорциональна первой степени радиуса и увеличивает суммарную энергию, энергия поверхностного натяжения пропорциональна квадрату радиуса и снижает суммарную энергию. В результате суммарная энергия $E(r)$ равна

$$E(r) = 2\pi r^2 \sigma,$$

где первый член определяется энергией кромки поры с линейным натяжением γ , а второй – энергией поверхностного натяжения σ . Вид кривой на рис. 2.15 указывает на существование неустойчивого равновесия в точке максимума с критическими значениями энергии (E^*) и радиуса (r^*).

В точке равновесия $\frac{\partial E}{\partial r} = 0$ и уравнение превращается в тождество:

$$0 = 2\pi \gamma - 2\pi \sigma r^*,$$

откуда можно определить критический радиус поры r^*

$$r^* = \frac{\gamma}{\sigma}. \quad (2.11)$$

Высота энергетического барьера после подстановки r^* в уравнение (2.10) будет равна

$$E^* = \frac{\pi \gamma^2}{\sigma}.$$

С учетом неустойчивости равновесия можно утверждать, что появление пор с $r > r^*$ пора будет затекать и стабильность мембранны сохранится. Таков количественный критерий стабильности липидной бислоиной мембранны.

Электрический пробой мембран. Биологические мембранны находятся под действием электрического поля большой напряженности, создаваемого диффузией ионов через мембрану и электрогенными ионными насосами. Поскольку разность потенциалов между цитоплазмой и внеклеточной средой достиг-

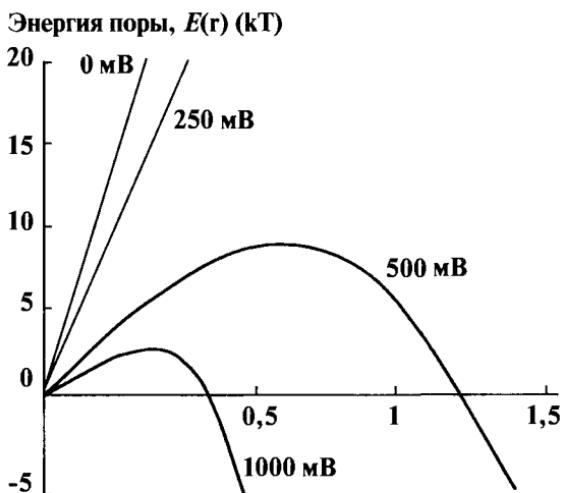


Рис. 2.15. Энергия поры как функция радиуса поры при различных значениях мембранных потенциала.

Расчет кривых произведен по уравнению 2.14

гает порядка 0,1 В, а толщина мембраны не превышает 10 нм, то напряженность поля равна 10^7 В/м. Интересно, что мембра на является более совершенным электрическим изолятором, чем многие жидкие изоляторы, применяемые в технике.

В некоторых случаях мембранный потенциал в живой клетке может быть выше и достигать 0,2 В (пресноводные водоросли, бактерии, энергизированные митохондрии). В возбудимых нервных и мышечных клетках происходит кратковременная реполяризация мембраны с ростом амплитуды потенциала. Однако пробой клеточной мембраны собственным мембранным потенциалом маловероятен. В то же время рост мембранныго потенциала в результате воздействия внешним электрическим полем может достигать величины, превышающей пороговую для электрического пробоя. При этом появляются структурные дефекты типа сквозных липидных пор. Разработанная методика электрического пробоя клеточных мембран получила название электропорации и широко применяется в биотехнологии.

В физике под электрическим пробоем понимают резкое увеличение силы электрического тока в первоначально слабопроводящей среде. В живой клетке такой средой служит бимолекулярный слой липида. Как было показано Ю.А. Чизмаджевым

и сотрудниками, формула должна быть в этом случае изменена путем введения дополнительного члена, отражающего вклад электрического поля:

$$E = 2\pi r\gamma - \pi r^2(\sigma + \frac{C\phi^2}{2}), \quad (2.13)$$

где $C = (\frac{\epsilon_B}{\epsilon_M} - 1)C_0$, ϵ_B – диэлектрическая проницаемость воды; ϵ_M – диэлектрическая проницаемость мембраны; ϕ – мембранный потенциал; C_0 – емкость единицы площади мембраны, не содержащей дефектов.

