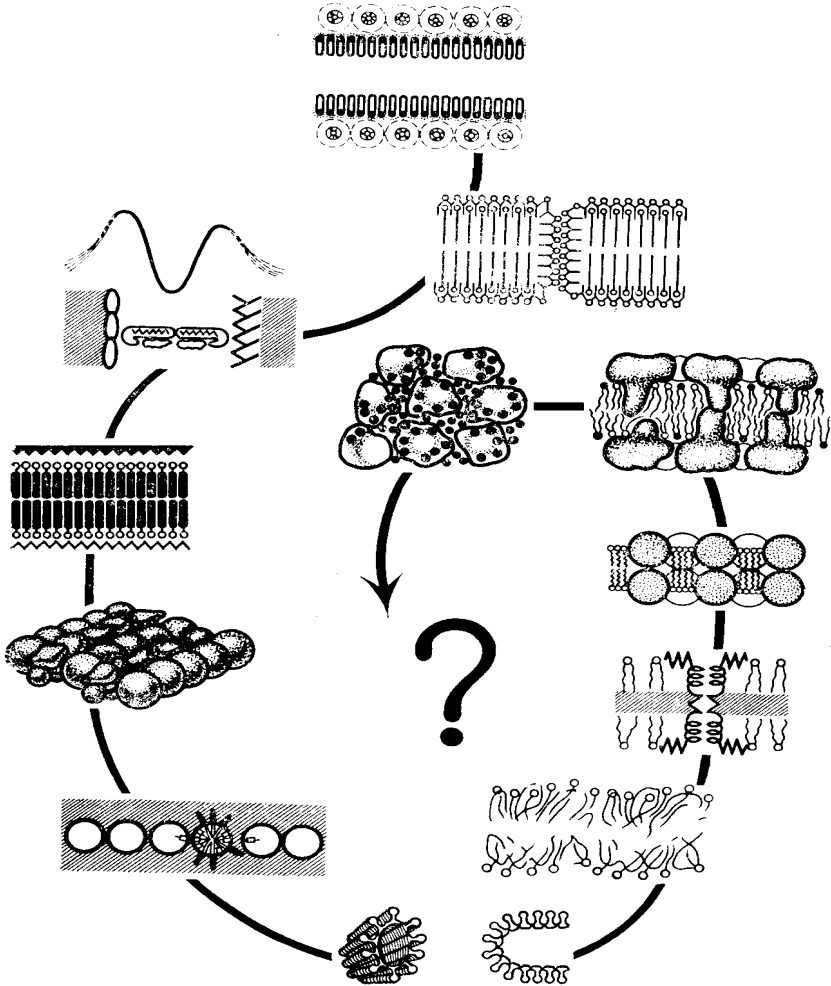

Лекция 13. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН. ИОННЫЕ РАВНОВЕСИЯ.

Биологические мембраны построены в основном из белков, липидов и углеводов. В состав молекулы природных липидов входят полярная заряженная фосфатная головка и длинные углеводородные цепочки, принадлежащие жирным кислотам. В природных фосфолипидах жирные кислоты могут иметь ненасыщенные двойные связи в основном во втором положении глицеринового остатка. Белки могут пронизывать мембрану насквозь, а могут быть частично или целиком погружены в липидный слой. Взаимодействие с гидрофобными липидами осуществляется в основном неполярными аминокислотными остатками. Белки плавают в липидном слое мембраны в виде отдельных глобулярных частиц и обладают определенной подвижностью. Активность мембранных белков зависит от фазового состояния липидов и вязкости мембраны. На рис. 13.1 дана общая схема строения мембраны, состоящей из двойного липидного слоя с погруженными в него молекулами белка. Толщина биологических мембран обычно не превышает 100 Å.

