ЛЕКЦИЯ № 18

СТРОЕНИЕ И ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН.

ЯВЛЕНИЯ ПЕРЕНОСА.

1. СТРОЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Клетка является наименьшей структурной и функциональной единицей всего живого на Земле является клетка. Она обладает всеми свойствами живого организма: обменивается с окружающей средой веществом, энергией и информацией, растет, размножается, передает по наследству свои признаки, реагирует на раздражение, способна двигаться. Она может жить отдельно. Изолированные клетки, даже многоклеточных организмов, продолжают жить и размножаться в питательной среде.

Важнейшую роль в создании структуры клетки и её функционировани играют биологические мембраны. Мембраны не только отделяют клетку от внешней среды, обеспечивая прочность и автономность клеток, но и образуют оболочки ядра и всех клеточных органоидов. Мембраны разделяют содержимое эукариотических клеток на отсеки (компартаменты) и регулирую процессы жизнедеятельности клетки, связанные с переносом вещества. Кроме упомянутых барьерной и транспортной, мембраны выполняют так же защитные, матричные и информационные функции. Мембраны играют большую роль в генерации и проведении потенциалов, в клеточном дыхании, являются местом локализации мембранных ферментов, макро энергетических соединений, рецепторов и других, встроенных в мембраны молекул, а также чувствительными приемниками и преобразователями световых, звуковых, механических и химических сигналов внешнего мира. Мембранные структуры в организмах животного и человека имеют колоссальную по площади поверхность – десятки тысяч квадратных метров. Это указывает на чрезвычайно важное функциональное значение мембран.

Многие болезни связаны с нарушением нормального функционирования мембран: канцерогенез, атеросклероз, отравление, вирусные и инфекционные заболевания, поражение организма УФ- и радиоактивным излучением. Поэтому лечение часто связано с воздействием на мембраны с целью нормализации их функций.

 Мембраны в основном состоят из фосфолипидов (около 20 видов), белков, гетерогенных молекул (гликопротеидов, гликолипидов) и в меньших количествах из некоторых других веществ. Липиды составляют 20-30% сухого веса мембраны, при этом считается, что на одну молекулу белка приходится приблизительно 75-90 молекул липидов. Наличие липидов в структуре биологических мембран подтверждается результатами измерений электрических параметров клетки, которые свидетельствуют о высоком сопротивлении клеточных мембран (порядка 102 – 105 Ом/см2), характерной для липидов, и значительной емкости (0,5 мкФ/см2).

Многие свойства биомембран (растяжимость, эластичность, способность к сокращению, более низкое, чем у липидов поверхностное натяжение) привели к предположению, что в их структуре, наряду с липидами, присутствуют и белки. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия можно установить виды мембранных белков и их количество. Содержание белка в мембранах разное: порядка 18 % в миелине, 50 % в плазматических мембранах и до 70% в мембранах митохондрий и хлоропластов. Последние функционируют как преобразователи энергии.

Исходя из структурного положения и различий в прочности связей с мембраной, белки подразделяются на периферические и интегральные. Изучение положения белков осуществляется методами оптической и электронной микроскопии. Например, локализацию белков во внутренней части мембраны изучают электронно-микроскопическим методом замораживания-скалывания. Фрагмент мембраны замораживают в жидком азоте. Ножом микротома делают продольный раскол бислоя. Поверхность скола путем напыления покрывают слоем угля или платины, получая отпечаток

(реплику ) рельефа поверхности скола.

По результатам химических и физических исследований С.Сингер и Г. Николсон в 1972 г. предложили общепринятую в настоящее время, так называемую жидкостно-мозаичную модель строения мембран. Основой, матриксом мембраны, является фосфолипидный бислой, который вместе с матричной функцией создает среду, необходимую для действия специфических белков, отвечающих за исполнение отдельных функций мембран: транспортной, передачи информации, преобразование энергии. При обычной для клетки температуре матрикс находится в жидкокристаллическом состоянии, что обеспечивается определенным соотношением между насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами в гидрофобных хвостах полярных липидов. Фосфолипидная основа как бы двумерный растворитель, в котором плавают более или менее погруженные белки. Отдельные белки насквозь пронизывают мембраны, образуя поры.