Зависимость энергии поры от ее радиуса для этого случая приведена на рис. 2.15. Показано семейство кривых, полученных по уравнению (2.10) для различных значений мембранныго потенциала. Чем больше мембранный потенциал, тем меньше значение энергии поры и тем больше смещается максимум кривой к началу координат. Анализ кривых показывает, что с увеличением радиуса энергия поры должна расти, поскольку увеличивается периметр поры, и одновременно энергия должна уменьшаться пропорционально росту поверхностного натяжения мембраны и мембранныго потенциала. В результате (см. рис. 2.15), появляется кривая с максимумом, что позволяет количественно оценить критические параметры мембраны – критический радиус поры и высоту энергетического барьера по формулам, приведенным выше. Высота энергетического барьера с учетом поля равна:

$$E^* = \pi r^2 / (\sigma + \frac{C\phi^2}{2}) \quad (\text{ср. с формулой 2.12, 2.14}).$$

Можно видеть, что с ростом мембранныго потенциала и поверхностного натяжения высота барьера снижается.

Критический радиус поры может быть рассчитан по формуле:

$$r^* = \gamma / (\sigma + \frac{C\phi^2}{2}) \quad (\text{ср. с формулой 2.11, 2.15}).$$

Его величина также уменьшается с ростом σ и ϕ . Из формулы следует, что зависимость критической поры от мембранныго потенциала становится заметной лишь при значительном превышении электрической составляющей над величиной поверхностного натяжения. Расчеты показывают, что для липидного бислоя в жидкокристаллическом состоянии величина мембранныго потенциала не может быть меньше 0,23 В.

Стабильность бислойных мембран определяется вероятностью появления пор критического радиуса. Очевидно, что любой фактор, снижающий высоту энергетического барьера, будет увеличивать эту вероятность. К таким факторам следует отнести снижение краевой энергии поры γ , рост поверхностного натяжения и рост мембранных потенциала. Как видно на рис. 2.14, рост пребойного напряжения до 1 В сопровождается смещением критического радиуса к значениям меньшим 0,5 нм, что близко радиусам природных ионных каналов клеточной мембранны. Отсюда следует, что электрический пробой сопровождается появлением широкого спектра липидных пор различного радиуса, включая радиусы ионоселективных белковых каналов. В настоящее время метод воздействия внешним электрическим полем является одним из основных в современной биотехнологии. Известно его применение с целью увеличения пористости мембран (электропорация), введения ДНК (электротрансфекция), освобождение клеток от крупных молекул (электропермеабилизация), слияния клеток (электрослияние).

Температурный фазовый переход мембранных липидов. Замораживание липидного бислоя в результате фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель сопровождается появлением липидных пор. Очевидно, что как и в случае с электрическим пробоем, судьбу мембранны буде определять соотношение радиусов образовавшихся пор и критических пор для данного состояния бислоя.

Величины ТФП были определены методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Опыты проводили на плоских бислойных липидных мембранах (БЛМ) в условиях фиксации напряжения. БЛМ формировались из динасыщенных синтетических и природных фосфолипидов, имеющих температуру фазового перехода указанного типа в области 40–60 °С. Регистрировались флуктуации тока, появление которых указывало на рождение пор (рис. 2.16). На рис. 2.16 видно, что исходно флуктуации тока отсутствуют и регистрируется только шум. Достижение температуры, соответствующей температуре основного фазового перехода (ТФП) липида, сопровождается появлением отдельных флуктуаций тока длительностью ~1 с. Слева на рисунке представлены реализации флуктуаций тока, справа – соответствующие гистограммы распределения по электрической проводимости. На рисунке показаны характерные записи флуктуаций тока для четырех индивидуальных фосфолипидов с различными температурами фазового перехода. Сопоставление реализаций тока и гистограмм показывает их однотипность для

