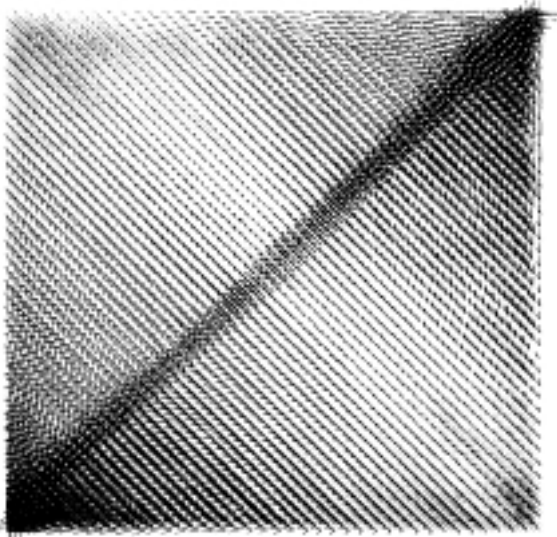


# Биофизика мембранных процессов

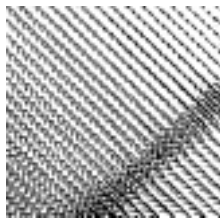
## VI Структурно-функциональная организация биологических мембран



## XV Молекулярная организация биологических мембран

## XVI Конформационные свойства мембран

## Молекулярная организация биологических мембран



## § 1. Состав и строение биологических мембран

Биологическими мембранами (от лат. *membrana* — перепонка) называют функциональные структуры клеток толщиной в несколько молекулярных слоев, ограничивающие цитоплазму и большинство внутриклеточных структур, а также образующие единую внутриклеточную систему канальцев, складок и замкнутых полостей. Толщина биологических мембран редко превышает 10,0 нм, однако вследствие сравнительно плотной упаковки в них основных молекулярных компонентов (белки и липиды), а также большой общей площади клеточных мембран они составляют обычно более половины массы сухих клеток.

∇ Биологические мембраны построены в основном из белков, липидов и углеводов. Белки и липиды составляют основную часть сухой массы мембран. Доля углеводов обычно не превышает 10–15%, причем они связаны либо с молекулами белка (гликопротеины), либо с молекулами липидов (гликолипиды). В мембранах различного происхождения содержание липидов колеблется от 25 до 75% по массе по отношению к белку (табл. XV.1). □

В состав биологических мембран: входят липиды, относящиеся главным образом к трем основным классам: глицерофосфатиды (фосфолипиды), сфинго- и гликолипиды, а также стероиды.

Мембранные липиды имеют сравнительно небольшую полярную (заряженную) головку и длинные незаряженные (неполярные) углеводородные цепи. Полярные головки глицерофосфатидов — фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин — несут положительный и отрицательный заряд и при нейтральных рН в целом электронейтральны (цвиттерийонные липиды). Фосфатидилсерин и фосфатидилинозит имеют по одному, а кардиолипин — два нескомпенсированных отрицательных заряда.

Жирные кислоты, входящие в состав липидов биологических мембран, обычно имеют от 14 до 22 углеродных атомов. Углеводородные цепи могут быть полностью насыщенными либо содержать 1–6 ненасыщенных двойных связей. Двойные связи практически всех жирных кислот находятся в цис-конформации. В природных фосфолипидах жирные кислоты, имеющие ненасыщенные связи, обнаруживаются, как правило, во 2-м положении глицеринового остатка. Многочисленные экспериментальные данные указывают, что в природных мембранах липидный состав внутреннего и наружного слоев может различаться по качественному и жирнокислотному составу.

Таблица XV.1.

Липидный состав мембран клеток млекопитающих, % от массы всех липидов

Липиды	Плазмати- ческие мембраны	Мито- хондрии	Лизосомы	Ядра	Эндо- плазмати- ческий ретику- лум	Аппарат Гольджи
Фосфатидилхолин	18,5	37,5	23,0	44,0	48,0	24,5
Сфингомиелин	12,0	0	23,0	3,0	5,0	6,5
Фосфатидилэтаноламин	11,5	28,5	12,5	16,5	19,0	9,0
Фосфатидилсерин	7,0	0	6,0	3,5	4,0	2,5
Фосфатидилинозитол	3,0	2,5	6,0	6,0	7,5	5,0
Лизофосфатидилхолин	2,5	0	0	1,0	1,5	3,0
Дифосфатидилглицерин	0	14,0	5,0	1,0	0	0
Другие фосфолипиды	2,5	—	—	—	—	—
Холестерин	19,5	—	14,0	10,0	5,5	7,5
Эфиры холестерина	2,5	2,5	8,0	1,0	1,0	4,5
Свободные жирные кислоты	6,0	—	—	9,0	3,5	18,0
Другие липиды	15,0	15,0	2,5	5,5	5,0	16,0

Белковый состав мембран также исключительно многообразен. Большинство мембран, за редким исключением, содержит большое число различных белков, молекулярная масса которых колеблется от 10 000 до 240 000.

В зависимости от степени гидрофобности, числа и локализации гидрофобных аминокислотных остатков в полипептидной цепи белки либо частично, либо целиком погружены в липидный слой мембран или пронизывают его насквозь. Наиболее слабо связаны с мембраной так называемые периферические белки, которые удерживаются в мембране за счет слабых, в основном неэлектростатических, взаимодействий. Белки, сильно связанные с липидами мембран и глубоко погруженные в липидный слой мембран, так называемые интегральные белки, составляют основную массу мембранных белков. Обычно полипептидные цепи этих белков включают большое число неполярных аминокислотных остатков.

В функциональном отношении мембранные белки подразделяются на ферментативные, транспортные и регуляторные. Выделяют также структурные белки, которые выполняют в основном «опорно-строительные» функции. □

Важным структурным компонентом мембран является вода (см. § 4 гл. IX). Особенности взаимодействия основных молекулярных компонентов мембран с водой определяют не только многие структурно-функциональные свойства мембран, но и являются решающими в процессе формирования самих мембран и стабилизации мембранных систем. Воду, входящую в состав мембран, подразделяют на связанную, свободную и захваченную. Наименьшей подвижностью отличается так называемая внутренняя связанная вода, присутствующая в виде одиночных молекул в углеводородной зоне мембран. Эта фракция воды, по данным ЯМР-спектроскопии, характеризуется временем корреляции  $\tau_c \sim 10^{-7}$  с. Основная часть связанной воды — вода гидратных оболочек. Подвижность этой воды в мембранах выше, что приводит к меньшим значениям:  $\tau_c \leq (8 \div 10)^{-10}$  с. Гидратные оболочки образуются главным образом вокруг полярных частей молекул липидов и белков. Гидратные

оболочки основных структурообразующих липидов состоят обычно из 10–12 молекул воды. Эта вода осмотически неактивна, она не способна растворять какие-либо вещества.

Слабосвязанная вода по подвижности и некоторым другим свойствам занимает промежуточное положение между водой гидратных оболочек и жидкой свободной водой.

Свободная вода входит в состав мембран в виде самостоятельной фазы и обладает изотропным движением, характерным для жидкой воды. Захваченная вода, обнаруживаемая иногда в центральной части мембран между липидными бислоями, по параметрам подвижности соответствует жидкой свободной воде, но медленно обменивается с внешней водой из-за физической разобщенности.

Изучение строения мембран необходимо для понимания их функционирования. В 1935 г. Ф. Даниэлли и Г. Давсон выдвинули первую гипотезу о строении биологических мембран, согласно которой мембрана состоит из двойного липидного слоя, покрытого с двух сторон слоями глобулярных белков.

В 50-х годах XX в. методом электронной микроскопии были получены снимки мембран в виде трехслойных структур толщиной около 10 нм для плазматических и несколько меньшей — для субклеточных мембран. В 1964 г. Дж. Робертсон предложил унитарную схему асимметричного строения мембраны. В соответствии с этой схемой белки могут разворачиваться на поверхности двойного липидного слоя под действием сил электростатического взаимодействия с заряженными головками фосфолипидов мембран; на наружной поверхности мембраны располагаются еще и молекулы гликопротеинов. Однако под влиянием новых фактов, и в первую очередь обнаружения зернистой структуры мембран, которая просматривалась на снимках, полученных при большом увеличении, первоначальные представления о трехслойности мембран были пересмотрены. На рис. XV.1 отражены изменения представлений о строении мембран.

▽ В настоящее время считают, что белки не выстилают поверхность липидного слоя, мембран, а «плавают» на поверхности в виде отдельных глобулярных молекул или частиц, в большей, или меньшей степени погруженных в мембрану. Эта жидкомозаичная модель, предложенная Дж. Ленардом и С. Сингером (1966), позволяет удовлетворительно объяснить целый ряд фактов, в частности зависимость многих физиологических функций мембран и активности отдельных мембранных ферментов от фазового состояния липидов в мембране, ее текучести (вязкости). Более поздняя белково-кристаллическая модель (G. Vanderkooi, D. Green, 1970) отличается от жидкомозаичной модели фактически лишь постулированием существования в мембране жесткой белковой структуры, возникающей в результате дальнедействующих белок-белковых связей.

В настоящее время получили наибольшее распространение различные варианты жидкомозаичной модели. □

Характер взаимодействия полярных и неполярных групп белка и липидного бислоя приводит к тому, что пептид должен быть расположен так, чтобы максимально возможное количество неполярных аминокислотных остатков было погружено в бислой. Это очевидное требование определяет характер трех основных типов белок-мембранных комплексов, которые включают  $\beta$ -складчатые и  $\alpha$ -спиральные

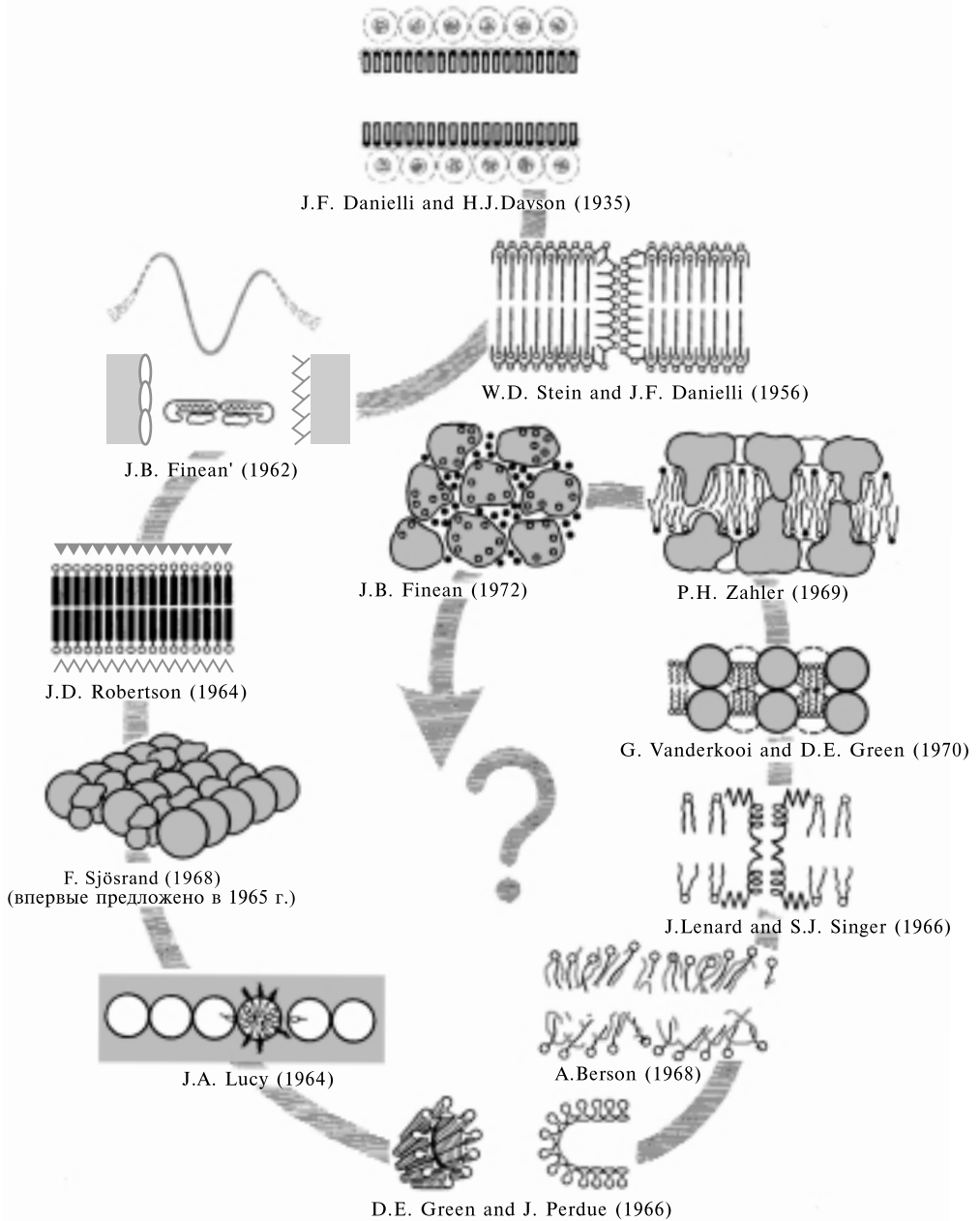


Рис. XV.1.

Развитие представлений о молекулярной организации биологических мембран (по Ю. А. Владимирову, 1975)

структуры с различным соотношением полярных и неполярных групп (рис. XV.2).

Предполагается, что амфифильные  $\beta$ -складчатые структуры (тип 1) сворачиваются с образованием пор для пассивной диффузии веществ через мембраны (см. гл. XVII). Внутри такой поры расположены полярные, а наружи в контакте с биолоем — неполярные группы.

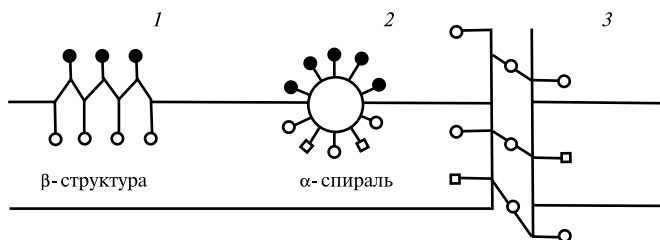


Рис. XV.2.

Три типа белок-мембранных взаимодействий

1 — амфифильная  $\beta$ -структура; 2 —  $\alpha$ -спираль амфифильная; 3 —  $\alpha$ -спираль равномерногидрофобная; черные кружки соответствуют заряженным боковым цепям; квадраты — полярным, но незаряженным, белые кружки — неполярным боковым цепям.

Пептидные гормоны (гл. XXVI) могут образовывать комплексы (тип 2) с мембранами. Структуры типа 3 характерны для интегральных мембранных белков, пронизывающих мембраны своими  $\alpha$ -спиралями (бактериородопсины, гл. XXIX).