 Диаметр каналов определяется косвенным путем по размерам водорастворимых молекул, которые еще способны проникать через поры мембран внутрь клетки. С помощью этого и других методов было установлено, что диаметр пор составляет 0,35-0,8 нм.

Достоверные сведения о структуре липидного бислоя и ее (структуры) в связи с функциями мембран в дальнейшем были получены с помощью рентгеноструктурного анализа, методами ИК и радиоспектроскопии ( ЭПР, ЯМР ), путем получения спектров комбинационного рассеяния. Было установлено, что при низких температурах липидный бислой по своему поведению ближе к жидкостям, т. е. переходит в жидкостнокристаллическое состояние, при этом отдельные молекулы обретают способность совершать латеральные переходы и значительно более редкие и длительные из одного слоя в другой. В жидкокристаллическом состоянии бислой имеет меньшую толщину, меньшую вязкость, меньшую упорядоченность молекул, бóльшую ионную проводимость, бóльшую растворимость веществ, чем в твердом состоянии. Различна и конформация (структура) молекул в жидком и твердом состояниях. Это подтверждается данными рентгеноструктурного анализа. В жидкой фазе молекулы фосфолипидов имеют структуру октаэдров и могут образовывать полости («кинки»), которые способны перемещаться. Внедрившись в такую полость, любые молекулы получают возможность диффундировать вместе с «кинком» по мембране.

Мембрана является динамичной структурой, т.к. белки и липиды довольно подвижны. Они обмениваются местами, перемещаясь как вдоль поверхности мембран (латеральная диффузия), так и поперек – так называемый "флип-флоп".

Подвижность молекул в мембране, вязкость липидной фазы (микровязкость) и некоторые другие свойства дает возможность исследовать флюоресцентный анализ. Увеличение вязкости приводит к смещению спектра флюоресценции в область более коротких волн. Сама мембрана в нормальном состоянии не флюоресцирует. Поэтому, при использовании этого метода, в мембрану необходимо вводить молекулы или молекулярные группы, способные к флюоресценции – флюоресцентные зонды и метки. С этой целью используют молекулы диметиламинохалкона (ДМХ), анилин-нафталин-сульфонат (АНС) и другие вещества.

 Микровязкость можно оценить так же по степени поляризации флюоресцентного излучения. Мембрана освещается полностью поляризованным светом. Излучение флюоресценции оказывается лишь частично поляризованным. Чем больше подвижность флюоресцирующей молекулы, тем меньше вязкость, тем меньше степень поляризации. Такие исследования показали, что вязкость липидного слоя мембран на два порядка выше вязкости воды и равна 30-100 мПа·с (сравнима с вязкостью подсолнечного масла).

Многие болезни связаны с отклонением микровязкости липидной фазы от нормы. Например, канцерогенез связан со снижением вязкости, а при старении организма вязкость возрастает.

Поверхность мембраны представляют собой границу раздела: вода-белок. Силы поверхностного натяжения, действующие на этой границе, стремятся сократить площади белковых монослоёв на внутренней и наружной поверхностях мембраны. Это приводит к сжатию липидного бислоя. Измерения коэффициента поверхностного натяжение дали значения 0,1 ÷ 1 мН/м, что хорошо согласуется с данными по белкам.

Наиболее полное представление об агрегатном состоянии липидных бислоев дают методы радиоспектроскопии – электронный парамагнитный (ЭПР) и ядерный магнитный резонанс (ЯМР).

Методом ЭПР можно изучать только те соединения, атомы которых имеют в структуре своих электронных оболочек не спаренные электроны (свободные радикалы). Поэтому, в случае отсутствия таких соединений исползуют спин-метки и спин-зонды, которые вводят в изучаемую структуру. В качестве спин-меток и спин-зондов используют соединения, представляющие собой различные нитроксильные радикалы (), которые можно присоединить к любому атому углерода углеводородной цепочки молекул липидов. При этом метка замещает какую-либо группу, образуя с молекулой ковалентные связи. Соединения-зонды встраиваются в молекулы липидов и удерживаются там электростатическими или гидрофобными силами.