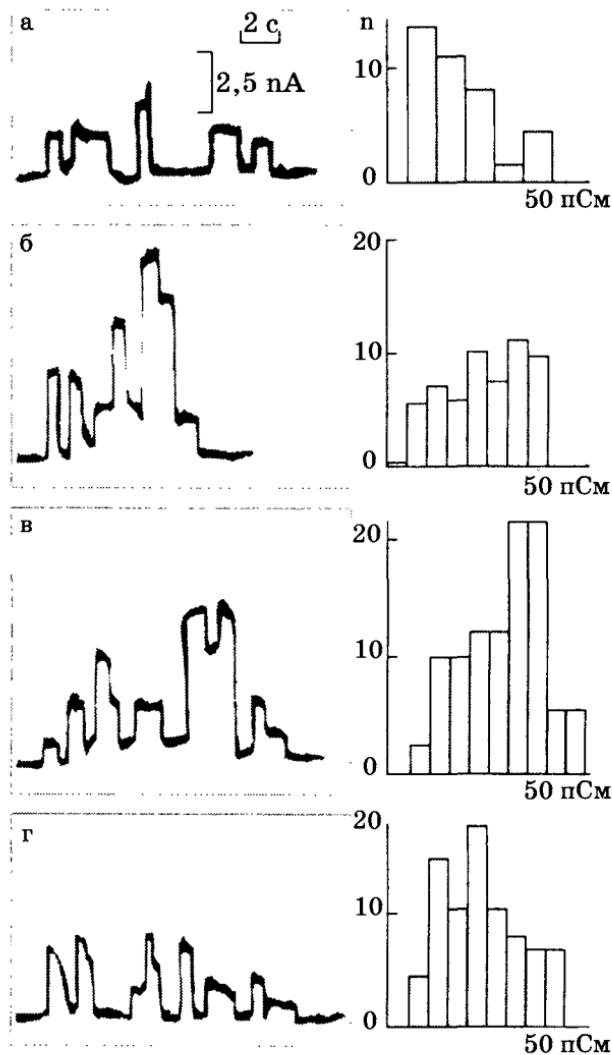


Рис. 2.16. Флуктуации трансмембранных токов и соответствующие гистограммы проводимости пор в плоской БЛМ при температурном фазовом переходе индивидуальных фосфолипидов. Слева – запись флюктуаций тока при замораживании БЛМ, справа – гистограммы проводимости.

Липидный состав БЛМ: а – дипальмитоилфосфатидилхолин (температура основного фазового перехода ($T_{ФП}$) = 315 К); б – дистеароил-фосфатидилхолин ($T_{ФП}$ 332 К); в – дипальмитоилфосфатидная кислота ($T_{ФП}$ 340 К); гидрированный яичный лецитин ($T_{ФП}$ 324 К).

изученных фосфолипидов. Предполагая, что каждый скачок тока соответствует одиночной поре в открытом состоянии, можно по проводимости рассчитать радиус поры.

Фазовый переход в БЛМ осуществлялся при малых мембранных потенциалах порядка 0,05 В. Как видно на рис. 2.15, при таких напряжениях вкладом электрического поля в дестабилизацию мембран можно пренебречь. В соответствии с формулой (2.11) единственной причиной уменьшения критического радиуса поры могло стать либо уменьшение в результате фазового перехода γ или увеличение σ . Считается, что γ является величиной, мало зависящей от фазового перехода. Речь таким образом может идти только об определении величины поверхностного натяжения бислоя для двух фазовых состояний. Оказалось, что замораживание бислоя приводит к росту поверхностного натяжения для всех изученных липидов. Для гидрированного яичного лецитина σ возрастило от $1,1 \cdot 10^{-3}$ до $5,6 \cdot 10^{-3}$ Н/м. С учетом этого по формуле (2.10) была рассчитана зависимость энергии поры от ее радиуса в жидкой и твердой мемbrane (рис. 2.17).

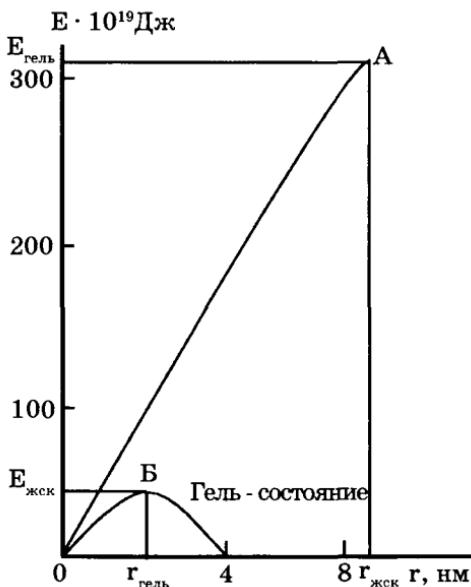


Рис. 2.17. Энергия поры как функция радиуса поры в жидкокристаллическом состоянии (A) и гель-состоянии (Б) мембранных липидов. Расчет произведен по формуле 2.12

Как следует из рис. 2.17, критический радиус поры в гель-состоянии значительно меньше по сравнению с жидкокристаллическим состоянием и по абсолютной величине не превышает 2 нм. Сохранение длительной устойчивости липидного бислоя в гель-состоянии свидетельствует о том, что существующие поры и поры, возникающие при фазовом переходе, имеют размеры меньше 2 нм. Сравнение рис. 2.15 и 2.17 демонстрирует высокую эффективность метода температурной обработки бислойных липидных мембран с целью получения популяции липидных пор, сравнительно с электрическим пробоем. Действительно, замораживание мембранных липидов в ходе фазового перехода, что для многих динасыщенных липидов происходит при комнатной температуре, эквивалентно электрическому пробою мембранных липидов внешним электрическим полем напряжением 0,5 В. В то же время очевидно, что электрические воздействия более удобны с точки зрения калибровки силы воздействия и его длительности.

Обобщая приведенные данные, можно утверждать, что любое воздействие механической, физической или химической природы, затрагивающее поверхностное натяжение липидного бислоя, является фактором риска в стабилизации поросодержащих мембран. Развитие такого подхода позволяет получить количественный ответ на важный для биологии о вероятности разрушения или залечивания мембран при типичных стрессовых состояниях живой клетки.