## § 2. Образование мембранных структур

### *Монослой. Жидкие кристаллы*

Основными мембранообразующими липиды представляют собой соединения с идеальным сочетанием гидрофобных и гидрофильных свойств. Они сравнительно плохо растворимы в воде в мономерном виде, а стремление их полярных головок максимально контактировать с водой придает им уникальные способности образовывать многообразные сравнительно устойчивые структуры при агрегации этих молекул. □

**Нерастворимые монослои на границе раздела вода-воздух.** Большинство мембранообразующих липидов при нанесении их на поверхность воды практически не растворяется в объемной фазе, а быстро растекается по поверхности, образуя мономолекулярный слой (И. Ленгмюр, 1933). При сжатии монослоя начинают проявляться межмолекулярные взаимодействия, нарушающие состояние идеального двумерного газа (рис. XV.3, A).

Дальнейшее возрастание давления приводит к формированию так называемой растянутой жидкой пленки. Молекулы в этом состоянии обладают всеми степенями свободы, как и в обычной жидкости, однако их полярные головки фиксированы на поверхности раздела фаз (рис. XV.3, B). Углеводородные цепи молекул в этом состоянии склонны к агрегации и взаимопроникновению.

При дальнейшем возрастании давления в монослой будет реализовываться наиболее плотная упаковка молекул, т. е. их вертикальная ориентация. Вначале подвижность углеводородных цепей будет выше, чем у полярных головок, так как последние сильно гидратированы. В этом состоянии сохраняется возможность движения молекул в плоскости поверхности (латеральная подвижность) и его можно рассматривать как конденсированную жидкую пленку (рис. XV.3, *C*). Дальнейшее

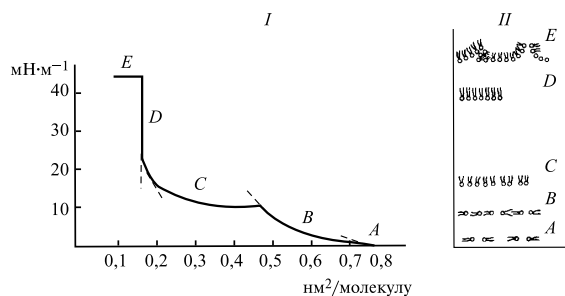


Рис. XV.3.

Кривая (изотерма) площадь-давление для монослоя длинноцепочных липидов (*I*) и схема расположения липидных молекул на границе раздела фаз вода-воздух (*II*):

*A* — состояние двумерного газа, *B* — растянутая жидкая пленка, *C* — конденсированная жидкая пленка, *D* — твердоконденсированное состояние, *E* — состояние коллапса

уплотнение слоя при возрастании давления может произойти лишь за счет разрушения гидратных оболочек полярных головок, после чего слой становится практически несжимаемым и находится в твердоконденсированном состоянии (рис. XV.3, *D*), где площадь поперечного сечения молекул не зависит от длины углеводородной цепи. Площадь поперечного сечения углеводородной цепи составляет  $\sim 0,2 \text{ нм}^2$ , предельная площадь молекул насыщенного фосфатидилхолина —  $0,44 \text{ нм}^2$ , а фосфатидилэтаноламина  $\sim 0,4 \text{ нм}^2$ . После превышения некоторого предельного давления монослой начинает разрушаться — состояние коллапса (рис. XV.3, *E*).

Поверхностные монослои широко используют в качестве модельных мембранных систем. С их помощью изучают подвижность и типы упаковки молекулярных компонентов в мембранах, межмолекулярные взаимодействия в мембранах, механические свойства мембран; исследуют кинетику и механизмы ферментативных процессов, протекающих на границе раздела фаз; изучают процессы переноса ионов и электронов через границу раздела фаз, инъекцию заряда в липидный слой (диэлектрик) и т. д. Однако этот метод имеет ряд ограничений, в значительной степени обусловленных тем, что монослой — это лишь половина липидного слоя мембран, обращенного в газовую фазу. Последнего ограничения удастся избежать при использовании в качестве мембраны мономолекулярного слоя, образующегося на границе двух несмешивающихся жидкостей (углеводород-вода). Более адекватные модели, представляющие собой липидные бислои, удастся получить в виде полимолекулярных структур, которые образуются липидами в объеме водной фазы. □

**Лиотропный и термотропный полиморфизм липидов.** Как было показано, полярные части мембранообразующих липидов сильно взаимодействуют с водой, поэтому эти соединения могут смешиваться с водой в любых соотношениях. Однако возникающие смеси не представляют собой истинных растворов, а образуют многообразные упорядоченные фазы с периодической структурой. В зависимости от

количества присутствующей в системе воды эти фазы закономерно (для конкретных липидов) переходят друг в друга (рис. XV.4; лиотропный полиморфизм). Изменение структурной организации системы липид — вода в зависимости от температуры получило название термотропного полиморфизма.

Устойчивость того или иного типа мезофаз и диапазон их существования определяются гидрофобным эффектом, а также эффективной геометрической формой липидных молекул.

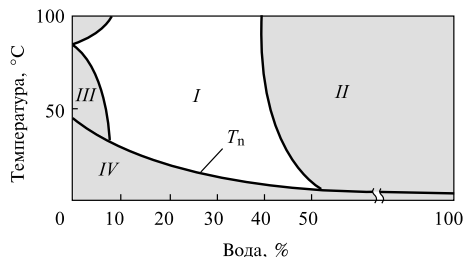


Рис. XV.4.

Бинарная фазовая диаграмма смеси яичного фосфатидилхолина с водой как функция температуры (по В. Ф. Антонову, 1982):

*I* — жидкокристаллическое состояние липида, ламеллярный бислои; *II* — двухфазная система вода-жидкие кристаллы, ламеллярный бислои; *III* — область, где жидкокристаллические ламеллярные бислои сосуществуют с гексагональными; *IV* — твердая (гелеобразная) ламеллярная фаза;  $T_n$  — кривая температуры фазового перехода

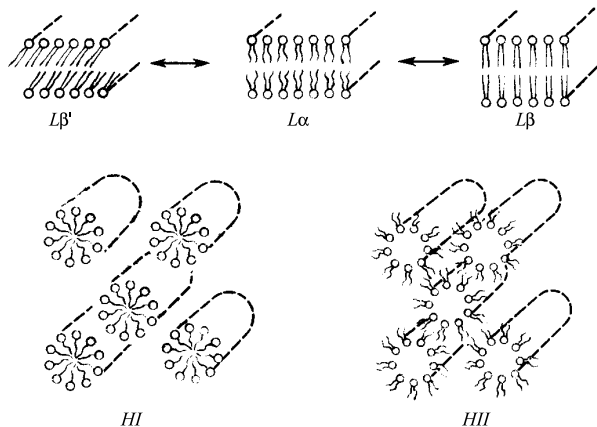


Рис. XV.5.

Строение (поперечный разрез) мезофаз:

*L* — ламеллярная фаза;  $\alpha$  — жидкоподобная фаза,  $\beta$  и  $\beta'$  — кристаллические фазы с различным углом наклона цепей к поверхности раздела фаз, *HI* — гексагональная; *HII* — инвертированная гексагональная (вода в липиде).

Ламеллярный тип организации бислоиных структур наиболее соответствует характеру молекулярной организации липидов в биологических мембранах

Наличие нескомпенсированного заряда на полярной головке молекул липида, например фосфатидилсерина, затрудняет формирование плоских структур этими молекулами вследствие эффекта электростатического отталкивания. Такие молекулы проявляют повышенную склонность образовывать радиально ориентированные структуры с большой кривизной поверхности.

Сложные протяженные и чередующиеся структуры характеризуются анизотропией механических, электрических, магнитных и оптических свойств. Эти структуры обладают промежуточными свойствами между жидкостями и твердыми кристаллами и представляют собой типичные жидкокристаллические (мезоморфные) состояния липидов.



Как правило, состояние клеточных мембран, обеспечивающее их оптимальную функциональную активность, относится к жидкокристаллическому типу. Внутреннее строение липидного бислоя в жидких кристаллах отличается от состояния углеводородов в растворе, хотя в обоих случаях эти структуры гидрофобны. Большая часть анизотропного бислоя в жидком кристалле высокоупорядочена и только относительно небольшие участки в середине биолоя жидкоподобны.

Из всего разнообразия зарегистрированных мезофаз с биологической точки зрения наиболее интересны однопространственная ламеллярная и двухпространственная цилиндрическая, или гексагональная (рис. XV.5).

Повышенный интерес к небислойным, в частности гексагональным (или мицеллярным), структурам обусловлен способностью этих структур формировать сквозные поры, резко увеличивающие проницаемость мембран для воды и растворенных веществ.

### *Искусственные бислойные мембраны*

**Мультиламеллярные липосомы.** Плоские ламеллярные структуры проявляют склонность (при энергичном встряхивании) образовывать замкнутые сферические частицы. Этот процесс энергетически выгоден, так как в этом случае достигается минимум площади контакта гидрофобных поверхностей с водой. При простых механических воздействиях образуются в основном многослойные частицы (диаметром в несколько микрометров) с концентрической организацией слоев — мультиламеллярные липосомы или везикулы (мешочки). В этих частицах липидные бислои отделяют внутреннюю водную фазу от внешнего раствора. Такая организация позволяет использовать мультиламеллярные липосомы для исследования барьерных свойств липидного бислоя и некоторых других специальных задач. Мультиламеллярные липосомы осмотически активны: они изменяются в объеме при изменении осмотических свойств внешней среды.

**Моноламеллярные липосомы.** Более энергичное воздействие на грубые фосфолипидные дисперсии, например с помощью ультразвукового излучения, вызывает образование моноламеллярных (однослойных) везикул (диаметр 20,0–40,0 нм). В зависимости от эффективной конфигурации липидных молекул (критический параметр упаковки и заряд) размеры моноламеллярных липосом могут несколько варьировать (рис. XV.6; табл. XV.2).

Моноламеллярные липосомы широко и эффективно используют в разнообразных исследованиях биологического и медико-биологического характера. Тем не менее, малый внутренний объем и осмотическая неактивность липосом существенно сужают круг этих исследований. В последнее время разработаны методики получения больших (100 нм в диаметре и более) моноламеллярных липосом, которые лишены этих недостатков.

**Протеолипосомы.** Многие мембранные белки и мелкие фрагменты биологических мембран сравнительно легко могут быть включены в состав искусственных везикулярных мембран. Такие комбинированные системы называются протеолипосомами. Эффективность встраивания большинства белков компонентов в искусственные мембранные системы резко зависит от липидного состава мембран, pH, солевого состава, температуры и т. д. Как правило, эффективность встраивания

белковых молекул или липопротеиновых фрагментов мембраны возрастает в присутствии небольших количеств детергентов. Полагают, что сравнительно мелкие молекулы детергентов заполняют дефекты на границе белковой молекулы в мембране, экранируя гидрофобные участки мембраны от воды.

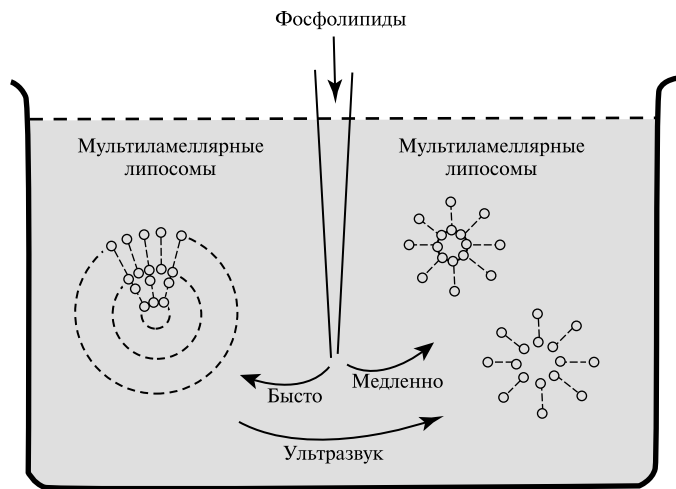


Рис. XV.6.  
Образование замкнутых фосфолипидных везикул (липосомы)

Таблица XV.2.

Параметры мембран моноламеллярных липосом из яичного фосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилхолина (бислой в «жидком» состоянии)

Параметр	Яичный лецитин	Дипальмитоиллецитин
Радиусы ( $r_v, r_c, r_n$ ), нм <sup>1)</sup>	6,2; 7,8; 9,9; 3,7	7,4; 8,9; 10,9; 3,5
Толщина наружного монослоя ( $r_c - r_n$ ), нм	2,1	1,98
Толщина внутреннего монослоя ( $r_c - r_v$ ), нм	1,6	1,52
Число молекул $n_n$	1658	1970
Число молекул $n_v$	790	1030
$n_n/n_v$	2,1	1,9
Объем на молекулу липида, нм <sup>3</sup>	1,25	1,20
Поверхностная площадь на молекулу, нм <sup>2</sup> :		
в наружном монослое	0,74	0,76
во внутреннем монослое	0,61	0,69

<sup>1)</sup> Индексы «н», «в» и «с» обозначают наружный, внутренний монослои и середину углеводородной зоны мембран, соответственно.

Исключительная ценность протеолипосом как искусственных мембранных систем в первую очередь определяется широкими возможностями, которые эти системы предоставляют для исследования функционирования многих важных ком-

понентов биологических мембран. По существу, получение протеолипосом можно рассматривать как последний этап перед полной реконструкцией функционирующих мембранных систем из составляющих их компонентов. □

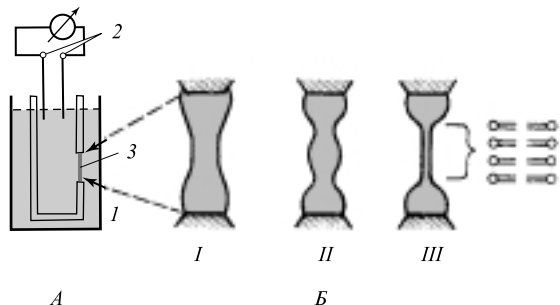


Рис. XV.7.

Образование бислойной липидной мембраны (БЛМ). *А* — ячейка для получения БЛМ и изучения ее электрических свойств; *Б* — этапы формирования БЛМ (*I* — толстая мембрана, *II* — выпуклая линзовидная мембрана, *III* — БЛМ):

1 — тefлоновый стакан, 2 — электроды, 3 — круглое отверстие в стенке тefлонового стакана

Следует отметить, что способность образовывать замкнутые везикулярные частицы свойственна не только искусственным липидным системам. Она широко проявляется при различных способах фрагментации биологических мембран (ультразвук, детергенты, механическое диспергирование и пр.). Замкнутые мембранные пузырьки образуют фрагменты мембран саркоплазматического и эндоплазматического ретикулума, внутренней мембраны митохондрий. В некоторых случаях удается получить везикулы с вывернутой ориентацией мембран, что чрезвычайно важно для изучения структурно-функциональной организации этих мембран.

