

3) генерация и проведение возбуждения — содержат каналы, обменники и насосы, обеспечивающие транспорт ионов;

4) энергетическая — обеспечивают синтез АТФ в мембранах митохондрий и хлоропластов;

5) матричная — обеспечивают расположение и ориентацию белков и их взаимодействие;

6) адгезивная — обеспечивают межклеточные взаимодействия;

7) двигательная — обеспечивают процесс движения клетки;

8) секреторная — обеспечивают процесс экзо- и эндоцитоза.

Липиды ПМ подразделяют на фосфолипиды, гликолипиды, холестерин, триглицерол, стероиды и свободные жирные кислоты. Белки ПМ выполняют ряд функций (клеточное узнавание, рецепция, соединение отдельных комплексов и т. д.) и подразделяются на интегральные и периферические. Интегральные белки пронизывают липидный бислой ПМ и связаны с фосфоинозиотидами. Периферические белки локализованы на поверхности ПМ (ферменты; белки, координирующие форму цитоскелета; белки, связанные с гликокаликсом).

Для ПМ клетки характерно явление асимметрии, при котором распределение и состав липидов на цитоплазматической поверхности мембраны отличаются от распределения и состава на экстраклеточной. Явление асимметрии ПМ необходимо для:

— поддержания исходной формы клетки;

— фиксации белковой ориентации, способствующей максимальному проявлению их активности (фермент, канал);

— распознавания антигенов;

— регуляции вязкости ПМ;

— обеспечения процесса выведения старых клеток.

В настоящее время рассматриваются несколько общих факторов, регулирующих состояние ПМ. К ним относят действие температуры, состав жирных кислот, содержание холестерина, контакт ПМ с цитоскелетом, действие детергентов, анестетиков и гормонов.

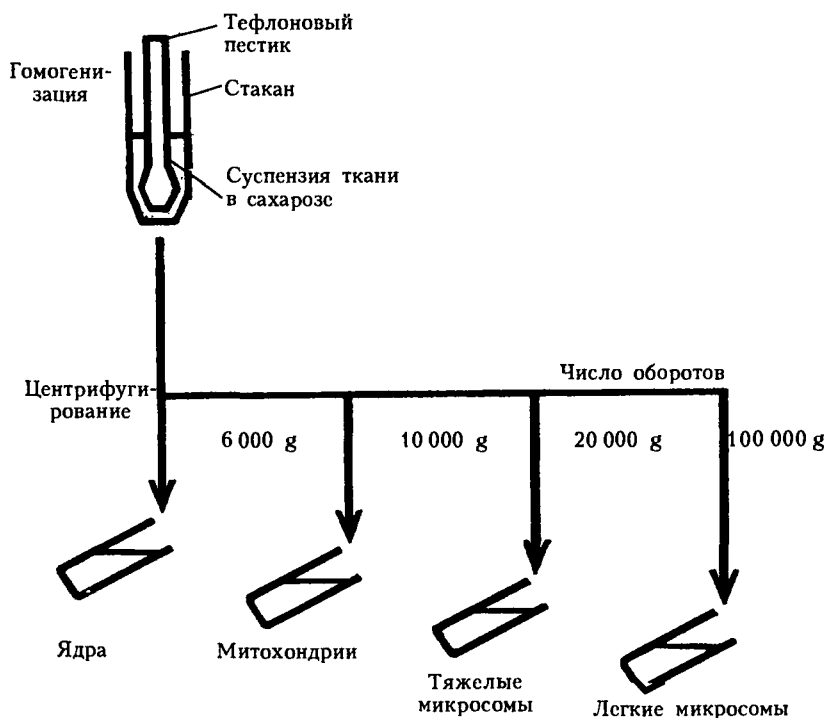
Особый интерес представляют данные о наличии в ПМ специализированных областей (доменов). Функциональное значение данных структурных модификаций ПМ заключается в определении различий между апикальной и базолатеральной поверхностями полярных клеток, создании барьеров между апикальной и базолатеральной мембранами, изменении характера процессов рецепции.

2.1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

В соответствии с задачами эксперимента при исследовании мембран применяются следующие методы.