На рис. 2.17 показано, что критический радиус пор в мембранах, находящихся в жидкокристаллическом состоянии при отсутствии внешних воздействий, достигает 9 нм. Эта величина настолько значительна, что вероятность механического разрыва клеточных мембран в физиологических условиях очень мала. Разрыв мембранных, находящейся в таком состоянии, возможен лишь тогда, когда пора приобретает размеры, соизмеримые с толщиной мембранны. Опыт показывает, что полное разрушение липидного бислоя возможно лишь при грубых механических манипуляциях или необратимом электрическом пробое.

Важный практический вывод состоит в том, что опираясь на данные о критических радиусах пор (рис. 2.15 и 2.17), можно предсказать судьбу клеточных мембран в различных стрессовых состояниях (табл. 2.2).

Первый вывод, который можно сделать, заключается в том, что реальные поры во всех случаях меньше критического размера пор, характерного для жидкокристаллического состояния мембранных липидов. Действительно, размеры критических

Таблица 2.2. Размеры липидных пор в модельных и клеточных мембранах сравнительно с критическими порами, рассчитанными по уравнениям (2.11) и (2.15)

Радиус поры (r), нм	Объект	Соотношение радиусов пор	Стрессовое состояние
3,0 – 4,0	Эритроцит	$r_{\text{ЖКС}}^* > r_{\text{ЭП}}^* \geq r_{\text{г}}$	Электрический пробой
2,0	То же	$r_{\text{ЖКС}}^* > r_{\text{г}}$	Оsmотический гемолиз
1,2	L-клетки	$r_{\text{ЖКС}}^* > r_{\text{ЭП}}^* \geq r_{\text{г}}$	Электрический пробой
0,2 – 2,0	Липосомы	$r_{\text{ЖКС}}^* > r_{\text{г}}$	Оsmотический лизис
0,6 – 0,8	То же	$r_{\text{ЖКС}}^* > r_{\text{ГЕЛЬ}}^* \geq r_{\text{г}}$	Фазовый переход
0,5 – 2,0	То же	$r_{\text{ЖКС}}^* > r_{\text{ГЕЛЬ}}^* \geq r_{\text{г}}$	То же
1,2 – 1,8	БЛМ	$r_{\text{ЖКС}}^* > r_{\text{ГЕЛЬ}}^* > r > r_{\text{ГЕЛЬ+ЭП}}^*$	Фазовый переход

r^* – критический радиус поры в жидкокристаллическом состоянии мембранных липидов (жкс), гель-состоянии (гель), при электрическом пробое (эп), при сочетании гель-состояния с электрическим пробоем (гель+эп).

пор для липидного бислоя в жидкокристаллическом состоянии (9нм) значительно превышают размеры реальных пор, указанные в левом столбце. Таким образом, мембранны в различных стрессовых состояниях обладают значительным запасом прочности. Во-вторых, действие электрического пробоя и замораживания бислоя, как видно в последней строке, аддитивно. Такой результат можно ожидать, следовательно, и при других сочетаниях физических и химических воздействий. Стрессовое воздействие таким образом, независимо от его физико-химической природы, может быть количественно оценено и его результат предсказан в рамках рассматриваемой модели. Третий вывод касается частного случая гемолиза эритроцитов. Ранее было показано что критический радиус поры в липидном бислое при температурном фазовом переходе (см. рис. 2.17) достигает 2 нм, что совпадает с радиусом пор эритроцита при осмотическом гемолизе. Этот результат может объяснить известный в криобиологии факт гемолиза эритроцитов при оттаивании

замороженных клеток в изотонических условиях. Из первой строчки табл. 2.2, кроме того, следует, что простое замораживание мембранных липидов может привести к гемолизу. Помимо криобиологии, фазовый переход мембранных липидов играет важную роль в холодаустойчивости растений.

Модель формирования пор при фазовом переходе. Независимая оценка размера пор может быть получена путем исследования предложенной В.Ф. Антоновым и сотрудниками модели формирования пор. При фазовом переходе из жидкокристаллического состояния в гель по данным рентгеноструктурного анализа, происходит изменение толщины бислоя и площади на молекулу липида (см. рис. 1.10). Учитывая кооперативность фазового перехода, можно предположить, что молекулы в доменах, перешедших в гель-фазу, и остающихся в жидкокристаллическом состоянии, будут находиться в разных условиях. Относительно равновесного состояния молекулы в домене гель-фазы будут растянуты, а в жидкокристаллическом состоянии – сжаты. Появится упругое напряжение, которое приведет к нарушению структуры бислоя.