 По характеру изменения спектра ЭПР можно безошибочно обнаружить не только перемещения хвоста с присоединённой сигнальной группой, но и определить скорость латеральной диффузии (D ≈ 1,8·10-8 см2с-1). Было установлено, что скорость поперечного перемещения (флип-флоп) липидов в бислое в 103 раз меньше, чем латерального. В жидкокристаллической фазе жирнокислотные цепи фосфолипидов обладают значительно большей подвижностью, чем в твердой фазе.

Методом ЭПР установлено снижение подвижности липидов при возрастании содержания холестерина, а так же при перекисном окислении и действии ряда лекарственных препаратов. Увеличение подвижности отмечено при тиреотоксикозах и ряде других патологий. Недостаток метода: внедрение зонда или метки изменяет химическую структуру молекул фосфолипидов.

Этого недостатка лишён метод ЯМР, но это более дорогой и сложный метод исследования. Ценность этого метода состоит в том, что по спектрам ЯМР можно судить как о количестве тех или иных молекулярных групп (пропорционально площади соответствующего пика), так и о их подвижности (ширина соответствующей полосы).

С точки зрения электродинамики мембрана представляет собой диэлектрик с относительной диэлектрической проницаемостью от 2 до 6. Селективная проницаемость мембран и различия в концентрации для ионов разных знаков, приводит к образованию двойного электрического слоя. Экспериментально показано, что между внутренней и наружной сторонами мембраны существует разность потенциалов в 50-80 мВ (в некоторых случаях более 200 мВ). Учитывая толщину мембраны (7-8 нм), это даёт для напряженности электрического поля в мембране значения порядка 104 ÷ 105 В·см–1 (пробой воздуха происходит при напряжённости 3∙104 В·см–1).

2. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВА ЧЕРЕЗ БИОМЕМБРАНУ

 **ПАССИВНЫЙ ПЕРЕНОС. ПРОСТАЯ И ОБЛЕГЧЁННАЯ ДИФФУЗИЯ**

В зависимости от того, что является движущей силой перемещения, все виды переноса можно разделить на пассивные и активные. Пассивный транспорт веществ осуществляется за счет энергии, сконцентрированной в каком-либо градиенте и не связан с затратой химической энергии гидролиза АТФ. Наиболее значимыми для биологических систем являются градиенты концентрации – dc/d*x*, электрического потенциала – dφ/d*x* и гидростатического давления – dр/d*x*.

Выделяют следующие виды пассивного переноса через биологические мембраны: ***простая диффузия, диффузия через поры, облегченная диффузия, осмос и фильтрация:***

а)***Простая диффузия – это самопроизвольное перемещение вещества из мест с большей концентрацией в места с меньшей концентрацией вследствие хаотического теплового движения частиц.***Рассмотрим в качестве примера диффузию из клетки незаряженных частиц определённого вида через биологическую мембрану толщиной *l*. Запишем уравнение Фика через концентрацию вещества данного вида в растворе. Не трудно видеть, что для раствора масса растворённого вещества в единице объёма и есть его массовая концентрация (кг/м3). Теперь плотность потока вещества через поверхность мембраны в направлении нормали к ней, в соответствии с (10), запишется:

, (1)

где D – коэффициент диффузии, Δc/Δ*x* – градиент массовой концентрации

вдоль направления переноса. Будем считать, что концентрация частиц, диффундирующих через мембрану, изменяется в мембране по линейному закону от значения сi,м до значения со,м (рис.1). Тогда градиент концентрации можно выразить соотношением: 

 . (2)

Измерить концентрации со,м  и с*i*,м  в приграничных слоях мембраны практически невозможно. Поэтому воспользуемся соотношением:

, (3)

где со  и с*i* концентрации данного вещества в межклеточной жидкости и цитоплазме, соответственно. С учётом того, что с*i*,м = k с*i* , a со,м = k со , получим:

 . (4)

С учётом (4) уравнение диффузии частиц через мембрану примет вид:

  – уравнение Коллендера. (5)

Величина Р = Dk / *l*  называется ***коэффициентом проницаемости***.