Изучение физико-химических свойств мембран удобно проводить на моделях монослоев, которые получают при нанесении липидов на поверхность воды. Повышение давления и уплотнение монослоя приводят к тому, что подвижность углеводородных цепочек уменьшается, их взаимодействие друг с другом растет, а полярные головки фиксируются на поверхности раздела фаз. В пределе происходит такое уплотнение монослоя, где площадь поперечного сечения молекулы липида не зависит от длины углеводородной цепи. Монослой представляет собой лишь половину липидного бислоя мембраны, и более удобной моделью служат различные искусственные бислои липидные мембраны (БЛМ). Плоские ламеллярные структуры, могут сливаться, образуя замкнутые везикулярные частицы (липосомы), в которых липидные бислои отделяют внутреннюю водную фазу от наружного раствора. В везикулярные частицы можно встраивать белковые молекулы и другие компоненты биологических мембран для изучения механизмов их функционирования в биомембранах. Плоские БЛМ используются для изучения барьерных функций, электромеханических характеристик, а также межмолекулярных взаимодействий в мембранах. Электростатические взаимодействия осуществляются между заряженными группами либо в пределах одного полуслоя (латеральные), либо между разными слоями (трансмембранные). Дисперсионные вандерваальсовы взаимодействия между поверхностями мембран обнаруживаются на расстояниях до 1000 Å. Это значительно превышает расстояния, где проявляется



13.1. Развитие представления о молекулярной организации биологических мембран.

электростатическое отталкивание. Суммарный эффект этих сил может привести к появлению минимума энергии взаимодействия на расстояниях 30 – 80 Å и слиянию поверхностей клеточных мембран. Этот эффект лежит в основе объединения отдельных клеток в клеточные агрегаты. Компоненты клеточных мембран характеризуются определенной подвижностью. Характерное время $\tau_{\text{вращ}}$ вращательного движения молекул фосфолипидов, жирных кислот в природных мембранах составляет $\tau_{\text{вращ}} \sim 10^{-9}$ с и увеличивается до 10^{-8} с при температуре ниже точки плавления жирнокислотных цепей липидов. Латеральная диффузия липидов вдоль слоя характеризуется довольно большим коэффициентом диффузии $D \sim 10^{-7} - 10^{-8}$ см²/с, величина которого сильно зависит от состава мембран и температуры ($\epsilon_{\text{акт}}$ диффузии ~ 10 ккал/моль). Трансмембранные переходы липидов из одного слоя в другой (флип-флоп переходы) происходят намного медленнее ($\tau_{\text{трансембр}} \sim 1000$ с). Подвижность молекул белков в мембранах намного меньше ($\tau_{\text{вращ}} \sim 10^{-4} - 10^{-6}$ с, $D \sim 10^{-10} - 10^{-12}$ см²/с). Вязкость углеводородной зоны мембран составляет, как правило, 1 – 2 пуаз, что говорит о ее жидкофазном состоянии, хотя и превышает на два порядка вязкость воды. Прочность мембран зависит от химического состава, внешних условий и может нарушаться за счет локальных механических дефектов, возникающих при сжатии. Среднее время жизни БЛМ в электрическом поле падает при увеличении напряжения на мембране (электрический пробой мембраны). Энергия мембраны зависит от поверхностного натяжения, т. е. от работы, которую нужно затратить на образование 1 см² поверхности липидного слоя. Если в мембране появляется дефект типа сквозной поры, то энергия мембраны будет зависеть от ее радиуса. Энергия уменьшится на величину, равную суммарному поверхностному натяжению на площади, занятой порой, а также за счет изменения электрической емкости мембраны при появлении в ней структурного дефекта. В результате оказывается, что зависимость энергии мембраны от радиуса дефекта имеет вид кривой с максимумом (рис. 13.2). Видно, что дефекты малого радиуса будут исчезать, однако дефекты с радиусом, большим критического (φ_0), будут необратимо увеличиваться, приводя к разрыву мембраны. Величина критического радиуса уменьшается с ростом наложенной на мембрану разности потенциалов, чем и объясняется увеличение вероятности механического разрыва мембран в электрическом поле.