Для количественной оценки возникающих пор будем считать, что в гель-фазу перешло N молекул одного монослоя. В результате N молекул противоположного монослоя окажутся сжатыми относительно своей равновесной площади Na^f , где a^f – площадь на молекулу в жидкокристаллическом состоянии, и будут стремиться разорвать противоположный моносвой.

Упругая энергия деформированного участка бислоя задается в соответствии с формулой Юнга:

$$\Delta W = \Gamma \frac{(Na^f - Na^s)^2}{Na^f} = \Gamma \frac{N(\Delta a)^2}{a^f}, \quad (2.16)$$

где, $\Delta a = a^f - a^s$ – изменение эффективной площади молекул в плоскости бислоя при фазовом переходе, Γ – коэффициент упругости, равный примерно 50 МН/м .

Напряжения, возникающие в мембране, могут уменьшиться или исчезнуть, если появится гидрофобная пора с последующим превращением в гидрофильтрующую пору. При образовании поры появляется энергия натяжения кромки поры. Общее изменение энергии бислоя при образовании поры радиуса r будет равно:

$$\Delta G = \Gamma \frac{N(\Delta a - \pi r^2)^2}{Na^+} + 2\pi\gamma r, \quad (2.17)$$

здесь – γ – линейное натяжение кромки поры, параметр, введенный Дерягиным. В расчетах γ принимается равной 10 нН.

Рассмотрим изменение энергии мембраны от радиуса поры. Будем считать число молекул, одновременно переходящих в твердое состояние, равным размеру кооперативной единицы N . Величина кооперативной единицы может быть определена из соотношения:

$$N = \Delta H_{\text{вр}} / \Delta H_T, \quad (2.18)$$

где $\Delta H_{\text{вр}}$ – энталпия Вант-Гоффа, ΔH_T – энталпия перехода, определяемая по теплоте поглощения. Температуру фазового перехода T_n , полуширину перехода ΔT и энталпию ΔH_T определяли калориметрически. Значения кооперативной единицы для некоторых липидов представлены в таблице 2.3.

Таблица 2.3. Характеристики фазового перехода синтетических и природных липидов

Липид	$T_n, ^\circ\text{C}$	ΔH_T кДж/моль	N молекул
ДПФХ	41,7	35,3	100
ДПФК, pH 6,5	68	23,9	70
Гидрированный яичный лецитин	51	18,7	80

Зависимость энергии поры от радиуса представлена на рис. 2.18. Слева представлена эта зависимость при изменении N от 80 до 190 молекул. Изменение площади на головку при фазовом переходе, равное $0,1 \text{ нм}^2$, оценено по данным рентгеноструктурного анализа для лецитина. Видно, что изменение энергии, рассчитанное по уравнению 2.17, имеет минимум. Это означает, что появление поры энергетически выгодно. С ростом N значение радиуса в точке минимума растет. Справа на рис. 2.18 приведена зависимость энергии поры от радиуса для мембран с постоянным $N = 70$ и меняющейся Δa . Если Δa меньше $0,08 \text{ нм}^2$, то кривая монотонно возрастает. Начиная со значения $\Delta a \geq 0,09 \text{ нм}^2$ на кривой появляется локальный минимум, т.е. появление поры становится выгодным. С ростом Δa , также, как и с ростом N , значения радиуса поры в точке минимума возрастают. Таким образом, появление поры в мембране в облас-

ти фазового перехода энергетически выгодно. Для исследованных липидов минимум соответствует порам с радиусом 1,2 – 1,6 нм. Эти значения удовлетворительно совпадают с экспериментально определенными (см. табл. 2.2).