Проницаемость характеризует способность биологических мембран пропускать или не пропускать молекулы, атомы и ионы. Изучение проницаемости играет важную роль для медицины и, особенно, для фармакологии и токсикологии. Для лечения необходимо знать проникающую способность фармакологических средств и ядов через мембрану в норме и при патологии.

В живой клетке такая диффузия обеспечивает прохождение кислорода и углекислого газа, а также ряда лекарственных веществ и ядов.

**б) *Диффузия через липидные и белковые поры или каналы*** (рис.6). Такой механизм проникновения сквозь мембрану характерен для молекул нерастворимых в липидах веществ и водорастворимых гидратированных ионов. Этот вид переноса допускает проникновение через мембрану не только малых молекул, например, молекул воды, но и более крупных частиц. Значение проницаемости при этом определяется размерами молекул: с ростом размеров молекул их проницаемость уменьшается. Каналы могут проявлять селективность или избирательность по отношению к разным ионам, это проявляется в разной величине проницаемости для разных ионов.

Рис. 2

Диффузия через поры также описывается уравнением Фика. Наличие пор увеличивает значение коэффициента проницаемости Р.

в) ***Облегченная диффузия*** происходит при участии молекул-переносчиков. Было обнаружено, что скорость проникновения в клетку глюкозы, глицерина, аминокислот не имеет линейной зависимости от разности концентраций. Для определенных концентраций скорость проникновения вещества через мембрану намного больше, чем следует ожидать для простой диффузии. При увеличении разности концентраций скорость диффузии возрастает в меньшей степени, чем это следует из уравнения Коллендера (5). В данном случае наблюдается облегченная диффузия. Её механизм состоит в том, что вещество A, которое самостоятельно плохо проникает через мембрану, способно образовать комплекс с молекулами X вспомогательного вещества (рис.7), которое хорошо растворяется в липидах. Молекулы вещества Х, оказавшись у поверхности мембраны, образуют с молекулами А комплекс AX, который способен растворяться в липидах. Оказавшись в результате диффузии по другую сторону мембраны, некоторые из комплексов отщеплют молекулы A. Молекула X возвращается к наружной поверхности мембраны и может образовать новой комплекс с молекулой А. Разумеется транспорт вещества А таким способом происходит в одну и другую сторону. Поэтому результирующий перенос возникнет только при условии, что концентрация А по одну и другую стороны мембраны разная. Таким способом, например, антибиотик валиномицин переносить через мембраны ионы калия.

Рис. 3

Соединения, обладающие способностью избирательно увеличивать скорость переноса ионов через мембрану получили название ***ионофоров***.

Если концентрация молекул А в среде такова, что все молекулы вещества-переносчика задействованы, то дальнейшее повышении концентрации вещества А не будет больше вызывать рост скорости диффузии. Это означает, что облегчённая диффузия обладает свойством насыщения.

При облегчённой диффузии наблюдается конкуренция переносимых веществ в тех случаях, когда переносчиком выступает одно и тоже соединение. Например, глюкоза переносится лучше, чем фруктоза; фруктоза лучше, чем ксилоза; ксилоза, лучше, чем арабиноза и т.д.

Известны также соединения, способные избирательно блокировать облегчённую диффузию ионов через мембрану. Они образуют прочные комплексы с молекулами переносчиками. Например яд рыбы фугу тетродотоксин блокирует транспорт натрия, флоридзин подавляет транспорт сахаров и т.д.

Разновидностью облегчённой диффузии является транспорт с помощью неподвижных переносчиков. Молекулы X образуют фиксированные цепочки поперек мембраны, например, выстилать изнутри пору (рис.8). Молекулы переносимого вещества А передаются от одной молекулы переносчика к другой, как по эстафете. При этом предполагается, что пространство в поре недостаточно велико для прохождения через нее частиц А, если только они не способны к специфическому взаимодействию с переносчиком Х.