Физико-химические свойства мембран сильно зависят от фазового состояния липидов, которое меняется при достижении критических температурных значений фазового перехода. Температура фазового перехода увеличивается с увеличением длины цепи и уменьшается с увеличением числа двойных связей жирнокислотных остатков. Обычно в естественных условиях большинство природных липидов, содержащих ненасыщенные связи, находится в "жидком" состоянии. Точка фазового перехода для них лежит в области отрицательных температур. В гелеподобном состоянии углеводородные цепи находятся в трансконформации,

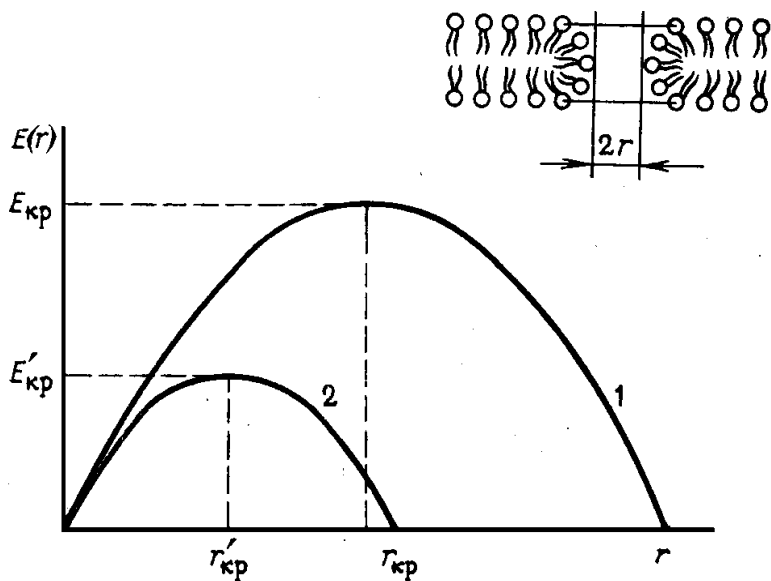


Рис. 13.2. Зависимость энергии дефекта в мембране $E(r)$ от его радиуса r в отсутствие электрического поля и при наложении разности потенциалов φ . 1 – при $\varphi = 0$, 2 – при $\varphi > 0$; вверху справа – изображение поры в бислое

а в жидкоподобном – они разупорядочены. При плавлении углеводородная цепь частично искривляется с образованием петли, или кинка (рис. 13.3). Увеличение числа кинков способствует разупорядоченности углеводородной зоны. Кинк может смещаться вдоль углеводородной цепи за счет синхронного поворота на 120° соответствующей последовательности С – С-связей. Подобное перемещение кинка является своеобразной диффузией свободного объема, внутри которого может происходить перенос малых молекул через углеводородную зону.

Перекисное окисление липидов. Этот процесс, идущий с участием свободных радикалов, играет большую роль, изменяя физико-химическое состояние и свойства мембран. Свободнорадикальные продукты образуются в результате диссоциации С – Н-

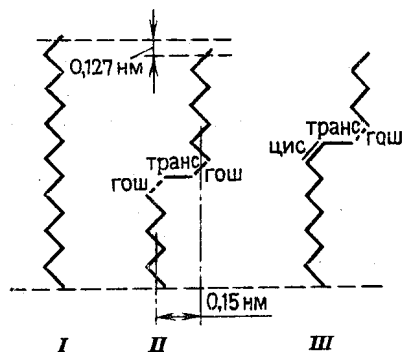
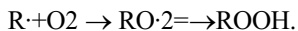


Рис. 13.3. Схематическое изображение углеводородных цепей в полностью трансконфигурации (III). Кинк-блоки в углеводородных цепях мембран

связей, особенно если они расположены в соседнем положении с двойной связью. Перекисное окисление инициируется при действии активных форм кислорода (радикалы $O\cdot H$, HO_2 , синглетный кислород 1O_2), которые вступают во взаимодействие с жирнокислотными цепями, отрывая от них водород. В результате на начальном этапе образуются свободнорадикальные продукты $R\cdot$, которые затем реагируют с кислородом. Эта реакция приводит уже к появлению гидроперекисей



Как видно, этот процесс сопряжен с отрывом водорода H от субстрата RH и присоединением $H\cdot$ к радикалу $RO_2\cdot$. В итоге исходный свободнорадикальный инициирующий центр вновь регенерируется, давая тем самым начало цепному окислению липидов. Сами свободнорадикальные продукты могут погибать в реакциях рекомбинации или за счет действия антиокислительных защитных соединений. К последним относятся соединения фенольного типа (токоферол) или вещества, взаимодействующие с активными формами кислорода. Например, β -каротин, а также α -токоферол эффективно тушат синглетный кислород, дезактивируя его синглетно-возбужденное состояние. Другие антиокислители оказывают защитное химическое действие, так как, взаимодействуя с O_2 , они сами подвергаются окислению.