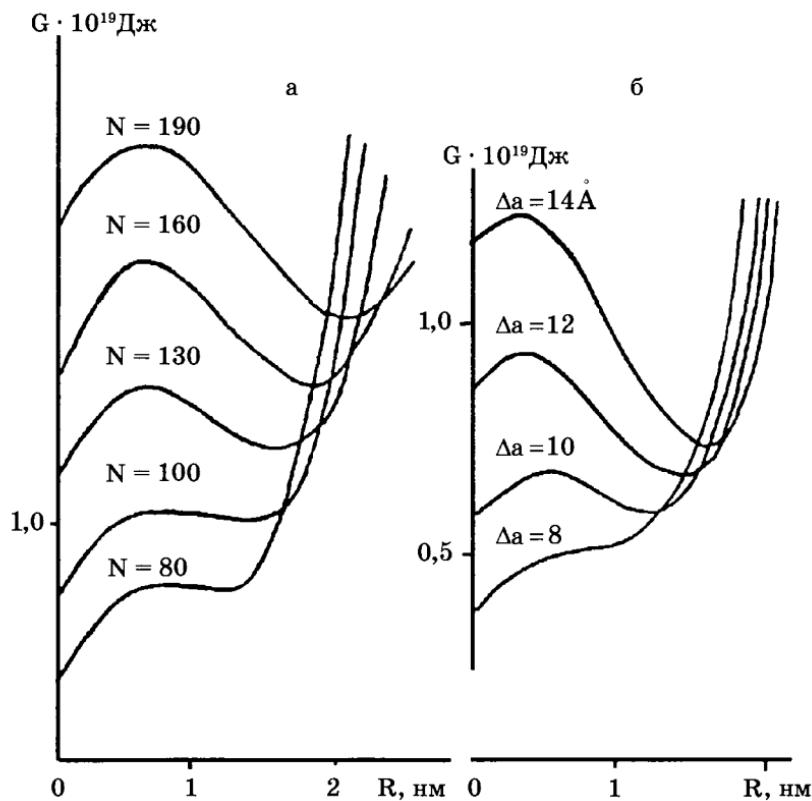


Рис. 2.18. Зависимость изменения энергии поры от радиуса, рассчитанная по уравнению (2.17); а – $\Delta a = 0,1 \text{ нм}^2$, N изменяется от 80 до 190 молекул, б – N молекул, Δa изменяется от 0,08 до 0,16 нм^2

Липидные поры и проницаемость мембран. С точки зрения проницаемости липидные поры принципиально отличаются от белковых каналов своим происхождением и исключительной динамичностью. В то время как белковые каналы имеют строго определенные размеры, сохраняющиеся в течение всей жизни клетки, размеры липидных пор в процессе затекания

варьируют в широких пределах. Однако эта изменчивость имеет предел. Если радиус поры меньше критического, то пора в процессе затекания должна пройти все промежуточные радиусы и достигнуть минимального размера. Вопрос о возможности полного затекания липидных пор остается открытым. Предполагается, что полному затягиванию поры препятствуют мощные силы гидратации, проявляющиеся при сближении стенок гидрофильных пор.

Липидные поры в отличие от белковых ионных каналов не обладают выраженной избирательностью, что коррелирует с их сравнительно большими исходными размерами (см. табл. 2.2). Ясно, однако, что в процессе затекания липидные поры могут достигать сколь угодно малых размеров, в том числе сравнимых с размерами белковых ионных каналов, что может приводить к перераспределению ионных токов в мембране, например, при возбуждении. Известно далее, что после выключения стрессового воздействия бислойная липидная мембрана может вернуться в состояние с низкой проводимостью, что подразумевает достижение порами размера, недостаточного для прохождения гидратированных ионов. Таким образом, гидрофильные липидные поры универсальны в том отношении, что могут быть использованы клеткой для транспорта высокомолекулярных веществ, ионов и молекул воды.

Исследования проницаемости липидных пор развиваются в настоящее время в двух направлениях: в первом исследуются максимально большие поры, во втором, наоборот, – липидные поры минимального радиуса. В первом случае речь идет об электротрансфекции – способе введения в живые клетки или липосомы молекул ДНК с целью переноса и внутриклеточного введения чужеродного генетического материала. Оказалось, что внешнее электрическое поле высокой напряженности способствует проникновению гигантской молекулы ДНК внутрь мембранный частицы. Как видно из табл. 2.2, максимальный размер критической поры соответствует жидкокристаллическому состоянию бислоя липидов в отсутствие внешнего электрического поля и равен 9 нм. Наложение внешнего электрического поля напряженностью 100 кВ/м понижает критический радиус поры до 1 нм за время 0,2 с. Поскольку при этом мембранны сохраняются, то размер липидных пор в них не превышает, очевидно, этого нижнего предела. Парадокс состоит в том, что эффективный диаметр статистического клубка ДНК, которая должна попасть внутрь частицы, достигает 2000 нм. Поистине задача про верблюда, проникающего сквозь игольное ушко. Поэтому очевидно,

что молекула ДНК должна проникать через мембрану в виде расплетенной одиночной нити. Известно, что конец нити имеет диаметр 2 нм и таким образом только-только может войти в пору. Однако свободная диффузия нити ДНК в поре при этом вряд ли возможна. К сожалению, механизм этого явления до конца не ясен. Предполагается, в частности, что молекула ДНК способна расширить пору и таким образом проскользнуть через мембрану. Проникновению ДНК могут способствовать дополнительные силы электрофореза и электроосмоса с учетом суммарного отрицательного заряда молекулы ДНК. Не исключено, что поры с фиксированными в них концами молекулы ДНК играют роль якоря, удерживающего молекулу в определенном месте у поверхности мембранных везикул, а сам процесс переноса является разновидностью пиноцитоза. Исследование этого интересного с точки зрения проницаемости явления продолжается.