2.1.1. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ

Для исследования молекулярного состава и структуры ПМ их выделяют из клеток путем разрушения (гомогенизации) и отделения центрифугированием. Известно, что в зависимости от плотности частицы осаждаются с разной скоростью и при постоянном центробежном ускорении скорость осаждения частиц пропорциональна их массе. Так, при ускорении 6 000 g осаждаются ядра, затем митохондрии, а при 20 000 – 100 000 g – микросомы (фрагменты мембран ЭР) (рис. 2.2).



Р и с. 2.2. Разделение тканей на субклеточные фракции методом центрифугирования

Для более полного разделения центрифугирование проводят несколько раз. При получении фракций, содержащих в основном мембраны одного типа, субклеточные фракции центрифугируют в градиенте плотности сахарозы или фикола. С целью идентификации и проверки чистоты полученных субклеточных фракций проверяют наличие при-

месей с помощью светового и электронного микроскопов; анализируют липидный состав или активность маркерных ферментов. В процессе проведения указанных операций некоторые (возможно, очень важные) компоненты нативных мембран могут быть утрачены. Поэтому следует обращать внимание на разные виды контроля.

2.1.2. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МЕМБРАН

При изучении структуры мембраны большое значение имеют методы фазово-контрастной микроскопии, основанной на том, что структурные элементы с разными показателями преломления имеют неодинаковую яркость. Различные детали клеток можно, таким образом, дифференцировать, но мембраны при этом не видны, так как световой микроскоп позволяет видеть объекты размером не менее 20 нм, а толщина биомембран, как уже упоминалось, не превышает 10 нм.

Разрешающая способность электронных микроскопов гораздо выше. При длине волны, используемой в электронной микроскопии (1 – 2 нм), можно различать объекты размером 0,5 – 1,0 нм, т. е. даже крупные молекулы. Электронная микроскопия позволяет связать данные о структуре объекта с результатами химического анализа. Однако этот метод имеет ряд существенных недостатков, которые необходимо учитывать при работе с биологическим материалом. Ведь предварительно исследуемый объект обезживают, фиксируют, затем контрастируют солями тяжелых металлов, что может привести к его искажению.

В последнее время в биофизике внедряется динамическая лазерная микроскопия, с помощью которой исследуются изменения формы живых объектов в трехмерном изображении.

Одним из наиболее точных методов исследования структуры молекул, составляющих мембрану клетки, является метод рентгеноструктурного анализа, основанный на дифракции рентгеновских лучей. Как правило, это явление наблюдается в тех случаях, когда на пути лучей встречаются препятствия, сравнимые по размеру с длиной волны луча. Если на исследуемый объект направляют параллельный пучок рентгеновских лучей, а за объектом помещают фотопленку, то на ней фиксируется дифракционная картина. На рентгенограмме наблюдается множество пятен (дифракционных максимумов), образующихся в результате интерференции лучей. Анализ рентгенограммы дает сведения о структуре объекта на молекулярном (и даже атомном) уровне. Ценность метода заключается в том, что появляется возможность, во-первых, изучить пространственное расположение молекул, точно измерить расстояние между ними, оценить их внутримолекулярную структуру, во-вторых, определить структуру молекулярных компонентов мембраны в нефиксированных клеточных препаратах.

Следующим традиционным методом исследования состояния мем-

бран является ядерный магнитный резонанс. В основе ЯМР-спектроскопии лежит физическое явление поглощения электромагнитных волн (в радиочастотном диапазоне) ядрами атомов, обладающими магнитным моментом. При биологических исследованиях часто используют ^{13}C , ^1H , ^{31}P . Структура ЯМР-спектров зависит от величины диполь-дипольных взаимодействий между данным ядром и соседними ядрами, неоднородностью магнитного поля и т. д. Процессы релаксации, связанные с диполь-дипольными взаимодействиями, служат мерой, характеризующей «подвижность» отдельных атомов и молекул. Метод ЯМР позволяет получать информацию с высокой точностью об избирательном поведении отдельных частей молекул белков и липидов, составляющих биологическую мембрану.

В настоящее время имеются спектры ЯМР многих белков, что делает возможным наблюдение за структурными изменениями, сопровождающими их функционирование, а также изучение состояния воды в биологических мембранах. ЯМР на ядрах ^{31}P применяют при исследовании структуры и поведения фосфолипидов в модельных и природных мембранах. Достоинство метода заключается в том, что в этом случае получают сведения непосредственно от молекулы конкретного фосфолипида, а не от посредника, как, например, при работе со спиновыми зондами. К недостаткам метода относят то, что ЯМР-спектры сложны и часто плохо разрешимы, кроме того, он имеет относительно малую чувствительность (концентрация образца должна быть не ниже 10^{-3} моль/л).