В биологических мембранах перекисному окислению подвергаются в основном непредельные фосфолипиды. В результате окисления липидов увеличивается вязкость мембран, так как при этом уменьшается количество жидких гидрофобных липидов, появляются поперечные межмолекулярные сшивки и увеличивается количество упорядоченных липидов с ограниченной подвижностью. В процессе перекисного окисления появляющиеся свободные радикалы $R\cdot$, $RO_2\cdot$, могут рекомбинировать друг с другом с выделением большой порции энергии ($\sim 70 - 100$ ккал/моль). Этого достаточно для перевода продуктов реакции в электронное возбужденное состояние. Последующий переход возбужденных продуктов в основное состояние может сопровождаться испусканием кванта света хемилюминесценции.

Ионные равновесия. Движущей силой диффузии через мембрану является разность химических потенциалов (μ) этого вещества между областями, разделенными мембраной. Напомним (лекция 5), что химический потенциал равен

$$\mu = \mu_0 + RT \ln C, \quad (13.1)$$

где μ_0 – стандартный химический потенциал, C – концентрация вещества. Если происходит перенос ионов, то их движение зависит не только от концентрации, но и от электрического потенциала (ϕ) на мембране. В этом случае пользуются понятием электрхимического потенциала ($\bar{\mu}$)

$$\bar{\mu} = \bar{\mu}_0 + RT \ln C + ZF\phi, \quad (13.2)$$

где Z – валентность иона, F – число Фарадея (96500 Кулон/моль). Непосредственно движущей силой переноса ионов является градиент электрохимического потенциала $d\bar{\mu}/dx$. Основной энергетический барьер, который стоит на пути проникновения ионов в липидную мембрану из водной фазы, возникает из-за того, что диэлектрическая постоянная липидов $\epsilon \sim 2 - 3$, а в воде $\epsilon \sim 81$. Вследствие этого энергия иона как заряженной частицы радиуса r и заряда e , равная

$$E = e^2/2\epsilon r, \quad (13.3)$$

повышается в липидном слое. Отсюда следует, что коэффициент распределения концентраций иона между водной и липидной фазами должен быть очень мал:

$$\gamma = \frac{C^{\text{лип}}}{C^{\text{H}_2\text{O}}} \sim 10^{-20} - 10^{-30}, \quad (13.4)$$

где $C^{\text{лип}}$, $C^{\text{H}_2\text{O}}$ – концентрации иона в фазах у самой границы раздела.

Рассмотрим распределение электролита A^+B^- между липидной (2) и водной (1) фазами, у которого анион B^- и катион A^+ обладают разной липофильностью (пусть липофильность аниона B^- выше). Вблизи границы раздела концентрации анионов B^- в липидной фазе несколько превысит содержание анионов A^+ . Поэтому около границы раздела неполярная липидная фаза (2) несет отрицательный заряд и имеет более низкий потенциал, чем водная фаза (1). Однако в областях, далеких от поверхности раздела, концентрации A^+ и B^- равны, т. е. соблюдается условие электронейтральности объемов фаз $C_A = C_B$. В целом концентрация обоих видов ионов A^+ и B^- ниже в фазе (2) вследствие различий в диэлектрических проницаемостях.