**Плоские бислойные липидные мембраны.** Липиды, спонтанно образующие ламеллярные слои, обычно способны формировать бислойные структуры (БЛМ или «черные» пленки) на небольших отверстиях в тонких гидрофобных материалах. Это явление впервые было описано О. Мюллером и соавторами (1962), которые получили БЛМ из фосфолипидов мозга на небольших отверстиях ( $0,5\text{--}5,0\text{ мм}^2$ ) в тefлоновой перегородке, разделяющей две водные фазы. Доказав бислойность сформированных мембран, авторы с помощью простой электроизмерительной техники охарактеризовали важнейшие электрические параметры этих мембран. Относительная простота получения БЛМ, широкий спектр применения разнообразных электроизмерительных методов исследования, возможность изменять в широких пределах липидный состав БЛМ и состав омывающих растворов, включать в БЛМ разнообразные модификаторы барьерных свойств мембран, функционально активные элементы биологических мембран — все это быстро обеспечило этим искусственным мембранным системам центральное место в современной экспериментальной мембранологии.

Общая схема ячейки для формирования БЛМ и несколько последовательных этапов формирования бислойной структуры приведены на рис. XV.7. Процесс образования БЛМ начинается с нанесения небольшого количества подходящего липида, растворенного обычно в жидких углеводородах (гексан, октан, декан и др.), на отверстие в тefлоновом стаканчике (рис. XV.7, *I*). Далее эта толстая пленка самопроизвольно утоньшается вплоть до образования бислойной структуры (рис. XV.7, *III*).

▽ Главными силами, определяющими поведение пленки, являются межфазное (поверхностное) натяжение  $\sigma$  и ван-дер-ваальсовы силы притяжения водных фаз по обе стороны пленки, сжимающие пленку в поперечном направлении, — расклинивающее давление (см. XV.3.7 и XV.3.9). □

Первоначально толщина липидной плёнки превышает 100 нм. При такой толщине расклинивающее давление близко к нулю и поведение липидной массы определяется различием гидростатического давления в ее периферической искривленной части — торе — и центральной сравнительно плоской части. В соответствии с законом Лапласа различие гидродинамического давления  $\Delta p$  между фазой, находящейся под вогнутой поверхностью раздела (в торе), и фазой над этой поверхностью определяется выражением

$$\Delta p = \sigma(1/R_1 + 1/R_2),$$

где  $R_1$  и  $R_2$  — внутренний и наружный радиусы кривизны поверхности.

Очевидно, что в центральной части пленки, где радиус кривизны близок к бесконечности ( $R_1 = R_2 \rightarrow \infty$ ),  $\Delta p = 0$ . Это означает, что в торе гидродинамическое давление ниже, чем в плоской части мембраны, и вследствие этого жидкая мембранообразующая фаза будет выдавливаться из центральной части в радиальном направлении. Скорость возникающего потока будет максимальной на периферии пленки в областях, прилегающих к тору, где линейный градиент гидродинамического давления максимален. В соответствии с этим плоская часть пленки быстрее утоньшается по периферии, формируя линзообразную структуру (см. рис. XV.7, II).

В участках, где толщина пленки становится тоньше  $\sim 100$  нм, вмешиваются силы взаимодействия поверхностных слоев и водных фаз по обе стороны пленки. Совокупность этих сил либо ускоряет процесс утоньшения пленки — отрицательное расклинивающее давление, либо препятствует этому процессу — пояснительное расклинивающее давление. Дальнейшее утоньшение пленки приводит или к ее разрыву, или к скачкообразному формированию устойчивой, чаще всего бислойной, структуры. Формирование бислойной структуры заканчивается, когда она распространится на всю площадь, непосредственно контактируя с тором. Обычно формирование бислойной структуры протекает в течение 5–20 мин, однако продолжительность этого процесса резко зависит от многих параметров (липидный состав, температура, pH, ионная сила и состав растворов и другие, часто неконтролируемые, параметры).

▽ Процесс утоньшения пленки и формирования БЛМ можно наблюдать визуально в отраженном свете. Пока плёнка толстая, она выглядит как обычное макротело. Когда толщина пленки становится соизмеримой с длиной волны падающего света, начинает проявляться интерференция лучей, отраженных от передней и задней поверхностей пленки; на поверхности мембраны возникают цветные узоры, известные в оптике под названием колец Ньютона. Такие небислойные пленки, содержащие линзоподобные утолщения, получили название цветных пленок. Бислойные липидные структуры в отраженном свете выглядят черными на светлом фоне, в связи с чем и называются «черными». Низкая отражающая способность таких пленок обусловлена тем, что разность фаз между лучами, отраженными от передней и задней поверхностей пленки, близка к  $\pi$ , т. е. эти лучи находятся в противофазе и гасят друг друга. □

Формирование черной бислойной мембраны не означает полного завершения всех процессов формирования БЛМ. Параллельно с почернением идут более медленные и продолжительные процессы: растекание липидного раствора по поверхности перегородки, на которой сформирована мембрана, выход растворителя из мембраны в объем тора и водную фазу, а также уплотнение упаковки молекул липида в монослой и на поверхности тора. Все эти процессы приводят к постепенному (в течение 10–20 мин после почернения) снижению поверхностного натяжения и увеличению электрической емкости БЛМ вплоть до некоторых стационарных значений.

В целом по своим электрическим характеристикам и ряду других физико-химических свойств бислойные липидные пленки, приготовленные из природных липидов, близки к биологическим мембранам (табл. XV.3). Немодифицированные искусственные БЛМ отличаются низкой проводимостью. Они лишены метаболической активности и не обладают столь высокой селективностью, как биологические мембраны. Однако многие из этих свойств могут быть приданы искусственным мембранам путем введения в их состав разнообразных мембранно-активных соединений и отдельных функционально важных элементов биологических мембран. В присутствии всех этих модификаторов проводимость бислойных мембран обычно возрастает. Все это свидетельствует о том, что бислойная липидная структура выполняет роль естественной матрицы для многих молекулярных компонентов биологических мембран и что липидный бислой в той или иной мере свойственен природным мембранам. Поэтому теория липидного бислоя, рассматривающая основные термодинамические закономерности его формирования, межмолекулярные взаимодействия в бислой, его физические свойства, устойчивость, играет важную роль в понимании общей структурной организации и функционирования биологических мембран.  $\square$

Проблема формирования в клетках организмов замкнутых везикул, состоящих из липидного бислоя, заслуживает особого внимания. По-видимому этот процесс в клетках, также как и в модельных системах, носит характер спонтанной самоорганизации. Он очевидно не связан непосредственно с транспортом липидов из

Таблица XV.3.

Сравнение свойств искусственных липидных и биологических мембран

Свойство	Биомембраны	Бислойные липидные мембраны
Электронно-микроскопический снимок поперечного среза	Трехслойная структура	Трехслойная структура
Толщина, нм	6,0–10,0	2,5–8,0
Межфазное натяжение, Н/см	$(0,03–3,0) \times 10^{-5}$	0,2–6,0
Сопротивление, Ом/см <sup>2</sup>	$10^2–10^5$	$10^6–10^9$
Электрическая емкость, мкф/см <sup>2</sup>	0,5–1,3	0,2–1,0
Напряжение пробоя, мВ	100	150–300
Показатель преломления	1,6	1,56–1,66
Проницаемость для воды, мкм/с	0,5–400	31,7
Энергия активации водной проницаемости, кДж/моль	40,3	53,3
Ионная избирательность $P_{K^+}/P_{Na^+}$	1–25	5,4–9,0

места их биосинтеза и направленным внедрением в формирующуюся мембрану. Во всяком случае, самоорганизация бислоя продолжается в клетке, где были подавлены процессы биосинтеза белка. Однако до конца не ясно, насколько сходны механизмы самоорганизации бислоя в клетке и в модельных системах. Предполагается, что в обоих случаях общим этапом является самоорганизация монослоя и формирование на этой основе больших монослоевых везикул, которые затем превращаются в мультислоевые липосомы.

Существует критическая температура (для раствора димиристоилфосфатидилохолина  $T_{кр}^* = 23^\circ$ ), при которой из раствора липидов образуются монослоевые везикулы. При дальнейшем повышении  $T > T_{кр}^*$  начинается формирование мицелл. В самой критической точке  $T_{кр}^*$  плотность монослоя приближается к плотности бислоя, хотя фазового перехода с образованием типичной бислоевой структуры еще не происходит (Гершфельд Н., 1989).

Речь идет, таким образом, об особом критическом состоянии поверхностного бислоя с повышенным поверхностным давлением  $\pi$  ( $\pi = \pi_{max}$  при  $T = T_{кр}^*$ ), образующимся на границе поверхностного и дисперсионного состояний.

Оказалось, что в растущих клетках критические температуры  $T_{кр}^*$  образования монослоевых везикул экстрагированными липидами совпадают с температурой роста исходных клеток. Следовательно, в клетках это промежуточное монослоевое критическое состояние достигается при температурах роста организма ( $T_{кр}^* = T_{роста}$ ), которые, таким образом, определяют условия спонтанного формирования биомембраны из пула свободных клеточных липидов.

Заметим, что достижение равновесия в системе бислоя — раствор и самоорганизация бислоя достигаются за времена в 100–1000 раз короче характерных времен сопряженных процессов биосинтеза фосфолипидов ( $\sim 20$  мин) в клетках.

### § 3. Термодинамика процессов формирования и устойчивости мембран

Формирование мембран, их стабилизация во многом определяются поверхностными явлениями и межмолекулярными взаимодействиями. Теоретическое изучение свойств высокоорганизованных биологических мембран проводят на примере углеводородных пленок и структур, образуемых липидами в водных средах. □

**Поверхностная активность, работа адсорбции.** Поведение различных соединений в растворах подчиняется адсорбционному уравнению Гиббса:

$$-d\sigma = \sum_{i=1}^m \Gamma_i d\mu_i, \quad (\text{XV.3.1})$$

где  $\sigma$  — межфазное (поверхностное) натяжение,  $\Gamma_i$  — степень адсорбции  $i$ -го компонента в поверхностном слое,  $\mu_i$  — химический потенциал  $i$ -го компонента.

Для бинарной системы (например, липид–вода) адсорбционное уравнение Гиббса записывается в виде

$$-d\sigma = \Gamma_1 d\mu_1 + \Gamma_2 d\mu_2. \quad (\text{XV.3.2})$$

При низкой концентрации растворенного вещества, сильно адсорбирующегося на поверхности раздела (весьма реальная ситуация для системы липид–вода), адсорб-

цию самого растворителя можно приравнять к нулю ( $\Gamma_2 = 0$ ). Тогда

$$-d\sigma = \Gamma_1 d\mu_1. \quad (\text{XV.3.3})$$


Так как для разбавленных растворов

$$d\mu_1 \simeq RT \ln a_1 \simeq RT \ln c_1, \quad (\text{XV.3.4})$$

где  $a_1$  и  $c_1$  — активность и концентрация растворенного вещества, то адсорбционное уравнение принимает вид

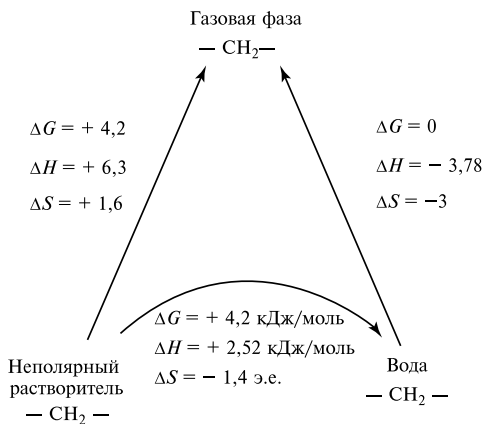
$$\Gamma_1 = -\frac{a_1 d\sigma}{RT da_1} \simeq -\frac{c_1 d\sigma}{RT dc_1}. \quad (\text{XV.3.5})$$

Величина  $-(d\sigma/dc)_{c \rightarrow 0}$  называется поверхностной активностью. Поверхностно-активными называются вещества, понижающие поверхностное натяжение. Для таких веществ  $d\sigma/dc < 0$  и  $\Gamma > 0$ . К этим соединениям, хорошо адсорбирующимся в поверхностном слое и снижающим поверхностное натяжение, относятся органические амфифильные соединения, в частности, липиды.

 **Гидрофобные взаимодействия в мембранах.** Стремление амфифильных молекул объединяться в водных растворах в поверхностные или объемные структуры, в которых углеводородные (гидрофобные) участки молекул тесно контактируют друг с другом, рассматривают обычно как результат гидрофобных взаимодействий (см. § 4 гл. IX).

Энергию гидрофобного взаимодействия обычно оценивают, исходя из энергии переноса данного соединения (углеводород, липид) из воды в органическую фазу. □

Оценка изменения свободной энергии, энтальпии и энтропии при переносе из воды в неполярный органический растворитель неразветвленных углеводородов показывает, что эти изменения возрастают с ростом длины углеводородной цепи. Причем для не очень длинных цепей наблюдается постоянство инкремента этих термодинамических параметров в пересчете на каждую добавочную  $\text{CH}_2$ -группу. Ниже приведены абсолютные значения этих инкрементов, полученные в ряду метан–этан–пропан–бутан при переносе углеводородов из неполярного растворителя в воду непосредственно или через газовую фазу:



Описанные закономерности усложняются в эффектах гидратации полярных головок липидов и электростатических взаимодействий. Для цвиттерионов, полярные головки которых располагаются приблизительно параллельно границе раздела фаз, энергию электростатического взаимодействия между положительно заряженными  $\text{NH}^+$ - или  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ - группами и отрицательно заряженными фосфатными группировками соседних молекул можно оценить по скорости вращения полярной головки. Считая, что барьер для вращения головки создается только за счет электростатического взаимодействия, а время корреляции вращения головки составляет  $\tau_c \sim 1,5 \cdot 10^{-9}$  с, можно вычислить, что свободная энергия электростатического взаимодействия не превышает  $\sim 21$  кДж/моль. Энергия же гидратации обычно существенно выше и для одиночных ионов составляет 210–840 кДж/моль. Это означает, что в полностью гидратированных структурах энергия гидратации выше, чем электростатическая, так что вклад электростатических сил в стабилизацию структур может оказаться существенным только в условиях ограниченной гидратации.

▽ В целом гидратация полярных и заряженных головок липидов существенно влияет на энергетику гидрофобного взаимодействия, увеличивая растворимость липидов в водной фазе. Однако наличие длинных углеводородных цепей в молекулах природных структурообразующих липидов обуславливает их достаточно низкую растворимость в воде. Так, например, критическая концентрация мицеллообразования для дигексаоиллецитина (6 углеродных атомов)  $\sim 10$  мМ, в то время как для дипальмитоиллецитина (16 углеродных атомов)  $\sim 5 \cdot 10^{-10}$  М.