Рис. 8

Диффузия является основным видом пассивного транспорта веществ через мембрану клетки. Все остальные виды пассивного переноса связаны в основном с транспортом воды.

**г) *Осмос – диффузия растворителя через полупроницаемую мембрану, разделяющую два раствора с разной концентрацией.*** Сила, которая вызывает это движение растворителя, называется осмотическим давлением. Рассмотрим это явление на примере водных растворов. Осмос возникает вследствие теплового движения молекул воды и растворённого вещества. Некоторые молекулы воды, векторы скорости которых параллельны каналам мембраны, проникают через неё. В то же время для растворённого вещества А мембрана непроницаема. По этой причине поток воды из раствора, где концентрация А ниже будет больше (в этом растворе выше концентрация воды). Процесс приводит к возрастанию гидростатического (водяного) давления в растворе с большей концентрацией А. Это избыточное давление вызывает фильтрацию воды в обратном направлении. В некоторый момент наступает состояние динамического равновесия. Давление соответствующее этому состоянию называется осмотическим давлением. Величина осмотического давления определяется уравнением Ван-Гоффа:

 р = i·c·R·T, (6)

где с – концентрация растворённого вещества; Т – термодинамическая температура; R – газовая постоянная; i – изотонический коэффициент, показывает во сколько раз из-за диссоциации молекул возросло число частиц в растворе. Скорость осмотического переноса воды через мембрану определяется соотношением:

 , (7)

где Ро – коэффициент проницаемости, S – площадь мембраны, (р1 – р2) – разность осмотических давлений по одну и другую стороны мембраны.

д) ***Фильтрацией называется движение жидкости через поры в мембране под действием градиента гидростатического давления*.** Объёмная скорость переноса жидкости при этом подчиняется закону Пуазейля:

  , (8)

где r – радиус поры; *l* – длина канальца поры; (р1-р2) – разность давлений на концах канальца поры; η – коэффициент вязкости переносимой жидкости;  – модуль градиента давления вдоль поры;  – гидравлическое сопротивление. Это явление наблюдается при переносе воды через стенки кровеносных сосудов (капилляров). Явление фильтрации играет важную роль во многих физиологических процессах. Так, например, образование первичной мочи в почечных нефронах происходит в результате фильтрации плазмы крови под действием давления крови. При некоторых патологиях фильтрация усиливается, что приводит к отёкам.

**3. П Е Р Е Н О С И О Н О В Ч Е Р Е З М Е М Б Р А Н У.**

 Как известно, между внутренней и наружной поверхностями мембраны существует разность потенциалов dφ, которая обуславливает наличие в мембране толщиной d*х* электрического поля с напряжённостью

 , (9)

где dφ / d*х* – градиент потенциала на мембране. На отдельный ион зарядом n∙e в мембране будет действовать сила , где е – элементарный заряд, n – валентность иона. Тогда, сила, действующая на 1 моль ионов:

 , (10)

где NА – число Авагадро, а F = е∙NА – число Фарадея.

 Скорость  установившегося направленного движения частиц под воздействием силы :

 , (11)

где um – подвижность одного моля ионов – коэффициент пропорциональности между скоростью  и силой ():  = um∙.

Теперь поток ионов через поперечное сечение S:

 , (12)

где c – молярная концентрация ионов.

 Плотность потока ионов обусловленная градиентом потенциала Jэл = Фэл / S = υ∙c:

 . (13)

 В общем случае перенос ионов через мембрану определяется двумя факторами: градиентом концентрации частиц и градиентом потенциала

электрического поля мембраны – *уравнением Нернста-Планка*:

  (14)

С энергетической точки зрения явления переноса будут описываться через изменение электрохимического потенциала. В общем случае плотность потока частиц через мембрану определяется  ***уравнением Теорелла*:**

 , (15)

где с – концентрация носителя, u – его подвижность, dμ / d*х* – градиент электрохимического потенциала – dμ.