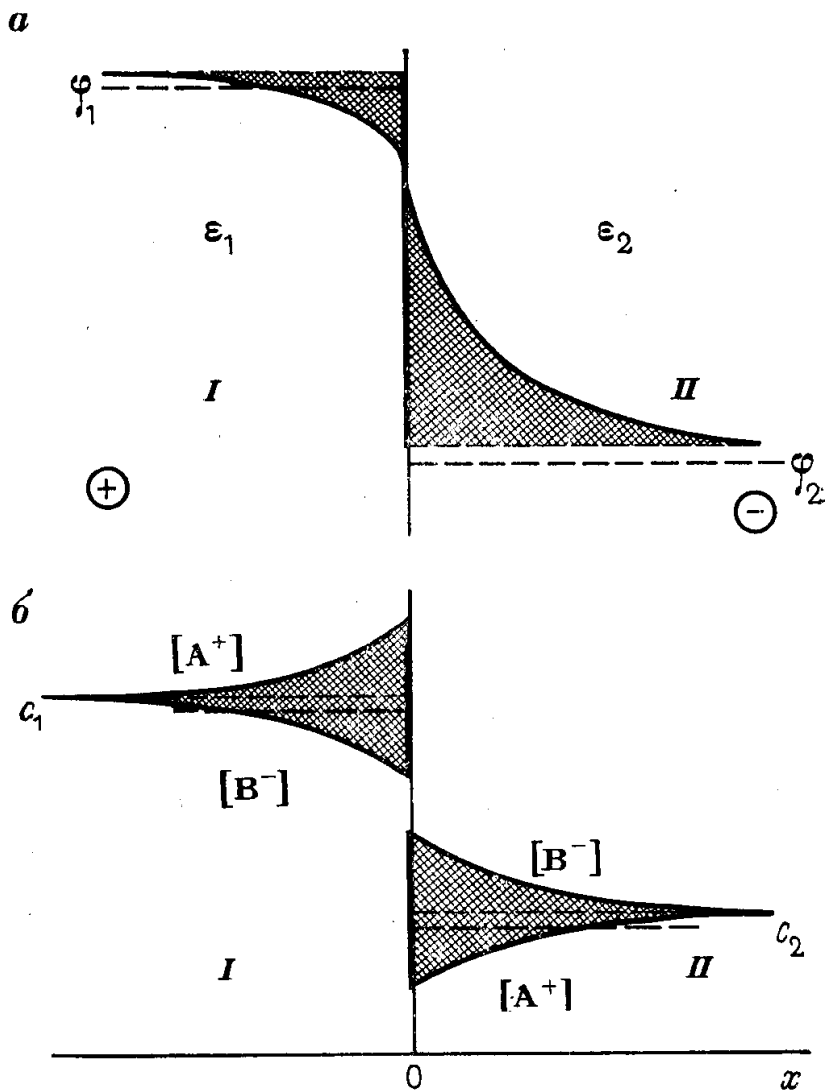


Рис 13.4 Профили распределения потенциала и концентрации ионов A^+ и B^- на границе раздела фаз I и II. Фаза I – водный раствор ($\epsilon_2 = 2 \div 3$), а – распределение потенциала (φ), б – распределение концентраций (C) катионов и анионов. C_1, C_2 – концентрации электролитов в объеме фаз I и II.

На рис. 13.4 показаны профили распределения концентраций A^+ и B^- и профиль электрического потенциала вблизи поверхности раздела фаз. Как видно, в областях вблизи поверхности раздела имеются диффузионные слои, в каждом из которых концентрации A^+ и B^- неодинаковы и условие электронейтральности вблизи границы раздела не соблюдается. Соотношение концентраций электролита в двух фазах можно получить из условия равновесия на границе раздела фаз

$$\mu_{O_A}^{(1)} + RT \ln C_A^{(1)} = \mu_{O_A}^{(2)} + RT \ln C_A^{(2)} \quad (13.5)$$

Здесь члены $F\phi_1$ и $F\phi_2$ отсутствуют, так как на самой границе потенциалы фаз равны $\phi_1^0 = \phi_2^0 = \phi_0$. Отсюда с учетом выражения (13.4) $\gamma_A = C_A^{(2)} / C_A^{(1)}$ найдем, что для γ_A , а также аналогично для γ_B

$$\ln \gamma_{A^+} = \frac{\Delta \mu_{O_A}}{RT}, \quad \ln \gamma_{B^-} = \frac{\Delta \mu_{O_B}}{RT}, \quad (13.6)$$

где $\Delta \mu_{O_A} = \mu_{O_A}^{(1)} - \mu_{O_A}^{(2)}$, $\Delta \mu_{O_B} = \mu_{O_B}^{(1)} - \mu_{O_B}^{(2)}$.