**Межмолекулярные взаимодействия в тонких пленках и мембранах.** Уже простой анализ действия факторов, приводящих к дезинтеграции тонких углеводородных пленок и биологических мембран, позволяет получить определенное представление об особенностях различных межмолекулярных взаимодействий (электростатические и ван-дер-ваальсовы), формирующих эти структуры (см. гл. VIII). В мембранных системах электростатические взаимодействия осуществляются между анионными липидами, амино- и SH-группами аминокислотных остатков белков (положительный заряд),  $\alpha$ -карбоксильными группами сиаловой кислоты (отрицательный заряд) и т. д. Условно выделяют три типа электростатических взаимодействий в мембранных системах: латеральное, или тангенциальное взаимодействие заряженных групп молекул, которые расположены в одном полуслое мембраны; трансмембранное взаимодействие заряженных групп, расположенных по разные стороны мембраны; межмембранное взаимодействие заряженных групп, расположенных на поверхности двух соседних мембран. □

Теоретическое описание первого типа взаимодействий в мембранах осложнено трудностями определения точной топографии (размещения) зарядов в мембранах и нахождения диэлектрической проницаемости среды, разделяющей заряды в мембране.

К настоящему времени глубже разработана теория межмембранных электростатических взаимодействий. Однако формальное описание установленных закономерностей достаточно сложно. Не вдаваясь в детали расчетов, укажем, что энергия отталкивания, например, эритроцитов на расстояниях, больших 10 нм, обращается в нуль, а уже при  $\sim 2$  нм она более чем на три порядка превышает энергию теплового движения.



Трансмембранные ионно-электростатические взаимодействия обычно рассматривают по аналогии с плоским конденсатором. Однако теория этого взаимодействия применительно к мембранным системам разработана недостаточно.

В ван-дер-ваальсовых взаимодействиях в мембранах наибольшее значение имеют дисперсионные силы [см. (VIII.1.14)]. Эти силы являются преобладающими во взаимодействии фаз, разделенных мембраной. Расчет этих взаимодействий проводят путем суммирования парных взаимодействий по всему объему. Для двух фаз, разделенных узким зазором толщиной  $l$ , вначале находят энергию парных взаимодействий одной молекулы фазы со всеми остальными молекулами противоположной фазы. Затем интегрируют эти взаимодействия для всех молекул, находящихся в объеме первой фазы. В результате можно определить силы притяжения  $F$ , или расклинивающее давление  $\Pi_{\text{дисп}}$ , приходящееся на единицу площади:

$$\Pi_{\text{дисп}} = -F = -\pi q^2 \beta / (6l^3) = -B / (6\pi l^3), \quad (\text{XV.3.6})$$

где  $q$  — число молекул в единице объема,  $l$  — толщина зазора между фазами,  $\beta$  — константа дисперсионных взаимодействий Лондона [см. (VIII.1.15)].

▽ Величина

$$B = \pi^2 q^2 \beta \quad (\text{XV.3.7})$$

называется константой Гамакера. □

Суммирование парных взаимодействий приводит к резкому возрастанию дальности действия дисперсионных взаимодействий между телами. Это приводит к тому, что дисперсионные взаимодействия тел обнаруживаются на расстояниях, существенно превышающих толщину липидных и биологических мембран вплоть до 100 нм. Отметим также, что для простоты выражение (XV.3.6) получено для взаимодействия двух аналогичных тел через вакуум. Когда тела взаимодействуют через слой, представляющий собой мембранную систему, в приведенных выражениях константа Гамакера должна быть заменена на сложную константу Гамакера, которая учитывает взаимодействие между молекулами разных типов в такой системе.

В отсутствие неоднородностей расклинивающее давление  $\Pi$  в БЛМ можно представить как сумму составляющих:

$$\Pi = \Pi_{\text{дисп}} + \Pi_{\text{эл-стат}}. \quad (\text{XV.3.8})$$

▽ При взаимодействии в растворе однородных клеток, имеющих не слишком большой поверхностный потенциал, дисперсионная составляющая энергии ван-дер-ваальсова взаимодействия проявляется на больших расстояниях, чем электростатическая (отталкивание). Это означает, что суммарный эффект таких сил может приводить к появлению минимума энергии взаимодействия клеток при расстояниях между ними 3–8 нм. Отсюда следует, что в определенных условиях во взвеси клеток могут находиться клетки, объединенные взаимным притяжением. Они должны отличаться от других клеток рядом свойств, в том числе подвижностью. Существование таких клеток подтверждается экспериментально, например по оседанию эритроцитов, или при движении клеток под действием электрического поля. Естественно, что глубина и ширина энергетической «ямы» определяются целым рядом

факторов, в том числе плотностью поверхностных зарядов, рН среды, ионной силой и др.  $\square$

**Термодинамика равновесия двусторонних пленок (мембран).** Для термодинамического описания мембранных систем используют подход Гиббса, в котором не рассматриваются реальные свойства системы вблизи границы раздела фаз, обусловленные особенностями молекулярных взаимодействий у поверхности (см. гл. XVII–XVIII).

Пользуясь методом Гиббса, можно схематически представить реальную систему, ограничив мембрану с двух сторон разделяющими поверхностями и полагая, что фаза  $\beta$  однородна вплоть до этой поверхности (рис. XV.8). В методе Гиббса определяется толщина мембраны как расстояние между двумя разделяющими поверхностями. Если внутри мембраны сохраняется слой со свойствами объемной фазы, то такую мембрану называют толстой. Для толстых пленок характерно свойство аддитивности, когда значение энергии складывается из ее значений для объемной фазы и поверхностных слоев. При отсутствии слоя со свойствами объемной фазы в пленках наблюдается взаимодействие между поверхностными слоями и условия аддитивности энергии не выполняются. Такие пленки называют тонкими. Подавляющая часть природных мембран удовлетворяет термодинамическим критериям тонких пленок. Важная особенность тонких пленок состоит в том, что давление в фазе, из которой сформирована пленка (мембрана), и давление в окружающей среде не одинаковы. Эту разницу давлений

$$p^\beta - p^\alpha = \Pi \quad (\text{XV.3.9})$$

Б. В. Дерягин назвал расклинивающим давлением. Расклинивающее давление, по сути, обусловлено обобщенным эффектом всех молекулярно-поверхностных сил [см. (XV.3.6)] в тонком слое. В соответствии с определением Дерягина знак давления выбран положительным при наличии отталкивания поверхностных слоев и отрицательным — при притяжении.

$\nabla$  Таким образом, тонкие мембраны (плёнки) могут быть охарактеризованы не только межфазным натяжением, но и расклинивающим давлением и полным натяжением пленки. Межфазное натяжение [см. (XV.3.1)] представляют как работу изотермического изменения площади  $A$  пленки при неизменной толщине

$$\sigma = \frac{1}{2} (\partial F / \partial A)_{T,h,n}, \quad (\text{XV.3.10})$$

где  $F$  — свободная энергия,  $T$  — температура,  $h$  — толщина пленки,  $n$  — число молекул пленки.  $\square$

Полное натяжение  $\nu$  пленки характеризуют как работу изотермического изменения площади пленки при постоянном объеме  $V$ :


$$\nu = (\partial F / \partial A)_{T,V,n}. \quad (\text{XV.3.11})$$

Очевидно, что в последнем случае изменяется толщина пленки и приведенное выражение включает составляющую работы за счет изменения расклинивающего давления. В наиболее простом виде взаимосвязь всех этих параметров пленки определяется уравнением

$$\nu = 2\sigma + Ph \quad (\text{XV.3.12})$$

В этом уравнении коэффициент 2 введен для учета межфазного натяжения обеих поверхностей пленки.

#### § 4. Механические свойства мембран

 **Подвижность молекулярных компонентов в мембранах.** Гидрофобный эффект, объединяющий молекулярные компоненты в мембранах, препятствует их выходу в водную фазу за пределы мембраны. В то же время силы межмолекулярного взаимодействия обычно не мешают молекулам в мембранах обмениваться друг с другом местами, поскольку площадь контакта между водой и гидрофобными участками молекул при этом практически не изменяется. Вследствие этого молекулярные компоненты в мембранных системах сохраняют индивидуальную подвижность и могут диффузионным путем передвигаться в пределах мембран.  $\square$

Молекулы липидов легче всего совершают вращательное движение вокруг своей длинной оси. Время корреляции вращательного движения  $\tau_c$  молекул (время поворота на угол, равный 1 рад) спин-меченых фосфолипидных молекул, стеринов и жирных кислот в различных модельных и природных мембранах, находящихся в жидком состоянии, составляет  $\sim 10^{-9}$  с. Вращательная подвижность сохраняется сравнительно высокой ( $\tau_c \sim 10^{-8}$  с) и при температуре ниже точки плавления жирнокислотных цепей липидов в мембранах.

Диффузионное перемещение молекул липидов вдоль слоя, обычно называемое латеральной диффузией, также совершается достаточно быстро. Коэффициент латеральной диффузии  $D$  спин-меченых и флуоресцентных фосфолипидных зондов во многих искусственных и биологических мембранах составляет  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  см<sup>2</sup>/с (табл. XV.4). Среднеквадратичное расстояние, которое молекула проходит вдоль

Таблица XV.4.

Константы латеральной диффузии липидов в искусственных и природных мембранах

Мембраны	$D$ , см <sup>2</sup> · с <sup>-1</sup> · 10 <sup>8</sup>	Температура, °С	Метод
Яичный лецитин (везикулы)	1,8	30	ЯМР
	1,8	25	ЭПР
Яичный лецитин + холестерин (везикулы), 4 : 1	5	25	ЭПР
	10	40	ЭПР
<i>E. coli</i>	1,8	31	ЯМР
Седалищный нерв	0,5	31	ЯМР
Липиды мембран седалищного нерва	0,8	31	ЯМР
Саркоплазматический ретикулум	1,8	25	ЯМР
Липиды саркоплазматического ретикулума	0,4	31	ЯМР
Микросомы печени	11	30	ЭПР

мембраны за время  $t$ , равно

$$\bar{l} = \sqrt{4Dt}. \quad (\text{XV.4.1})$$

Легко вычислить, что при  $D = 6 \times 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$  молекула липида за 1 с перемещается по мембране на расстояние порядка 5000 нм, т. е. может «обежать» всю плазматическую мембрану таких клеток, как эритроцит, *E. coli* и др. Скорость латеральной диффузии существенно зависит от липидного состава мембран и температуры. Так, холестерин, добавленный к яичному лецитину в количестве 30–50 моль, снижает скорость латеральной диффузии более чем в два раза. Энергия активации латеральной диффузии в липосомах из яичного лецитина и мембранах саркоплазматического ретикулума при комнатных температурах составляет 29–46 кДж/моль. При температурах ниже точки плавления углеводородных цепей липида константа латеральной диффузии снижается примерно на порядок и более.

Другой тип движения молекул липидов в мембранных системах — это трансби-слойное движение (флип-флоп-переход). Оно осуществляется в мембранах с относительно малой скоростью вследствие высокого барьера для пересечения полярной головкой молекулы липида углеводородной зоны мембран. В модельных везикулярных мембранах скорость флип-флоп-перехода, оцененная по времени переноса половины количества молекул-меток из одного полуслоя в другой, составляет 10–20 ч и более. В природных мембранах этот процесс может идти существенно быстрее. В мембранах электрических органов угря это время составляет 3–7 мин, в мембранах эритроцитов — 20–30 мин. Отмечено, что при добавлении к мембранам клиновидных молекул, индуцирующих появление искривленных структур, а также при нарушении равновесного распределения молекул между слоями (например, при действии фосфолипаз) скорость флип-флоп-перехода резко возрастает. Очевидно, что сохранение ассиметричного распределения молекулярных компонентов в искусственных и природных мембранах возможно только при относительно медленной скорости флип-флоп переходов в этих системах.

Молекулы белков в мембранах также проявляют диффузную подвижность. Однако вследствие большей массы они движутся существенно медленнее. Так, время корреляции вращения родопсина в фоторецепторных мембранах  $\sim 10^{-6}$  с; для цитохромоксидазы это время  $\sim 10^{-4}$  с.

Латеральная подвижность белков также существенно ниже, чем липидов. Коэффициенты латеральной диффузии белков в природных мембранах при комнатных температурах обычно находятся в пределах  $10^{-10}$ – $10^{-12} \text{ см}^2/\text{с}$  (табл. XV.5).

Приведенные выше константы латеральной и вращательной диффузии липидных и белковых молекул в мембранах свидетельствуют, что при физиологических условиях мембранные системы проявляют свойства двумерной жидкости. Вязкость  $\eta$  этих сред формально можно определить, исходя из уравнения Стокса—Эйнштейна:

$$\eta = \frac{k_B T}{6\pi D r}, \quad (\text{XV.4.2})$$

где  $r$  — радиус диффундирующей молекулы. Однако, поскольку мембраны неоднородны и ассиметричны, скорость вращения или латеральной диффузии зондов в мембранах определяется микроструктурой их непосредственного окружения.

Таблица XV.5.

Константы латеральной диффузии мембранных белков

Клетки	Белки	$D, \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	Температура, °C	Метод
Гетерокарионты (мышь — человек)	Поверхностные антигены	$2 \cdot 10^{-10}$	37	Слияние мембран
Мышечное волокно	Поверхностные антигены	$(1 \div 3) \cdot 10^{-9}$	25	Флуоресцентная метка
«Тени» эритроцитов	Интегральные белки	$4 \cdot 10^{-11}$	37	Слияние
	Рецепторы конканавалина А	$(4 \div 7) \cdot 10^{-10}$	22	Электрофорез
Мышца эмбрионов	Родопсин	$(2 \div 6) \cdot 10^{-9}$	20	ЭПР
Наружные сегменты палочек сетчатки	Родопсин	$(2 \div 6) \cdot 10^{-9}$	20	ЭПР
Миобласты	Ацетилхолиновые рецепторы	$(4 \div 5) \cdot 10^{-11}$	22	ЭПР
Фибробласты	Рецепторы гормонов	$(3 \div 5) \cdot 10^{-10}$	23	ЭПР

Вследствие этого вязкость, формально вычисленную из параметров подвижности того или иного зонда в мембране, рассматривают как «микровязкость». Под этим подразумевают вязкость однородного эквивалента мембраны, в котором зонд проявляет аналогичную подвижность (ср. § 2 гл. X). Отсюда понятно, что в зависимости от метода измерения подвижности, характера зонда и глубины его локализации в мембране значения микровязкости могут варьировать. Для сравнения в табл. XV.6 приведены значения микровязкости для ряда природных мембран, углеводородных областей модельных мембран и вязкости некоторых простых сред. В природных мембранах обычно наблюдается некоторое возрастание вязкости

Таблица XV.6.