Второе направление исследования проницаемости мембран с участием липидных пор связано с трансмембранным переносом молекул и ионов воды. Известное в биологии явление высокой водной проницаемости клеточных мембран полностью воспроизводится на искусственных липидных бислоях, что подразумевает участие в этом процессе гидрофильных липидных пор. Большой интерес в этой связи представляют результаты опытов Эламрани и Блума с суспензией липосом из фосфатидной кислоты в температурной области фазового перехода липида из жидкокристаллического состояния в гель. Проницаемость бислоя для молекул воды измеряли в опытах с тяжелой водой, проницаемость для ионов воды – методом pH-скачки. Основные результаты представлены в табл. 2.4.

Первое, что можно отметить, это огромное различие между коэффициентом проницаемости липидного бислоя для гидратированных ионов (ион натрия) и молекул (ионов) воды. Это различие достигает 9 порядков. Столь значительное различие свидетельствует в пользу предположения о том, что в процессе затекания липидные поры могут достигать размера, недостаточного для прохождения гидратированных ионов, но доступного для прохождения более мелких частиц – молекул и ионов воды. Кроме того, фазовый переход мембранных липидов в гель-состояние сопровождается скачкообразным уменьшением коэффициента проницаемости для ионов и молекул воды. Отсюда следует, что в ходе фазового перехода из множества липидных пор отбираются те, радиус которых не превышает 2 нм. И наконец, обращает внимание количественное совпадение коэффициентов проницаемости бислонной мембраны для мо-

лекул и ионов воды, а также их одинаковая динамика при фазовом переходе. Естественно предположить, что молекулы и ионы воды пересекают мембрану одним и тем же путем. Этот результат позволяет некоторым ученым вернуться к известной гипотезе о том, что липидный бислой насыщен дефектами типа трансмембранных цепочек молекул структурированной воды. С точки зрения молекулярной организации структура молекул воды в этом случае идентична структуре льда. Молекулы воды связаны между собой водородными связями. Предполагается, что протоны могут передвигаться по системе межмолекулярных водородных связей. Можно предложить, что такие льдо-подобные цепочки воды возникают в липидном бислое в момент рождения или затекания липидных пор.

В пользу возможности протонной проводимости на границе раздела водной фазы с полярной частью фосфолипидного бислоя свидетельствуют данные о латеральной протонной проводимости на границе липидного бислоя с водой. Вдоль монослоя из фосфатидилэтаноламина создавался градиент pH и измерялась продольная скорость переноса протона путем регистрации флюoresценции меченого в полярной головке фосфолипида. Одновременно производили измерения поверхностного потенциала и поверхностного давления. Показано, что протон движется вдоль монослоя липида в том случае, если этот моносвой организован и упорядочен. Скорость переноса значительно превышала скорость диффузии протонов в воде. Эффект был обнаружен в монослоях из большинства природных фосфолипидов. Полная дегидратация фосфолипидов в полярной области приводила к потере протонной проводимости. Авторы предполагают, что молекулы воды на границе раздела липид-раствор образуют четыре слоя: объемный слой раствора, слой гидратной воды, молекулы воды в котором непосредственно взаимодействуют с полярными группами молекулы липида; слой молекул воды, связанный водородной связью с молекулами липида на уровне карбонильной группы, и, наконец, трансмембранные водные мостики. В целом на поверхности липидного бислоя образуется сеть водородных связей, обеспечивающих быстрый перенос протонов. Предполагается при этом, что протоны, передвигающиеся в системе водородных связей на поверхности бислоя, не смешиваются с протонами объемного слоя воды. Таким образом, возможен мембранный обмен протонами между протонными каналами и протонными насосами, минуя раствор электролита, омывающего мембрану. Кроме того, молекулы липида в кромке липидной поры способны, как показано в последнее время, участвовать в

быстрым флип-флоп обмене. В сочетании с латеральной миграцией протонов, этот механизм также способствует эффективному трансмембранныму переносу протонов.

Таблица 2.4. Проницаемость липидного бислоя для молекул и ионов воды

Частица	Липид	Коэффициент проницаемости, см/с	Температура
Протон / гидроксил*	Димиристоилфосфатидная кислота	10^{-5}	$T < T\Phi P^{**}$
Протон / гидроксил	Димиристоилфосфатидная кислота	10^{-3}	$T > T\Phi P$
Молекула воды	Дипальмитоилфосфатидная кислота	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$T < T\Phi P$
Молекула воды	Дипальмитоилфосфатидная кислота	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$T > T\Phi P$
Ионы натрия	Яичный лецитин	$\sim 10^{-12}$	$T > T\Phi P$

* Сочетание протон / гидроксил используется потому, что примененный метод не позволяет разделить потоки протонов и гидроксидов.