Метод электронного парамагнитного резонанса широко используется для исследований в области молекулярной и клеточной биофизики. Это явление было открыто русским физиком Е. К. Завойским в 1944 г. В дальнейшем оно послужило основой для создания метода спектроскопии ЭПР, который успешно применяют при изучении структуры молекул, содержащих парамагнитные частицы, а также кинетики изменений положения частицы при модификации конформации самой молекулы или ее соседей. В биологических объектах наиболее распространенными парамагнитными частицами являются свободные радикалы и ионы. Парамагнитными бывают ионы переходных металлов — Fe, Co, Ni, Cu, Mn. Метод ЭПР дает возможность наблюдать их окислительно-восстановительные превращения и судить об изменении конформации включающих их комплексов. С помощью ЭПР исследуют также триплетные состояния, возникающие, например, в ходе фотобиологических реакций. Очень большое значение для мембранологии имеет использование спиновых зондов и меток, когда в исследуемую систему (в данном случае в мембрану) вводят стабильные свободные радикалы, по изменению характеристик спектров ЭПР которых судят о структурно-динамическом состоянии молекул мембраны.

Результаты, получаемые с помощью метода ЭПР (используются магнитные свойства электронов) и ЯМР (используются магнитные

свойства атомных ядер), дают возможность выяснить структурную организацию мембран и их изменения при функционировании. Кроме того, они дополняют электронно-микроскопические данные об ультраструктурной организации мембран.

При изучении структурной организации мембран применяются и многие другие физические методы, например флуоресцентная спектроскопия. Известно, что флуоресценция в клетках сопровождается возникновением электронно-возбужденных состояний, когда электрон переходит из основного состояния в возбужденное. Полученная молекулой энергия может расходоваться в виде тепла или излучаться в виде света. Испускание света осуществляется более длительное время, чем поглощение.

При работе с биологическими объектами, в частности с клеточными мембранами, регистрируют либо собственную флуоресценцию отдельных молекул ПМ, либо флуоресценцию зондов или меток, специально связанных с макромолекулой и введенных в клетку. Различают флуоресцентные зонды, связывающиеся с молекулами мембраны нековалентно, и флуоресцентные метки, образующие с молекулами мембраны химическую связь. При включении метки или зонда в мембрану их флуоресцентные свойства меняются, что дает информацию о структурных особенностях изучаемой системы.

Для исследования отдельных компонентов мембраны большой интерес представляют методы колебательной спектроскопии: инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния.

Кроме описанных выше методов изучения биологических мембран важную роль играет моделирование — формирование искусственных моно- или бислойных липидных мембран и протеолипосом базирующиеся на том, что амфипатические молекулы липидов способны образовывать на границе раздела вода — органический растворитель мономолекулярные пленки. В настоящее время широко используются методы получения моно- и бислойных липидных мембран, а также методы формирования замкнутых пузырьков — везикул, липосом (рис. 2.3, 2.4). В такие мембраны, как правило, вводят белки или мелкие фрагменты мембран, выделенных из клетки (протеолипосомы). Так как липидный бислой — обязательный компонент биологической мембраны, результаты, полученные при исследовании физических характеристик модели мембраны и ее проводимости, имеют большое значение для понимания ряда процессов организации и функционирования нативных биологических мембран. Возможности такого рода моделирования еще более расширяются при формировании протеолипосом (рис. 2.5).

Представленные методы применяются при исследовании практически всех видов клеточных мембран.