Микровязкость углеводородной области липидного бислоя в искусственных и природных мембранах, некоторых маслах и других жидкостях

Объект	Вязкость, П	Температура, °C	Метод измерения
Эритроциты человека	2,5	37	Флуоресцентный зонд
«Тени» эритроцитов	3,8	37	То же
Липиды, экстрагированные из «теней» эритроцитов	3,4	37	»
Мембраны <i>E. coli</i>	2,5	Температура роста	ЭПР-спиновый зонд
Липиды, экстрагированные из мембран <i>E. coli</i>	1,8–1,9	То же	То же
Яичный лецитин	0,73	37	Деполаризация флуоресценции перилена
То же + холестерин (3 : 2)	6,4	37	То же
Дипальмитоиллецитин	3,9	37	»
То же + холестерин (6 : 1)	11	37	»
Льняное масло	0,331	30	—
Оливковое масло	0,84	30	—
Касторовое масло	9,86	30	—
Глицерин	8,3	30	—
Вода	0,0106	30	—

липидов, образующих ближайшее окружение мембранных белков, обусловленное ограничением подвижности липидов за счет так называемых белок-липидных взаимодействий и некоторых других эффектов.

▽ Совокупность всех полученных к настоящему времени результатов по оценке вязкости мембран позволяет сделать вывод, что для нормального функционирования большинства природных мембран углеводородная зона должна находиться в жидком состоянии, причем ее вязкость должна быть примерно равна вязкости оливкового масла. □

**Упругие свойства мембран.** Под упругостью мембран (пленки) понимают их способность изменять свое натяжение при растяжении (сжатии). В общем случае реакция мембран на внешние воздействия оказывается сложной и описывается лишь эмпирическими уравнениями. Однако при малых амплитудах и низких скоростях деформации мембран под действием внешних сил процесс с достаточной степенью точности можно рассматривать как термодинамически обратимый.

В равновесных условиях при постоянной температуре упругая потенциальная энергия мембран совпадает со свободной энергией Гельмгольца [см. (V.1.5)]:  $F = U - TS$ .

Упругий потенциал  $F$  при постоянной температуре равен работе  $W$ , совершенной над системой:

$$(dF)_T = dU - TdS = dW. \quad (\text{XV.4.3})$$

Допущение, что мембрана изотропна вдоль поверхности, позволяет представить плотность потенциальной энергии упругости как функцию двух независимых переменных, характеризующих два типа деформации: относительного изменения площади поверхности  $\alpha$  за счет изотропного растяжения (сжатия) и параметра  $\beta$ , отражающего деформационное растяжение (сдвиг) поверхности при постоянной площади (например, растяжение круглой области в эллипсоидную). Отсюда упругий потенциал можно представить через частные производные по каждому из этих параметров:

$$(dF)_T = \left(\frac{\partial F}{\partial \alpha}\right)_{\beta, T} d\alpha + \left(\frac{\partial F}{\partial \beta}\right)_{\alpha, T} d\beta. \quad (\text{XV.4.4})$$

Противодействие изотропному растяжению (сжатию) является свойством, характерным для твердого и жидкого состояний. В мембранах изотропное растяжение (сжатие) площади поверхности происходит относительно равновесного состояния. Это начальное изотропное натяжение  $\tilde{T}_0$  в мембране можно определить через частную производную свободной энергии в исходном состоянии ( $\alpha = 0$ ):

$$\tilde{T}_0 = \left(\frac{\partial F}{\partial \alpha}\right)_{\beta, T} \Big|_{\alpha=0}. \quad (\text{XV.4.5})$$

▽ Связь изменения изотропного натяжения с малыми относительными изменениями площади (по сравнению с начальным состоянием) задается модулем поверхностного изотермического сжатия (модуль Юнга):

$$E_{||} = \left(\frac{\partial T}{\partial \alpha}\right)_{\beta, T} \Big|_{\alpha=0} = \left(\frac{\partial^2 F}{\partial \alpha^2}\right) \Big|_{\alpha=0}. \quad (\text{XV.4.6})$$

При деформационном растяжении (при постоянстве площади) накопление энергии и сопротивление деформации характеризуется поверхностным модулем упругости мембран при сдвиге  $\mu$ . Этот модуль определяется как частная производная упругой энергии по параметру деформации  $\beta$  при постоянной площади и температуре:

$$\mu = \left( \frac{\partial F}{\partial \beta} \right)_{\alpha, T}. \quad (\text{XV.4.7})$$

□

Эти два модуля — важнейшие характеристики мембран при механических воздействиях. Можно оценить модуль изотермического поверхностного сжатия бислоя в водной фазе, сравнивая площадь, занимаемую молекулой в естественном ненапряженном состоянии, и собственную площадь молекулы, или исключенную площадь. Например, модуль поверхностного упругого сжатия лецитинового бислоя  $E_{\parallel} \simeq 1,5 \cdot 10^{-3}$  Н/см. В природных мембранах упругие свойства могут существенно изменяться за счет структурных белков. Так, в мембране эритроцитов липидный бислой поддерживается сетью гибких молекул структурного белка спектрина. Модельные расчеты и непосредственные механические измерения на мембранах эритроцитов указывают, что поверхностный модуль упругого сжатия этих мембран равен  $(3 \div 4) \cdot 10^{-3}$  Н/см, а поверхностный модуль сдвига  $\sim 10^{-5}$  Н/см. Отсюда следует, что значение модуля сдвига примерно на четыре порядка ниже по сравнению с поверхностным модулем упругого сжатия природных мембран. Это означает, что клеточные мембраны сильно сопротивляются изменению поверхностной плотности или площади, но легко деформируются без изменения площади мембраны.

При нагревании мембран эритроцитов до  $50^\circ\text{C}$ , когда спектриновая сетка разрушается, поверхностный модуль упругого сжатия снижается примерно в 2–3 раза. Отсюда вклад липидного бислоя в общий модуль поверхностного упругого сжатия мембран эритроцитов оценивают величиной порядка  $10^{-3}$  Н/см, а вклад спектриновой сетки  $\sim 2 \cdot 10^{-3}$  Н/см.

Измерение механических характеристик природных мембран — сложная экспериментальная задача, требующая тонких, подчас ювелирных методик (всасывание мембран в микропипетку, одностороннее растяжение мембран, вибрационные методики и др.).

Упругость БЛМ. Ввиду сложности строения и малых геометрических размеров природных мембран исключительно важная роль в изучении упругих свойств мембранных систем принадлежит искусственным мембранным системам и главным образом БЛМ. Эти мембраны, сформированные на отверстиях в перегородках, имеют сравнительно большие площади. Кроме того, экспериментальное изучение механических свойств этих систем возможно при использовании в качестве сжимающей мембрану механической силы давления, создаваемого электрической разностью потенциалов, — явление электрострикции. □

В простейшем приближении БЛМ рассматривают как однородное изотропное двумерное жидкое тело с осью симметрии упругих свойств, перпендикулярной его поверхности (рис. XV.9). Для таких систем модуль поперечной упругости (модуль Юнга) можно представить в виде

$$E'_{\perp} = (-h/\Delta h)\Delta p, \quad (\text{XV.4.8})$$

модуль продольного изотропного растяжения

$$E'_{\parallel} = (S/\Delta S)\Delta f, \quad (\text{XV.4.9})$$

где  $p$  — сила, сдвливающая мембрану в направлении, нормальном к поверхности  $S$ ;

$f$  — сила изотропного сжатия. Модули упругости мембран рассчитываются с учетом или без учета ее толщины; связь этих модулей задается выражением  $E = E'h$ , где  $h$  — толщина мембраны.

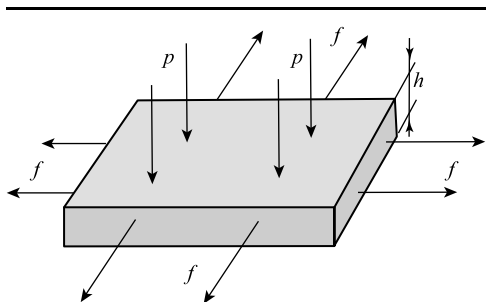
При создании разности электрических потенциалов на мембране сжимающая механическая сила равна

$$F_E = \frac{C_M \varphi^2}{2h_C} = \frac{\varepsilon \varphi^2}{2h_C}, \quad (\text{XV.4.10})$$

Рис. XV.9.

Действующие на мембрану силы  $p$ ,  $f$

$p$  — сжимающие,  $f$  — растягивающие;  $h$  — толщина мембраны



где  $C_M$  — емкость мембраны,  $\varphi$  — разность потенциалов,  $h_C$  — диэлектрическая (емкостная) толщина мембраны,  $\varepsilon$  — диэлектрическая постоянная.

Для оценки реально достигаемых значений давления рассмотрим БЛМ из монолауроилглицирида с холестерином. Для этой мембраны  $C_M = 0,64$  мкФ/см<sup>2</sup> ( $\varepsilon = 2,1$ ), а максимальное напряжение  $\sim 0,86$  В. Отсюда находим предельное значение  $F_E = 81,6$  Н/см<sup>2</sup>, т. е. на мембрану действует давление  $\sim 8 \cdot 10^5$  Па. Обычно  $C_M \sim 0,38$  мкФ/см<sup>2</sup>;  $\varphi \sim 0,1$  В;  $F_E \sim 0,04$  Н/см<sup>2</sup>.

Таким образом, сдвливающую силу  $F_E$  можно легко изменять в широких пределах с помощью приложенной разности потенциалов. Приравнявая найденное значение  $F_E$  к величине  $\Delta p$  из (XV.4.8), получим выражение

$$|E'_{\perp} \Delta h/h| = \varepsilon \varphi^2 / (2h_C^2), \quad (\text{XV.4.11})$$

из которого на основании экспериментальных оценок изменения толщины мембраны  $\Delta h$  под действием приложенной разности потенциалов вычисляют модуль  $E'_{\perp}$  упругой деформации БЛМ. Эти методы, однако, не учитывают важных свойств мембран.

Основная сложность вычисления  $\Delta h/h$  по величине  $\Delta C/C$  обусловлена непостоянством  $\varepsilon$  и площади  $S$  бислойной части БЛМ при наложении разности потенциалов. При этом форма тора и микролинз меняется (см. рис. XV.7), что приводит к изменению общей площади бислойных участков мембраны и изменению при сжатии бислоя. Кроме того, упругость БЛМ, содержащих растворитель, изменяется со временем, так как растворитель вытесняется из бислоя в тор или микролинзы. Поэтому БЛМ, вообще говоря, следует охарактеризовывать модулем Юнга, зависящим от времени. Результаты измерений на «сухих», бездефектных БЛМ показали, что эти мембраны характеризуются  $E'_{\perp} \sim 5 \cdot 10^4$  Н/см<sup>2</sup>, что близко к значениям модуля упругой деформации винилпласта ( $4 \cdot 10^4$ ) и целлулоида ( $1,1 \cdot 10^5$ ).



Столь высокая устойчивость липидных бислоев в отношении упругой деформации означает, что электрострикционные изменения толщины природных мембран в физиологическом диапазоне трансмембранных потенциалов ( $\sim 0,1$  В) не превышают сотых долей нанометра. Следовательно, геометрические изменения толщины природных мембран вряд ли могут играть сколько-нибудь существенную роль при их функционировании.

Для мембран как однородного изотропного тела значения модулей Юнга  $E'_{\perp}$  (XV.4.8) и  $E'_{\parallel}$  (XV.4.9) должны совпадать. В действительности БЛМ оказались более упругими при их поперечном сжатии, т. е. упругие свойства мембран анизотропны.

☐ **Механизмы разрушения липидного бислоя.** Приведенные выше характеристики упругих свойств мембранных систем свидетельствуют, что липидный бислой мембран представляет достаточно жесткое структурное образование. Это имеет большое значение для поддержания формы разнообразных клеточных структур и выполнения барьерных функций природными и искусственными мембранами. Однако известно, что время жизни БЛМ ограничено и зависит от состава мембран и внешних условий. В природных мембранах также в ряде случаев возникают механические нарушения и дефекты, причем эти явления сопряжены с такими важными биологическими процессами, как слияние клеток, лизис, секреция, гемолиз. ☐

Исходя из общей теории устойчивости, условия устойчивости мембран (пленок) записываются в виде следующих простых неравенств:

$$(\partial v / \partial A)_{S, V, n} > 0, \quad (\partial v / \partial h)_{S, V, n} < 0, \quad (\partial \Pi / \partial h)_{S, A, n} < 0. \quad (\text{XV.4.12})$$

☐ Эти неравенства означают, что мембраны устойчивы, когда изменения расклинивающего давления  $\Pi$  [см. (XV.3.9)] или полного натяжения мембран  $v$  [см. (XV.3.11)] препятствуют изменениям ее геометрии [ср. (V.1.9а) гл. V]. ☐

Обычно процесс разрушения мембран связывают с достижением параметрами системы некоторых критических значений, после чего процесс отклонения становится необратимым и наступает разрушение мембран. Липидные бислои устойчивы лишь при малых изменениях параметров, т. е. представляют собой метастабильные системы.

Отклонение мембран от равновесия можно связать с возникновением дефектов в структуре мембран за счет случайного локального сжатия в продольном или поперечном направлении. Случайное уменьшение толщины мембраны носит резко выраженный локальный характер, что следует рассматривать как начальный этап формирования локального углубления.

☐ Наиболее признанным в настоящее время является механизм разрушения мембран, обусловленный дефектами типа сквозной поры. Предполагают, что в этом случае формирование дефекта сопровождается переориентацией молекул липида, расположенных вблизи границы дефекта с образованием так называемой инвертированной поры. Для приближенного описания охарактеризуем пору радиусом эквивалентного цилиндрического дефекта  $r$ . Энергия  $E$  дефекта равна работе образования такого дефекта за вычетом энергии соответствующего бездефектного участка

мембраны, т. е.

$$E = 2\pi\tilde{\sigma}r - \pi\sigma r^2, \quad (\text{XV.4.13})$$

где  $\tilde{\sigma}$  — линейное натяжение единицы длины периметра дефекта ( $\tilde{\sigma} = h\sigma_n$ );  $\sigma$  — натяжение мембраны;  $h$  — толщина мембраны;  $\sigma_n$  — межфазное натяжение «внутренней» поверхности дефекта (поры).  $\square$

Эта функция имеет форму кривой с максимумом в точке  $r_{\text{кр}} = \tilde{\sigma}/\sigma$ . Очевидно, что случайные дефекты при  $r < r_{\text{кр}}$  будут «захлопываться» под действием сил, возникающих при их образовании. В то же время для разрушения БЛМ достаточно появления всего одного дефекта с надкритической величиной радиуса  $r > r_{\text{кр}}$ .

Многие природные мембраны функционируют в условиях, когда к ним приложена высокая (250–300 мВ) разность электрических потенциалов (см. гл. XXIV), что резко сокращает время жизни БЛМ, хотя кратковременное воздействие электрического поля на БЛМ приводит к увеличению фоновой проводимости и появлению флуктуаций проводимости (см. § 5 гл. XXI). Это указывает на возможность формирования простейших каналов под действием поля, тем более что их появление на БЛМ удастся регистрировать и при других модификациях липидов (фазовые переходы при нагревании, введение продуктов перекисного окисления; см. § 1–2 гл. XVI). Поэтому механизмы электрического пробоя БЛМ представляют несомненный интерес для понимания их функционирования.