** $T\Phi P$ – температура фазового перехода жидкокристаллическое состояние – гель.

Основной вывод состоит в том, что стабильность липидного бислоя и клеточной мембраны, лишенной белкового каркаса, определяется липидными порами. Эти поры образуются в местах дефектов жидкокристаллической структуры липидного бислоя. Липидные поры возникают в результате тепловых флуктуаций поверхности бислоя, а также могут рождаться при мембранным стрессе, сопровождающем фазовый переход мембранных липидов, при электрическом пробое и осмотической лизисе. Судьба мембраны в этих случаях будет зависеть вероятностным образом от того, будет ли липидная пора превышать некоторый критический размер или нет. В первом случае мембрана порвется, во втором случае ее структура сохранится. При сохранении стабильности мембран поры заличиваются, пробегая при этом все промежуточные значения радиусов. Минимальные радиусы липидных пор могут стать сравнимыми с размерами избирательных белковых каналов, регулирующих в норме ионную проницаемость клеточных мембран. На последних этапах затекания липидные поры мо-

гут превращаться в водные поры, доступные только для молекул и ионов воды.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ, ЗАДАЧИ, ЗАДАНИЯ

1. Критический радиус липидной поры в мембране зависит от краевого натяжения поры, поверхностного натяжения мембранны и мембранныго потенциала. Вывести формулу для критического радиуса поры. Рассчитать критический радиус поры при отсутствии мембранныго потенциала. Принять краевое натяжение поры 10^{-11} Н, поверхностное натяжение липидного бислоя 0,3 мН / м.

2. Как изменится облегченная диффузия ионов калия с участием молекулы валиномицина после фазового перехода мембранных липидов из жидкокристаллического состояния в гель?

3. Осмотический эффект в живых клетках сопровождается их набуханием в гипотоническом растворе и сжатием в гипертоническом. Будет ли наблюдаться осмотический эффект при накоплении ионов натрия по схеме антипорта? -схеме симпорта?

4. Показать, что уравнение Нернста-Планка сводится к уравнению Фика для диффузий незаряженных частиц.

5. Фермент $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -АТФаза в плазматической мембране эритроцита совершил шесть циклов. Какое количество ионов натрия и калия при этом было активно транспортировано? Сколько энергии было при этом израсходовано, если гидролиз одного моля АТФ сопровождается освобождением 33,6 кДж? Эффективность процесса энергетического сопряжения считать 100 %.

6. В клеточных мембранах известны три ионных насоса: $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -насос, протонный насос, кальциевый насос. Каким образом осуществляется при этом активный транспорт сахаров и аминокислот?

7. Возможен ли одновременный трансмембранный перенос ионов калия и натрия по схеме симпорта? По схеме антипорта? По схеме унипорта?

ТИПОВЫЕ ТЕСТЫ ТЕКУЩЕГО КОНТРОЛЯ

2.1. Перенос ионов происходит в направлении:

пассивный транспорт

1. $\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$
2. $\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$
3. $\tilde{\mu}_1 < \tilde{\mu}_2$

активный транспорт

- | | |
|---------------------------------|--|
| $\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$ | |
| $\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$ | |
| $\tilde{\mu}_1 < \tilde{\mu}_2$ | |

2.2. Уравнение диффузии неэлектролитов (Фика) записывается:

$$1. J_m = D \frac{dc}{dx}$$

$$3. J_m = -D \frac{dc}{dx}$$

$$2. J_m = D \frac{dc}{dt}$$

$$4. J_m = -D \frac{dc}{dt}$$

2.3. Молекула валиномицина переносит через мембрану:

- 1. K^+ и Na^+
- 2. Ca^{2+}

- 3. Cl^- и OH^-
- 4. K^+

2.4. Перенос вещества при облегченной диффузии идет по сравнению с простой диффузией:

- 1. в противоположную сторону
- 2. быстрее
- 3. медленнее
- 4. с такой же скоростью

ГЛАВА 3. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ

Одна из важнейших функций биологической мембранны – генерация и передача биопотенциалов. Это явление лежит в основе возбудимости клеток, регуляции внутриклеточных процессов, работы нервной системы, регуляции мышечного сокращения, рецепции. В медицине на исследование электрических полей, созданных биопотенциалами органов и тканей, основаны диагностические методы: электрокардиография, электроэнцефалография, электромиография и другие. Практикуется и лечебное воздействие на ткани и органы внешними электрическими импульсами при электростимуляции.

В процессе жизнедеятельности в клетках и тканях могут возникать разности электрических потенциалов:

- 1) окислительно-восстановительные потенциалы – вследствие переноса электронов от одних молекул к другим;
- 2) мембранные – вследствие градиента концентрации ионов и переноса ионов через мембрану.