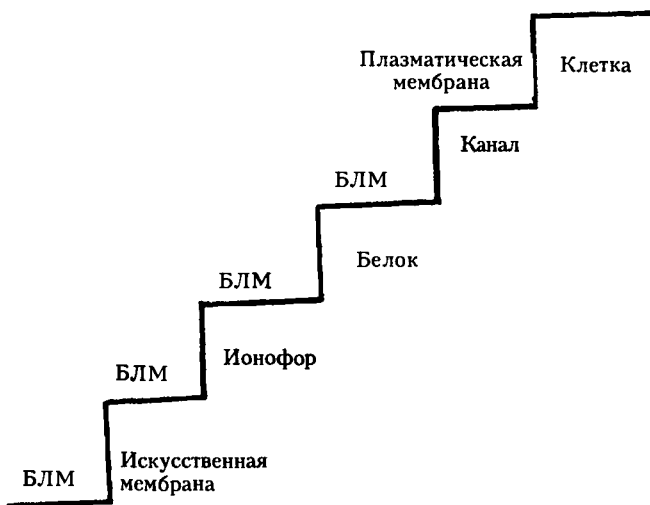


Рис. 2.3. Иерархия моделей биологических мембран

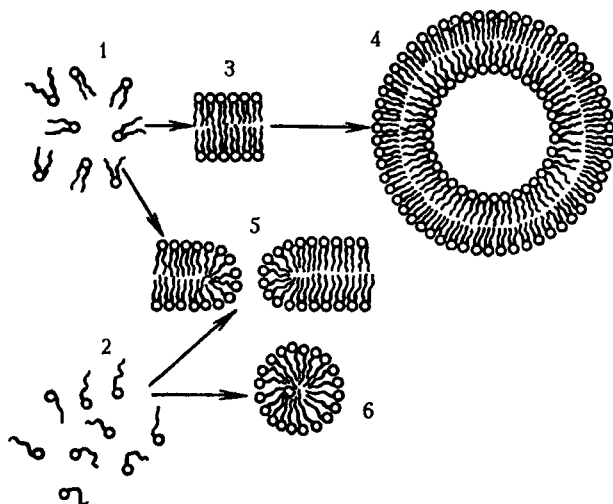
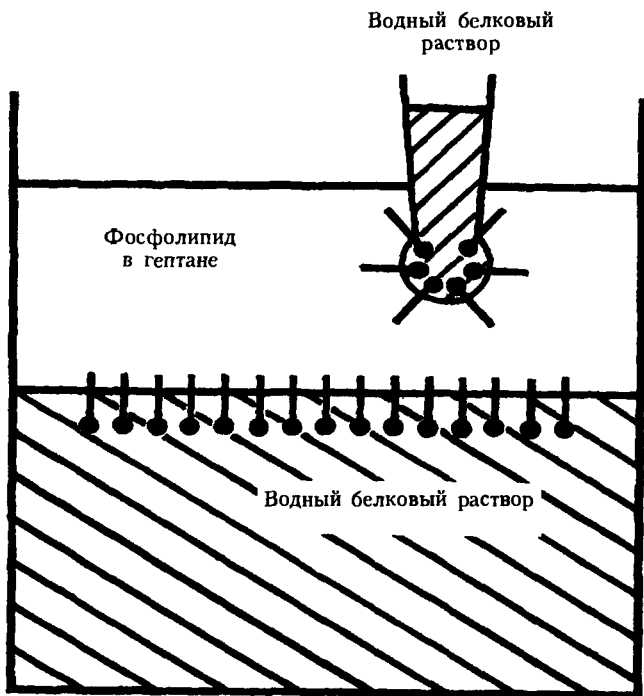


Рис. 2.4. Самосборка фосфолипидных везикул в водном растворе: 1 — молекулы фосфолипидов; 2 — их лизоформы; 3 — бислойная мембрана; 4 — липосома; 5 — пора в бислойной мембране; 6 — мицелла



Р и с. 2.5. Один из способов конструирования искусственного липидного бислоя: один монослой образуется на границе раздела вода — гептан, другой — вокруг капли водного раствора, внесенного пипеткой в гептан; при их соприкосновении появляется истинный двойной слой

2.2. СОСТАВ И СТРУКТУРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

Как отмечалось выше, основными компонентами биологических мембран являются липиды, белки и углеводы, причем в процентном отношении большая часть массы приходится на долю белков и липидов. Кроме того, в мембранах выявлены такие минорные компоненты, как нуклеиновые кислоты, полиамины и неорганические ионы, а также связанная вода. Соотношение основных структурных компонентов — белков и липидов — значительно колеблется в зависимости от вида мембраны. Так, в мембранах митохондрии массовая доля белка составляет 60 — 65 %, а липидов — 35 — 40 %. В миелиновой оболочке нерва содержится всего 20 — 40 % белка, остальные 60 — 80 %