Один из первых механизмов разрыва мембран в электрическом поле был предложен Дж. Кроули (1973). Согласно этой электромеханической модели мембрану рассматривают как конденсатор с упругим диэлектриком между обкладками. При наложении разности потенциалов электрическая сила  $F_E$ , сдавливающая обкладки такого конденсатора, уравновешивается силой упругости  $F_{\text{упр}}$ , описываемой законом Гука [ср. (XV.4.11)]:

$$E \ln \frac{h_0}{h} = \frac{\varepsilon_m \varphi^2}{2h^2}. \quad (\text{XV.4.14})$$

Это уравнение не имеет корней при  $\varphi > \varphi_{\text{кр}}$ , где  $\varphi_{\text{кр}} = \sqrt{0,376Eh_0^2/\varepsilon}$ . Исчезновение решения объясняется разной зависимостью  $F_E$  и  $F_{\text{упр}}$  от толщины мембраны ( $F_E \sim h^{-2}$ ;  $F_{\text{упр}} \sim \ln(1/h)$ ). Отсутствие решения означает возникновение электромеханического коллапса, приводящего к деструкции мембраны при потенциалах, превышающих  $\varphi_{\text{кр}}$  — потенциал пробоя.

Электромеханическая модель позволяет дать простое объяснение сильной нелинейности вольтамперных характеристик мембран (см. гл. XIX). Однако в модели рассматривают поведение мембраны как единого однородного тела без учета возможных локальных изменений молекулярной организации липидного бислоя. Кроме того, экспериментальные данные дают существенно более низкое критическое уменьшение (до 20%) толщины мембраны при коллапсе по сравнению с моделью. В настоящее время интенсивно развиваются представления, согласно которым пробой мембран под действием электрического поля обусловлен особенностями поведения локальных дефектов типа сквозной поры в липидном бислое.

**Пробой как следствие локальных дефектов.** Наиболее полное экспериментальное и теоретическое исследование электрического пробоя БЛМ проведено в работах

Ю. А. Чизмаджева. Установлено, что среднее время жизни  $\bar{t}$  БЛМ в электрическом поле падает при увеличении разности потенциалов на мембране (рис. XV.10). Этот факт свидетельствует о том, что термин «потенциал пробоя»  $\varphi_{кр}$ , используемый в электромеханической модели, лишен четкого смысла и не может быть использован в качестве параметра устойчивости мембран в электрическом поле.

Рассмотрим, как изменится энергия мембраны при появлении в ней цилиндрической поры радиуса  $r$ . Для расчета энергии дефекта необходимо учесть работу, связанную с изменением поверхности раздела (увеличение поверхности раздела мембрана-раствор за счет образования боковой поверхности цилиндра и уменьшение поверхности раздела за счет убыли участков, соответствующих торцам цилиндра), и, кроме того, изменение энергии конденсатора в объеме поры, связанное с заменой плохого диэлектрика (липиды с диэлектрической проницаемостью  $\epsilon_m = 2 \div 3$  на воду ( $\epsilon_s \sim 80$ )).

Изменение энергии мембраны при образовании в ней цилиндрической поры описывается уравнением

$$E = 2\pi r \tilde{\sigma} h - \pi r^2 \sigma - \Delta C \varphi^2 / 2, \quad (\text{XV.4.15})$$

где  $h$  — толщина мембраны,  $r$  — радиус поры,  $\sigma$  — поверхностное натяжение, т. е. работа, затрачиваемая на образование 1 см<sup>2</sup> поверхности липидного слоя,  $\Delta C$  — изменение электрической емкости мембраны при появлении в ней структурного дефекта. В (XV.4.15) первые два члена отражают поверхностную энергию дефекта, а последний — изменение электрической энергии мембраны при появлении сквозной поры. Изменение электрической емкости мембраны при появлении поры можно выразить в виде

$$\Delta C = \pi r^2 C_0 (\epsilon_s / \epsilon_m - 1), \quad (\text{XV.4.16})$$

где  $C_0$  — емкость единицы площади мембраны. Следовательно,

$$E = 2\pi \tilde{\sigma} r - \pi r^2 (\sigma + C \varphi^2 / 2), \quad (\text{XV.4.17})$$

где  $C = C_0 (\epsilon_s / \epsilon_m - 1)$ . Зависимость энергии системы от радиуса дефекта, описываемая уравнением (XV.4.17), имеет вид кривой с максимумом (рис. XV.11). Из рисунка видно, что дефекты малого радиуса будут иметь тенденцию к исчезновению. Однако дефекты с радиусом, превышающим некоторое критическое значение  $r_{кр}$ , будут необратимо увеличиваться, приводя к разрыву мембраны. Подведение к мембране разности потенциалов приводит к уменьшению критического радиуса поры и максимального значения энергии (высота энергетического барьера). Именно этим и объясняется увеличение вероятности разрыва мембран в электрическом поле.

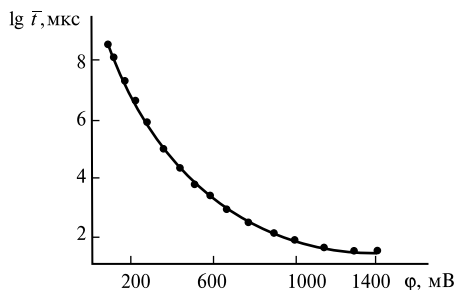


Рис. XV.10.

Зависимость среднего времени жизни  $\bar{t}$  БЛМ из суммарных липидов в декане от разности потенциалов  $\varphi$  на мембране

Зависимость критического радиуса дефекта, соответствующего точке максимума на кривой  $E(r)$ , определяется из условия  $dE/dr = 0$  и описывается соотношением

$$r_0 = \frac{\tilde{\sigma}}{\sigma + C\varphi^2/2}. \quad (\text{XV.4.18})$$

Подстановкой (XV.4.18) в (XV.4.17) находим зависимость максимального значения энергии  $E^*$  от потенциала:

$$E^* = \frac{\pi\tilde{\sigma}}{\sigma + C\varphi^2/2}. \quad (\text{XV.4.19})$$

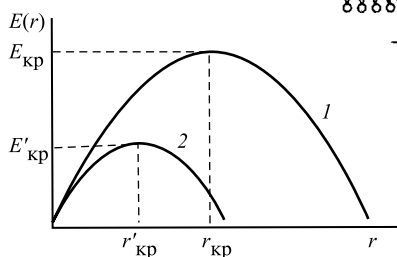


Рис. XV.11.

Зависимость энергии дефекта в мембране  $E(r)$  от его радиуса  $r$  в отсутствие электрического поля и при наложении разности потенциалов  $\varphi$  (по В. Ф. Антонову, 1982)

1 — при  $\varphi = 0$ ; 2 — при  $\varphi > 0$ ; вверху справа — изображение поры в бисюле

Таким образом, под действием электрического поля уменьшается энергия образования критического барьера  $E^*$ , в результате чего вероятность образования надкритического дефекта возрастает. При возникновении такого дефекта мембрана разрывается самопроизвольно, так как увеличение размера дефекта сопровождается понижением свободной энергии системы.

Согласно теории электрического пробоя, среднее время жизни  $\bar{t}$  мембран в электрическом поле есть величина, обратная стационарной скорости потока дефектов через энергетический барьер  $E^*$ :

$$\bar{t} = 1/j. \quad (\text{XV.4.20})$$

Скорость процесса, энергия активации которого равна  $E^*$ , можно в первом приближении описать уравнением

$$j = k_0 \exp \frac{-E^*}{k_B T}. \quad (\text{XV.4.21})$$

Из уравнений (XV.4.20) и (XV.4.21) с учетом (XV.4.19) находим зависимость среднего времени жизни мембран от потенциала:

$$\bar{t} = A \exp \frac{E^*}{k_B T} = A \exp \frac{\pi\tilde{\sigma}^2}{k_B T(\sigma + C\varphi^2/2)}, \quad (\text{XV.4.22})$$

где  $A$  — константа. Соотношение (XV.4.22) описывает в первом приближении зависимость среднего времени жизни мембран от приложенного потенциала.

Анализ показывает, что форма зависимости  $\bar{t}(\varphi)$  гораздо более чувствительна к изменению параметра  $\tilde{\sigma}$ , чем к изменению  $\sigma$ . Оказалось, что минимальные значения  $\tilde{\sigma}$  характерны для мембран из лизолецитина, молекулу которого можно представить

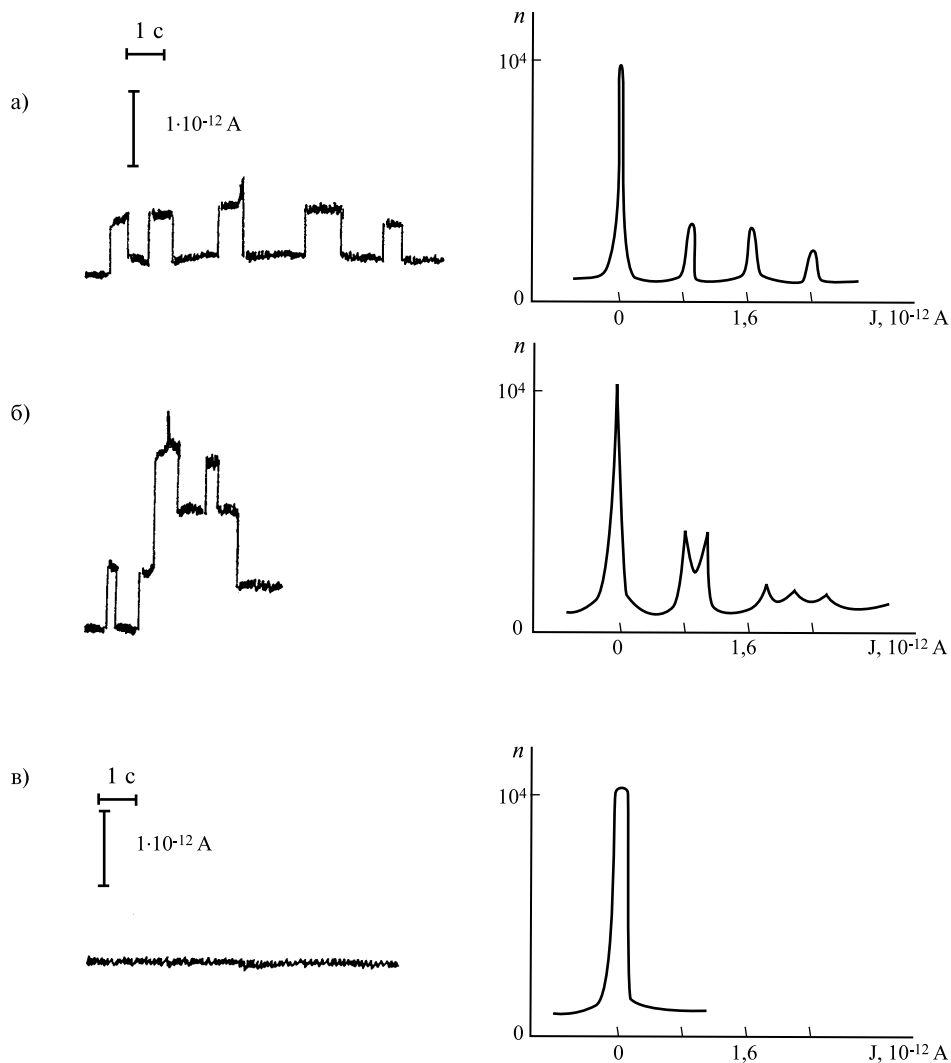


Рис. XV.12.

Флуктуации тока через бислойную липидную мембрану. Справа — частотное распределение токов, построенное с помощью анализатора сигналов. Напряжение на мембране — 100 мВ.

а) мембрана сформирована из 0,2% раствора дистеалоилфосфатидилхолина при температуре 59 °С; б) флуктуации тока в грамицидиновом канале; в) бислойная мембрана из яичного лецитина в *n*-декане при температуре 22 °С в присутствии  $10^{-9}$  М грамицидина А (по В. Ф. Антонову, 1980).

в виде конуса: основанием его служит большая полярная часть молекулы, вершиной — гидрофобный жирнокислотный остаток. Для мембран из лецитина, молекулы которого имеют цилиндрическую форму, характерны промежуточные значения  $\tilde{\sigma}$ . Максимальные значения  $\tilde{\sigma}$  свойственны мембранам из фосфолипидов типа фосфатидилэтаноламина, молекулы которых имеют форму конуса с малой полярной головой и большим гидрофобным основанием.

По-видимому, вероятность локальных искажений бислоя с образованием дефектов типа сквозных пор зависит от геометрии липидных молекул. Молекулы конической формы типа лизолецитина, находясь в бислое, проявляют большую склонность к образованию водных пор по сравнению с молекулами, имеющими форму цилиндра или перевернутого конуса. Таким образом, значения  $\tilde{\sigma}$ , вероятно, характеризуют спонтанную кривизну мембран из различных фосфолипидов.

**Дефекты типа сквозных пор при фазовом переходе липидов.** Появление гидрофильных пор в бислойных липидных мембранах при фазовом переходе из жидкокристаллического состояния в гель было обнаружено в лаборатории В. Ф. Антонова. Стрессовое состояние липидного бислоя может быть достигнуто изменением температуры в области основного фазового перехода липида, образующего бислой. Особенность этого процесса заключалась прежде всего в том, что рождение трансмембранных пор происходило при электрическом напряжении на мембране, не превышающем 100 мВ, что весьма далеко от напряжения электрического пробоя и соответствует физиологическим значениям мембранных потенциалов (XXIII, § 1). «Замораживание» липидного бислоя при физиологических температурах (ДМФХ 23 °С, ДПФХ 42 °С) сопровождается значительным снижением константы латеральной диффузии молекул липида и микровязкости липидного бислоя (табл. XV.6), что позволяет резко замедлить процесс затекания пор и уверенно регистрировать этапы рождения пор по флуктуациям тока. На рис. XV.12 показаны флуктуации тока, соответствующие проводимости гидрофильных пор в бислойной мембране из дистеароилфосфатидилхолина (ДСФХ) при температуре фазового перехода (а). Для сравнения ниже представлены флуктуации тока в грамицидиновом канале (б). Можно видеть, что липидные поры в отличие от пептидных сильно варьируют по размерам — гистограмма выявляет по крайней мере 4 вида пор. В жидкокристаллическом состоянии флуктуации тока не регистрируются (в). Значительная вариабельность липидных каналов согласуется с концепцией о случайном блуждании пор.