При условии электронейтральности каждой фазы

$$C_B^{(1)} = C_1 \text{ и } C_A^{(2)} = C_B^{(2)} = C_2,$$

$$\ln \frac{C_2}{C_1} = \frac{1}{2} (\ln \gamma_{A^+} + \ln \gamma_{B^-}).$$

или

$$\frac{C_2}{C_1} = \sqrt{\gamma_{A^+} \gamma_{B^-}}. \quad (13.7)$$

Отношение концентраций электролита в фазах зависит от γ_{A^+} и γ_{B^-} . Величина разности потенциалов $\Delta\phi = \phi_1 - \phi_2$ между фазами зависит от разности электрохимических потенциалов обоих видов иона. Можно показать, что при условии электронейтральности каждой фазы

$$\Delta\phi = \phi_1 - \phi_2 = \frac{1}{2F} (\Delta \mu_{O_B} - \Delta \mu_{O_A}) = \frac{2F}{RT} (\ln \gamma_{A^+} - \ln \gamma_{B^-}). \quad (13.8)$$

Таким образом, из выражения (13.8) следует, что межфазная разность потенциалов возникает, только если коэффициенты распределения

катионов и анионов различны ($\gamma_A \neq \gamma_B$). Характер падения потенциала вблизи границы зависит от распределения ионов в двойном электрическом слое в толще мембраны. Анализ показывает, что значение электрического потенциала вблизи границы относительно объема фазы изменяется экспоненциально с расстоянием вдоль координаты x в толще мембраны

$$\varphi(x) = \varphi_0 e^{-\chi|x|}, \quad (13.9)$$

где (φ_0 – значение потенциала на границе раздела, χ – константа, зависящая от концентрации ионов в данной фазе и диэлектрической проницаемости. Основное падение потенциала (в e раз) происходит на расстоянии $x=1/\chi$, которое характеризует толщину двойного диффузионного слоя. Величина $\lambda=1/\chi$ называется длиной экранирования. Она падает при увеличении концентрации электролита в данной фазе. В разбавленных растворах концентрация двойного диффузионного слоя достигает сотен ангстрем, а в концентрированных растворах – единиц ангстрем. Это значит, что в липидном слое, где концентрация ионов на несколько порядков меньше, чем в водной среде, длина экранирования намного больше. В случае тонкой мембраны, толщина которой намного меньше длины экранирования, скачок потенциала внутри мембраны практически отсутствует. В отсутствии внешнего поля потенциал внутри тонкой мембраны постоянен по всей ее толщине (рис. 13.5). Поэтому значения потенциала в тонкой незаряженной мембране не отличаются от уровня потенциала окружающих растворов на любом удалении от мембраны. Именно такая ситуация имеет место в незаряженных бислойных липидных мембранах, толщина которых составляет 70 – 100 Å. Если к тонкой незаряженной мембране приложить внешнее поле, то внутри мембраны потенциал будет меняться линейно, т. е. градиент приложенного потен-

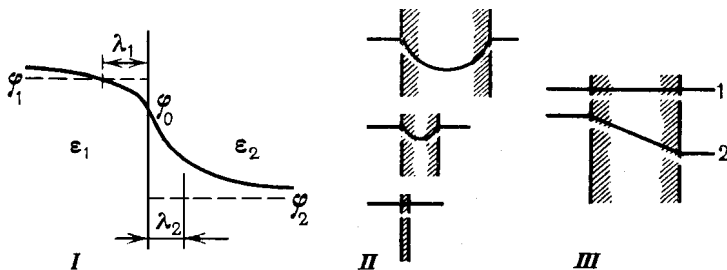


Рис. 13.5. Профили распределения потенциала на границе раздела фаз. (I) в мембранах разной толщины (II); в тонкой мембране в отсутствии внешнего поля (III, 1) и при наложении разности электрических потенциалов (III, 2): (φ_1, φ_2 – электрические потенциалы в объеме фаз; φ_0 – электрический потенциал на границе раздела; $\varepsilon_1, \varepsilon_2$ – диэлектрическая проницаемость двух фаз; λ_1, λ_2 – длина экранирования для первой и второй фазы

циала в мембране постоянен по всей ее толщине: $d\varphi/dx = \text{const}$. Однако если поверхность тонкой мембраны исходно заряжена и имеет фиксированные заряды, то в пространстве около поверхности образуется двойной электрический слой. В этом слое противоионы из раствора будут удерживаться электростатическим притяжением мембранных зарядов. Такому притяжению препятствует тепловое движение ионов, стремящееся выровнять их концентрации на поверхности и в объеме. В результате поверхностный потенциал на мембране будет сложным образом зависеть от плотности поверхностного заряда, равновесной концентрации электролита в растворе и температуры.