 . (16)

4. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ

В настоящее время для исследования и оценки про­ницаемости мембран применяют следующие основные ме­тоды: осмотические, индикаторные, химические, радиоактивных изотопов, измерения электропроводности.

***Осмотические методы*** основаны на наблюдении за кинетикой изменения объема клеток при помещении их в гипертонические растворы разной концентрации. Когда клетки помещают в гипертонический раствор исследуе­мого вещества, то вследствие выхода из них воды объем их уменьшается. По мере поступления исследуе­мого вещества в клетку разность осмотического давле­ния между клеткой и средой уменьшается, и клетка вос­станавливает свой первоначальный объем. Наблюдая за скоростью восстановления объема клеток, можно судить о скорости проникновения в них вещества. С целью объ­ективной регистрации этих процессов применяют цент­рифугирование взвеси клеток и визуальное определение их суммарного объема с помощью гематокрита, измерение прозрачности, а также определение изменений показателя преломле­ния клеток и суспензионной жидкости.

Недостатком данного метода: он применим только для работы с отдельными и довольно крупными клетками (водорослями, эритроцитами). Этот метод неприменим так же при исследовании проницаемости для сахаров и аминокислот, так как при больших концентрациях этих веществ мембрана для них непроницаема, а при малых концентрациях трудно уло­вить изменения объема клеток.

***Индикаторные методы*** основаны на изменении окрас­ки клеточного содержимого при поступлении в клетку определенных веществ. В клетку вначале вводят индика­тор, а затем помещают ее в раствор исследуемого ве­щества. При поступлении в клетку этих веществ наблю­дается окрашивание. Если исследуемое вещество само является красителем, то необходимость в предваритель­ном введении индикатора отпадает. К недостаткам дан­ного метода следует отнести то, что небольшие концент­рации красителей трудно обнаружить, а большие токсичны. Данный метод дает в основном лишь качественный ответ: проникает вещество в клетку или не проникает.

***Химические методы*** основаны на обычном качествен­ном и количественном определении содержания веществ в клетках или в среде. Клетки помещают в раствор исследуемого вещества и через некоторое время определяют концентрацию этого вещества в клетках или в растворе. Метод дает особенно хорошие результаты при работе с крупными клетками.

***Методы радиоактивных изотопов*** основаны на приме­нении изотопов, обладающих радиоактивностью. При этом исследуемое вещество метят, т. е. включают в состав молекулы иссле­дуемого вещества радиоактивный (меченый) атом, взамен такого же, но не радиоактивного Если исследуемое вещество находится в виде атомов или ионов, то просто подмешивают в вещество их радиоактивные изото­пы. Теперь поступление этого вещества в клетку можно зафиксировать с помощью счетчика радиоактивных частиц. Поскольку радиоактивность клетки пропорциональна количеству поступившего в нее вещества, этот метод дает количе­ственные результаты. При измерении потока вещества из клеток в среду предварительно вводят ме­ченные атомы в клетки. Это производится или путем микроинъекции, или путем выращивания культуры клеток в среде, содержащей данное радиоак­тивное вещество. В последующем измеряют выходящие из клеток потоки данного вещества.

Изотопный метод является наиболее совершенным и точным методом исследования клеточной проницаемости. Пользуясь им, можно вводить в клетку исследуемое вещество в низких концентрациях, не нарушающих жиз­недеятельность клеток. Применение изотопов позволило изучить проницаемость не только для молекул чужерод­ных или ядовитых веществ, но и для тех соединений, которые входят в состав клеток и тканевых жидкостей самого организма. С помощью изотопного метода удаётся изучать одновременно потоки вещества из среды в клетку и из клетки в среду. Особая ценность метода заключает­ся в том, что он удобен для изучения кинетики входа и выхода веществ и позволяет исследовать эти процессы в естественных условиях, когда клетка находится в ста­ционарном состоянии.

***Метод измерения электропроводности*** применяется при исследовании проницаемости клеток для ионов. Электропроводность клеток определяется активностью ионов в клетках и проницаемостью клеточных мембран. При определенных условиях, например при измерении на низких частотах переменного тока, электропроводность является мерой проницаемости мембран.