Рождение пор в липидном бислое обусловлено уменьшением упругой энергии бислоя в результате замораживания, появлением локальных пустот, эволюционирующих в гидрофильную пору. Причиной образования пустот может служить изменение площади, приходящейся на головку молекулы липида, в результате гош-транс перехода (для дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФК) от 58 Å<sup>2</sup> до 48 Å<sup>2</sup>. Если принять, что размеры липидного домена, в котором рождается пора, сопоставимы с размерами кооперативной единицы, выявляемой методом дифференциальной сканирующей калориметрии в области основного фазового перехода (XVI, § 1), то можно оценить изменение упругой энергии (первое слагаемое) и краевой энергии поры:

$$E = \Gamma \frac{(N\Delta a - \pi r^2)^2}{Na^f} + 2\pi r\tilde{\sigma}^*, \quad (\text{XV.4.23})$$

где  $E$  — изменение энергии Гиббса при рождении поры,  
 $\Gamma$  — коэффициент упругости бислоя, равный  $5 \cdot 10^{-2}$  Н/м;  
 $N$  — число молекул в кооперативной единице,  
 $\Delta a$  — разность площадей на молекулу липида в двух состояниях,  
 $a^f$  — площадь, приходящаяся на молекулу липида в жидкокристаллическом состоянии,  
 $r$  — радиус поры,  
 $\tilde{\sigma}^*$  — линейное натяжение поры ( $\sigma$  — натяжение мембраны).

Физический смысл уравнения состоит в том, что убыль упругой энергии бислоя в результате рождения поры компенсируется ростом краевой энергии поры, пропорциональной периметру поры. С ростом радиуса поры можно ожидать появления

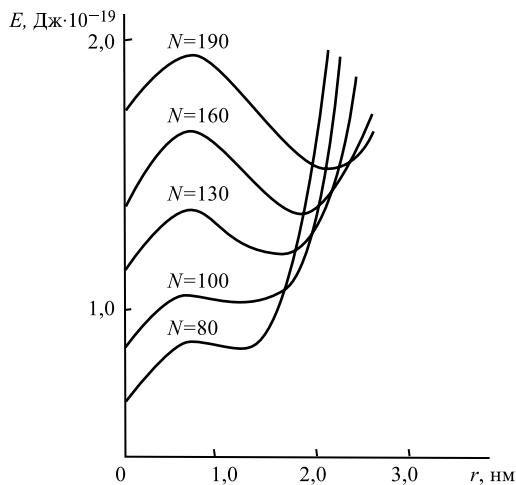


Рис. XV.13.

$N$  — Зависимость изменений энергии Гиббса от радиуса поры число молекул  $\Delta a = a^f - a^s = 0,1$  нм<sup>2</sup> (по В. Ф. Антонову, 1992)

локального минимума энергии, что будет свидетельствовать об энергетически выгодной структуре мембраны с порой. Семейство кривых, соответствующих различным размерам кооперативной единицы, представлено на рис. XV.13. Можно видеть, что первый локальный минимум, соответствующий устойчивой поре, появляется при радиусе равном 1,2 нм. С ростом кооперативной единицы радиус поры растет. Интересно отметить, что поры такого радиуса, по-видимому, достаточны для выхода крупных молекул лекарства из липосом и молекул гемоглобина из эритроцитов при осмотическом гемолизе.

Стабильность липидного бислоя определяется критическим радиусом поры (рис. XV.11). Большому критическому радиусу поры соответствует большая величина энергетического барьера. Дестабилизация мембраны в результате фазового перехода липидов или электрического пробоя сопровождается снижением барьера. В этом случае снижение критического радиуса может привести к тому, что существующие поры окажутся на нисходящей ветви кривой (рис. XV.11), что приведет к неограниченному росту поры и в конечном счете к разрыву мембраны. Большую роль в стабилизации мембран играет величина линейного натяжения периметра поры. Рост линейного натяжения поры (от  $5 \cdot 10^{-11}$  Н до  $6 \cdot 10^{-11}$  Н)

сопровождается резким ростом среднего времени жизни мембран (от 0,1 с до  $4 \cdot 10^6$  с), что вполне согласуется со средним временем жизни липидного бислоя биологических мембран.

В отличие от белковых и пептидных пор, липидные поры в биологических мембранах возникают в результате упругих деформаций липидного матрикса, причины которых весьма разнообразны. Это — фазовые переходы в липидном бислое, индуцируемые действием температуры или химических веществ (ионами двухвалентных металлов), а также электрических и магнитных полей. Рожденные таким образом поры определяют, в свою очередь, стабильность мембран.

Изучение критического состояния липидного бислоя раскрывает биологический смысл этого явления. Считается, что на начальных этапах эволюции клеточных структур формировались липидные везикулы, мембраны которых, как это следует из рассмотренного выше, способны были обеспечивать такие важные функции клетки, как проницаемость и генерацию мембранных потенциалов ионной природы. Однако чистые липидные пленки хрупки, и их стабильность в сильной степени зависит от внешних условий. Для предотвращения разрушения липидного бислоя в состоянии стресса в клетке и выработалась система стабилизации. Во-первых, жирнокислотные радикалы, входящие в состав молекулы природного фосфолипида, как правило, различаются по насыщенности: один радикал представлен насыщенной жирной кислотой, второй — ненасыщенной. Это обеспечивает жидкостное состояние липидного бислоя во всем диапазоне физиологических температур, поскольку область фазового перехода таких липидов находится ниже  $0^\circ\text{C}$ . Во-вторых, в большинстве мембран содержится холестерин, который, как известно, резко расширяет температурный диапазон фазового перехода, а при его эквимолярном содержании в количестве по отношению к фосфолипидам — даже исключает такой переход. В-третьих, образованию насыщенных продуктов в результате перекисного окисления препятствует набор мембранных антиоксидантов. И, наконец, специальные ферменты — фосфолипазы — способны полностью изменить фосфолипидный портрет мембраны, модифицируя как жирнокислотные радикалы (фосфолипаза А), так и полярные головки (фосфолипаза Д). Совершенно очевидно, что нарушение какого-либо из указанных элементов этой системы стабилизации может разрушить биологическую мембрану, что может привести клетку в состояние патологии.

### § 5. Влияние электрических полей на клетки

Электрические поля являются нормальным фактором функционирования большинства биологических мембран. Вместе с тем, электрические поля высокой напряженности вызывают появление качественно новых явлений. В ранних работах с клетками харовых водорослей было найдено, что гиперполяризация клеточной мембраны до некоторого критического значения потенциала вызывает резкое увеличение трансмембранного тока — явление, аналогичное электрическому пробоя диэлектриков. Однако в случае клеточных мембран пробой был полностью обратимым: при реполяризации клетки низкая проводимость мембраны восстанавливалась, а само явление электрического пробоя можно было наблюдать неоднократно. Нарушение стабильности мембран в сильных электрических полях подробно изучено на модельных системах — бислойных липидных мембранах (см. главу XV, § 4).



При действии на суспензии клеток импульсных электрических полей высокой напряженности (импульсы длительностью от нескольких микросекунд до нескольких миллисекунд при напряженности поля в несколько кВ/см) отмечены нарушения проницаемости клеточных мембран и гибель клеток. Электростимулируемый лизис клеток был продемонстрирован для бактерий, дрожжей, эритроцитов и протопластов. Нарушение барьерных свойств мембраны обусловлено индукцией в электрическом поле трансмембранного потенциала величиной до 1 В. Тщательный контроль параметров электрической обработки клеток позволяет вызывать обратимое повышение проницаемости клеточных мембран (электропорация) с целью введения в клетки биологически активных веществ и чужеродных генов, что открывает широкие возможности для применения электрических полей в молекулярно-генетических и биотехнологических исследованиях. Наряду с порацией мембран, электрические поля способны индуцировать слияние клеток, что может быть использовано для получения гетеркарионов и гибридов. Кроме того, воздействие электрических полей может активировать функцию мембранных белков, стимулировать протекание клеточных процессов, вызывать морфологические изменения, такие как формирование клеточных отростков или локальных сферических вздутий мембраны (блебы) на поверхности клеток. В связи с этим влияние электрических полей на живой клетки явилось предметом многочисленных исследований.

Эффекты, вызываемые действием электрических полей на клеточные мембраны могут быть классифицированы следующим образом: 1) электропорация, 2) электрослияние, 3) движения в электрическом поле (электрофорез, диэлектрофорез и электровращение), 4) деформации мембран, 5) электротрансфекция, 6) электроактивация мембранных белков.

**Электропорация.** При исследовании электропорации обычно используют короткие импульсы прямоугольной формы. Для расчета трансмембранного электрического потенциала, индуцируемого внешним электрическим полем в сферической клетке используют уравнение Максвелла

$$\Delta\varphi = 1,5RE \cos \Theta, \quad (\text{XV.5.1})$$

где  $R$  — радиус клетки,  $E$  — напряженность внешнего электрического поля,  $\Theta$  — угол между ориентацией электрического поля и радиус-вектором. Неравномерное распределение индуцируемого потенциала по поверхности клетки было подтверждено в опытах с применением потенциалочувствительных красителей.

Если клетка находится в высокочастотном переменном электрическом поле, индуцируемый мембранный потенциал окажется меньше, чем рассчитываемый по формуле (XV.5.1). В этом случае индуцируемый потенциал рассчитывают по формуле

$$\Delta\varphi = \frac{1,5RE \cos \Theta^{1/2}}{1 + (\omega\tau)^2}, \quad (\text{XV.5.2})$$

где  $\tau = RC_m(\rho_i + \rho_0/2)$ . В этом соотношении  $\omega$ ,  $C_m$ ,  $\rho_i$  и  $\rho_0$  обозначают угловую частоту переменного поля, емкость клеточной мембраны, а также сопротивления внутренней среды клетки и внешнего раствора, соответственно. Величина  $\tau$  называется постоянной времени, или временем релаксации, и измеряется в секундах. Повышение проницаемости мембраны под действием переменного электрического

поля удается, в частности, наблюдать по возрастанию флуоресценции непроникающего зонда пропидия бромида; интенсивность свечения возрастает при связывании зонда с внутриклеточной ДНК. С помощью электропорации удавалось «нагружать» эритроциты меченой сахарозой, которая сохранялась внутри клеток в течение 15–20 суток.

Индукция мембранного потенциала в сферических везикулах под действием внешнего электрического поля используется также в качестве метода исследования процессов переноса заряда в фотосинтетических мембранах. Воздействие внешнего электрического поля на набухшие «хлоропласты» вызывает сильное возрастание замедленной флуоресценции фотосистем I и II в связи с изменением вероятности рекомбинации разделенных зарядов при изменении напряженности поля в мембране (см. XXVIII). Воздействие импульсного электрического поля на хлоропласты, набухшие в гипотонической среде, вызывает также изменения быстрой флуоресценции фотосистемы II, амплитуда которых зависит от состояния реакционного центра.

После воздействия электрического импульса, приводящего к образованию в мембране пор, проницаемых для ионов и сахарозы, клетки, как правило, набухают за время от нескольких секунд до нескольких минут. После электропорации в связи с появлением в мембране сквозных пор, концентрации солей и сахарозы в клетке и в среде быстро выравниваются. Однако мембрана клетки остается непроницаемой для макромолекул цитоплазмы, которые поддерживают в клетке избыточное осмотическое давление. Благодаря этому происходит движение воды в клетку, сопровождаемое набуханием. Таким образом, набухание клеток после электропорации имеет коллоидно-осмотическую природу.

**Электрослияние мембран.** Явления электрослияния клеток по-видимому тесно связаны с электропорацией мембран. Существуют гипотезы, основанные на сравнительно простых физико-химических моделях и теории устойчивости коллоидов. Действительно, слияние мембран контактирующих клеток можно уподобить коагуляции гидрофобных коллоидных частиц. Современная теории устойчивости, развитая Дерягиным совместно Ландау и независимо — Фервеем и Овербеком, рассматривает процесс слипания как результат совместного действия ван-дер-ваальсовых сил притяжения и электростатических сил отталкивания между частицами, несущими поверхностный заряд (ср. § 2, 3). В зависимости от баланса сил в разделяющей частицы тонкой водной пленке возникает либо положительное давление, препятствующее соединению частиц, либо же отрицательное, приводящее к утоньшению водной прослойки и образованию контакта между частицами.

В случае плоскопараллельных мембран, разделенных водной пленкой с толщиной  $2h$ , электростатическое взаимодействие поверхностных зарядов создает в межмембранном зазоре избыточное давление, равное

$$\pi = (zF\varphi_h)^2 \cdot \frac{C}{RT}, \quad (\text{XV.5.3})$$

где  $\varphi_h$  — значение электрического потенциала посередине толщины водной пленки, а  $C$  — концентрация электролита в окружающих мембраны водных растворах. Потенциал  $\varphi_h$  связан с поверхностным потенциалом  $\varphi_s$  соотношением

$$\varphi_h = \frac{\varphi_s}{\text{ch} \kappa h}, \quad (\text{XV.5.4})$$

где  $\chi$  — обратная толщина двойного слоя. Формула (XV.5.4) применима, если потенциал  $\varphi_s$  невелик по сравнению с  $\frac{RT}{F}$ . Энергия электростатического отталкивания мембран численно равна работе, необходимой для перенесения двух заряженных поверхностей из бесконечности на расстояние  $h$  от плоскости симметрии:

$$U = 2 \int_h^{\infty} \pi dh. \quad (\text{XV.5.5})$$

Силы молекулярного притяжения (силы Лондона—Ван-дер-Ваальса) действуют между молекулами, которые не имеют ни электрического заряда, ни постоянного дипольного момента (см. гл. VIII). В результате внутреннего движения нейтраль-

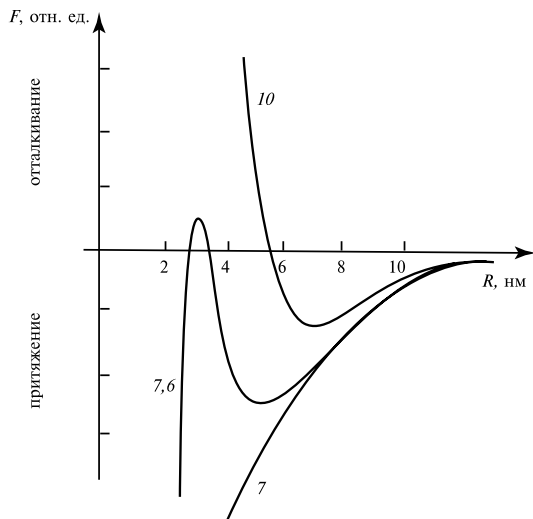


Рис. XV.14.