Поверхностный потенциал мембраны играет еще и важную роль в биоэлектрoхимических процессах. В экспериментах обычно измеряют близкую величину – электрокинетический потенциал ξ (дзета потенциал), или потенциал скольжения. Он определяется с учетом того, что первый слой ионов со своими гидратными оболочками и первый слой молекулы воды, смачивающих твердую фазу, удерживаются около заряженной поверхности при движении мембранной частицы относительно жидкости. Электрокинетические явления (электроосмос, электрофорез, потенциал течения, потенциал оседания) обусловлены мембранным поверхностным зарядом.

Доннановское равновесие – это вид ионного равновесия между фазами, когда одна из фаз несет заряженные частицы, неспособные перейти в другую фазу. Допустим, что две водные фазы, в каждой из которых растворен электролит A^+B^- , разделены мембраной, проницаемой для электролита. Пусть в одной из фаз (фаза 2) имеются положительные фиксированные заряды Q , которые не могут проходить через мембрану. При условии равновесия для подвижного иона одного типа электрохимические потенциалы (13.2) в обоих растворах (1 и 2) одинаковы

$$RT \ln C_{A_1} + ZF\varphi_1 = RT \ln C_{A_2} + ZF\varphi_2 \quad (13.10)$$

и

$$RT \ln C_{B_1} + ZF\varphi_1 = RT \ln C_{B_2} + ZF\varphi_2$$

Из условий равновесия (13.10) получаем уравнение для разности потенциалов

$$\varphi_1 - \varphi_2 = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_{A_2}}{C_{A_1}} = - \frac{RT}{F} \ln \frac{C_{B_2}}{C_{B_1}}, \quad (13.11)$$

которое называется уравнением Нернста для равновесного потенциала на мембране. Оно показывает, что равновесный потенциал на мембране определяется соотношением концентраций электролита в обеих фазах.

Если $C_{A_1} = C_{B_1} = C_{A_2} = C_{B_2} = C$, то $\Delta\varphi = 0$. Из уравнения (13.11) следует соотношение

$$C_{A_2} \cdot C_{B_2} = C_{A_1} \cdot C_{B_1} = C^2. \quad (13.12)$$

Влияние недиффундирующего иона Q приводит к тому, что на мембране появляется разность потенциалов, даже если концентрации электролита по обе стороны мембраны исходно были равны. В самом деле, из условия электронейтральности первой фазы следует, что

$$C_{A_1} = C_{B_1} = C. \quad (13.13)$$

а для второй фазы это же условие в присутствии Q имеет вид

$$C_{A_2} + Q = C_{B_2}. \quad (13.14)$$

Очевидно, что во второй фазе

$$C_{A_2} < C_{B_2},$$

и так как согласно (13.12, 13.13), $C_{A_2} \cdot C_{B_2} = C_{A_1}^2 = C^2$, то

$$C_{A_2} > C_{A_1}.$$

Значит, заряд Q в фазе 2 компенсируется повышенным содержанием в ней анионов B_2^- при более низком содержании катионов A_2^+ . В этом случае возникает доннановская разность потенциалов, которая равна

$$\Delta\varphi_D = \varphi_2 - \varphi_1 = RT \ln \frac{C_{A_1}}{C_{A_2}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{C}{C_{A_2}} > 0,$$

где $C_{A_2} < C$. Величина $\Delta\varphi_D$ может достигать довольно больших значений, когда при $Q \gg C$ в фазе 2 аккумулируются анионы B_2^- до концентрации, намного большей, чем концентрация C электролита в водном растворе.