Зависимость результирующей силы взаимодействия мембраны от расстояния между мембранами при различных плотностях поверхностного заряда (7; 7,6; 10)

ная молекула может на короткое время образовать диполь, который индуцирует появление диполя в другой молекуле. Энергия ван-дер-ваальсова взаимодействия для двух одинаковых пластин бесконечной толщины определяется выражением

$$U = -\frac{B}{12\pi R^2}, \quad (\text{XV.5.6})$$

где  $R$  — расстояние между пластинами (мембранами), а  $B$  — постоянная Гамакера (XV.3.7), имеющая порядок  $10^{-21}$ – $10^{-20}$  Дж. Помимо баланса сил электростатического отталкивания и молекулярного притяжения, необходимо учитывать наличие на поверхности мембран слоя воды с измененными свойствами. Ориентация молекул в гидратных слоях создает дополнительные препятствия для установления контакта между близкорасположенными мембранами. Гидратные силы проявляются на расстояниях порядка 2–3 ангстрема и экспоненциально возрастают с уменьшением расстояния между поверхностями.

Для межмембранных расстояний порядка 1–10 нм можно учитывать только электростатическое отталкивание и ван-дер-ваальсовы силы притяжения. Результирующая сила взаимодействия мембран представлена на рис. XV.14.

Из рис. XV.14 видно, что на больших расстояниях и на очень малых расстояниях преобладает притяжение. Однако, если мембраны несут большой поверхностный заряд, для соединения мембран потребуется преодолеть очень значительную силу электростатического отталкивания. В случае умеренного поверхностного заряда энергетический барьер слияния мембран оказывается преодолимым.

Одна из схем механизма слияния представлена на рис. XV.15. На первой стадии происходит сближение мембран и уменьшается толщина водной прослойки; затем в силу тепловых флуктуаций мембран преодолевается барьер, препятствующий соединению мембран, и образуется мембранная перегородка. В дальнейшем в перегородке

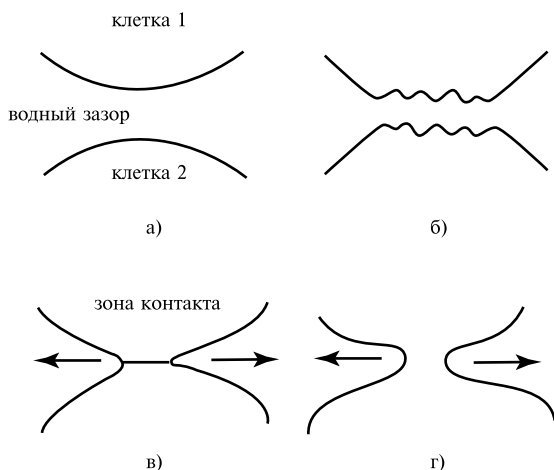


Рис. XV.15.

Стадии слияния мембран: а) исходное состояние, б) сближение мембран, в) образование бислойной перегородки, г) полное слияние

в результате тепловых флуктуаций возникает пора сравнительно большого радиуса, приводящая к разрыву мембранной перегородки и полному слиянию клеток.

Опыты, проведенные на бислойных липидных мембранах, показали, что процесс слияния в данной модельной системе происходит через стадию образования бислойной мембранной перегородки и так называемой триламнарной структуры (рис. XV.16). Первичный контакт между мембранами возникает за счет существования дефектов — локальных вспучиваний. Вероятность появления вспучиваний зависит от молекулярной геометрии фосфолипидов и наиболее высока для фосфолипидов, у которых размеры гидрофобного хвоста молекулы превышают размеры полярной головы. Плоский бислой, сформированный из молекул конусной формы находится в напряженном состоянии и содержит дефекты, имеющие вид вспучиваний. В зоне случайного контакта дефектов возникает перемычка (рис. XV.16, б). После этого внутренние монослои уходят из области контакта, а внешние монослои образуют бислойную перегородку (рис. XV.16, в). Полное слияние мембран возникает после образования в липидном бислое сквозной поры. Вероятность образования пор наиболее высока для фосфолипидов, имеющих форму обращенного конуса (большая полярная голова и узкий гидрофобный хвост).

При исследовании слияния целых клеток установлено, что вероятность слияния возрастает в присутствии некоторых липидов (насыщенные карбоновые кислоты с 10–14 углеродными атомами), индуцирующих коллоидно-осмотическое набухание клеток. Набухание, сопровождаемое слиянием, наблюдали также при прогреве эритроцитов до  $50^{\circ}$ . В процессе слияния клеток отмечено разрушение мембранных белков, в связи с активацией  $\text{Ca}^{2+}$  активируемых протеаз и разрушением цитоскелета.

Процедура электрослияния обычно включает предварительную стадию приведения клеток в контакт. Такой контакт может быть достигнут путем воздействия на суспензию клеток переменного электрического поля: в результате диэлектрофореза клетки выстраиваются в цепочки. Для приведения клеток в контакт используют также центрифугирование, сближение культивируемых клеточных монослоев под давлением и другие методы. После приведения клеток в контакт их обраба-

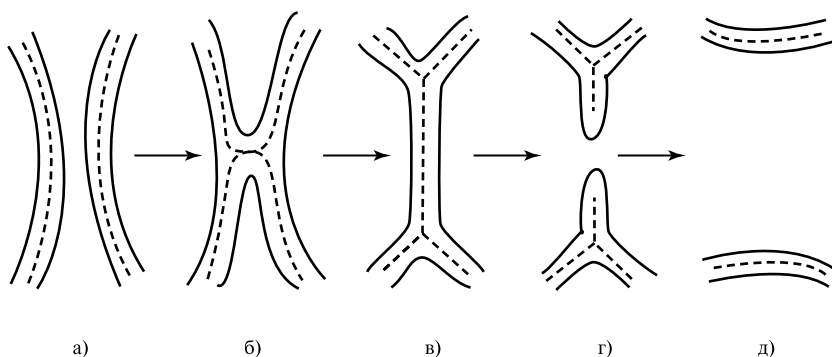


Рис. XV.16.

Предполагаемый механизм слияния фосфолипидных мембран: а) плоскопараллельный контакт, б) образование перемычки между локальными вспучиваниями близкорасположенных (внутренних) монослоев, в) триламнарная структура, г) образование сквозной поры в бислойной перегородке; д) образование трубки (полное слияние)

тывают коротким импульсом электрического поля, которое вызывает образование пор и индукцию слияния. На следующей стадии происходит набухание клеток и увеличение сечения мембранной трубки, соединяющей клетки.

Механизм электрослияния представляют следующим образом. Под действием внешнего электрического поля в зоне контакта клеточных мембран происходит образование коаксиальных пор, через которые проходит ток. Силовые линии электрического поля распределены таким образом, что возникает давление, сближающее мембраны и замыкающее кромки пор. При замыкании кромок пор контактных мембран образуется мембранная трубка, соединяющая цитоплазму сливающихся клеток. Вызванное электропорацией набухание клеток вызывает натяжение мембран, благодаря которому происходит увеличение периметра межклеточной перемычки и полное перемешивание цитоплазмы клеток.

**Движение клеток.** Известны два типа движения клеток в электрических полях. Постоянное поле вызывает перемещение клеток, имеющих поверхностный заряд, — явление электрофореза. При воздействии на клеточные суспензии переменного неоднородного поля наблюдается движение клеток, называемое диэлектрофорезом. При диэлектрофорезе поверхностный заряд клеток не играет существенной роли; механизм движения состоит во взаимодействии наведенного дипольного момента с внешним полем.

В теории диэлектрофореза клетку обычно рассматривают в виде сферы, имеющей диэлектрическую оболочку. Частотно-зависимая составляющая индуцируемого дипольного момента для такой сферической частицы записывается в виде:

$$K = \frac{\omega^2 \varepsilon_0^2 A_1 + j \omega \varepsilon_0 B_1 + C_1}{\omega^2 \varepsilon_0^2 A_2 + j \omega \varepsilon_0 B_2 + C_2}, \quad (\text{XV.5.7})$$

где  $j = \sqrt{-1}$ ,  $\omega = 2\pi f$  — круговая частота. Параметры  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $C_1$  и  $C_2$  определяются независимыми от частоты значениями проводимости и диэлектрической проницаемости наружной и внутренней сред и разделяющей оболочки:

$$\begin{aligned} A_1 &= \varepsilon_e \varepsilon_i / r + C(\varepsilon_e - \varepsilon_i) / \varepsilon_0, \\ A_2 &= -2\varepsilon_e \varepsilon_i / r - C(2\varepsilon_e + \varepsilon_i) / \varepsilon_0, \\ B_1 &= C(\sigma_i - \sigma_e) / \varepsilon_0, \\ B_2 &= C(\sigma_i + 2\sigma_e) / \varepsilon_0, \\ C_1 &= g(\sigma_i - \sigma_e) - \sigma_i \sigma_e / r, \\ C_2 &= g(\sigma_i + 2\sigma_e) + 2\sigma_i \sigma_e / r, \end{aligned} \quad (\text{XV.5.8})$$

где  $r$ ,  $C$ ,  $g$ ,  $\varepsilon_e$ ,  $\varepsilon_i$ ,  $\sigma_e$ ,  $\sigma_i$ , и  $\varepsilon_0$  обозначают радиус клетки, емкость мембраны, удельную проводимость мембраны, диэлектрические проницаемости наружной и внутренней среды, проводимости наружной и внутренней среды и абсолютную диэлектрическую проницаемость вакуума, соответственно.

Из приведенных соотношений рассчитаны частотные зависимости диэлектрофоретической силы, действующей на клетки в неоднородном электрическом поле, а также усилия, определяющего вращение клеток во вращающемся электрическом поле. Согласно теории, диэлектрофоретическая сила пропорциональна действительной части безразмерного параметра  $K$  и градиенту квадрата напряженности поля:

$$F = \frac{1}{2} \operatorname{Re}(K) \cdot \nabla E^2. \quad (\text{XV.5.9})$$

Вращающий момент пропорционален мнимой части параметра  $K$  и квадрату напряженности вращающегося поля:

$$F_c = \operatorname{Im}(K) \cdot E^2. \quad (\text{XV.5.10})$$

Спектры диэлектрофореза и электровращения клеток представлены на рис. XV.17.

Различие направлений диэлектрофоретической силы на низких (килогерцы) и высоких (мегагерцы) частотах обусловлено различной ориентацией индуцированного дипольного момента по отношению к внешнему электрическому полю. Из

курсов по электричеству известно, как ориентируются дипольные моменты плохо проводящих диэлектрических частиц в проводящей среде, и хорошо проводящих частиц, окруженных малопроводящей средой. В случае воздействия низкочастотного поля мембрана представляет собой хороший изолятор, и ток идет в обход клетки по проводящей среде. Индуцированные заряды распределяются, как показано на рис. XV.18, *A*, и усиливают напряженность поля внутри частицы. Такое распределение индуцированных зарядов соответствует антипараллельной ориентации дипольного момента частицы относительно внешнего поля.

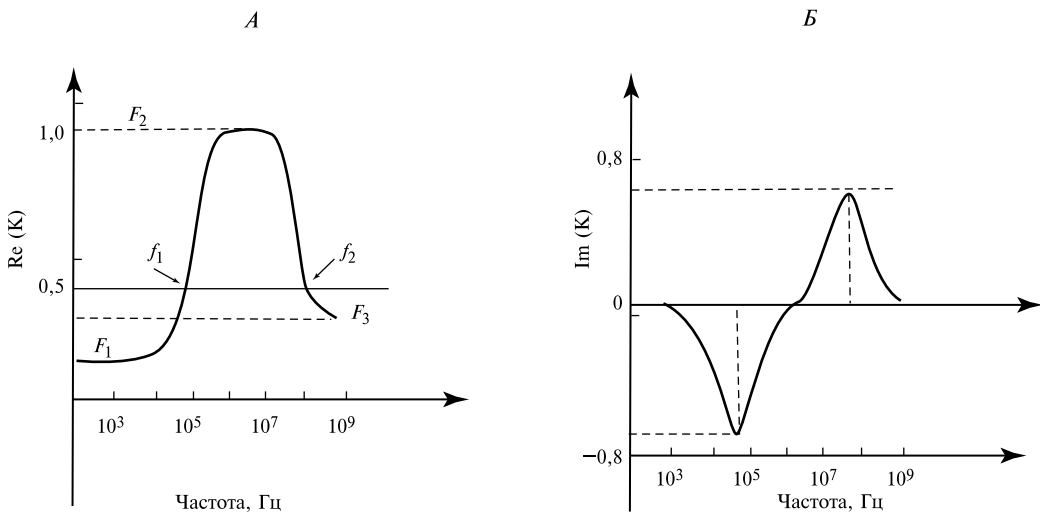


Рис. XV.17.

Типичные спектры диэлектрофореза (*A*) и электровращения (*B*) для сферических частиц с однослойной оболочкой.

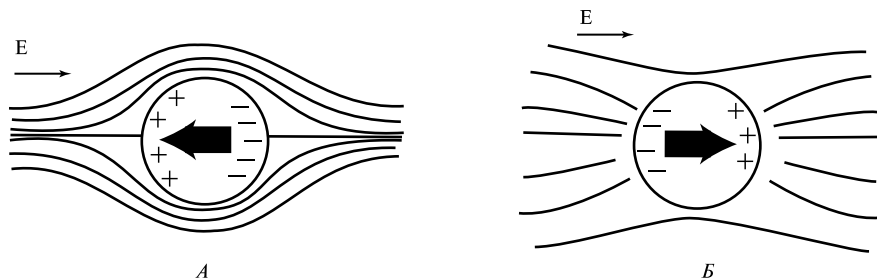


Рис. XV.18.

Распределение индуцированных зарядов на поверхности частицы и ориентация индуцированного дипольного момента. *A* — непроводящая частица в проводящей среде (клетка в низкочастотном поле); *B* — проводящая частица в плохо проводящей среде. Вектор *E* показывает ориентацию внешнего эл. поля.

При воздействии высокочастотного поля проводимость мембраны высока; и так как электропроводность внутриклеточной среды выше электропроводности бессолевой внеклеточной среды, ток протекает преимущественно через клетку (рис. XV.18). В этих условиях распределение индуцированных зарядов на поверхности частиц соответствует параллельной ориентации дипольного момента по отношению к внешнему полю.

Критическая частота  $f_1$  (см. рис. XV.17), при которой происходит смена направления диэлектрофоретического движения, соответствует условию равенства электропроводностей среды и клетки. При повышении частоты в диапазоне десятков и сотен мегагерц диэлектрофоретическая сила уменьшается от максимального уровня  $F_2$  до нуля, а затем вновь меняет направление. Этот переход обусловлен дисперсией поляризации цитоплазмы, аналогично тому как изменение силы от уровня  $F_1$  до  $F_2$  связано с дисперсией поляризации мембран.

Зависимость скорости и направления вращения клеток от частоты вращающегося поля определяется формулами (XV.5.7), (XV.5.10), и представлена на рис. XV.17, Б. Максимумы в спектре электровращения соответствуют критическим частотам  $f_1$  и  $f_2$  в спектре диэлектрофореза.

**Деформация мембран.** Явления диэлектрофореза и электровращения клеток тесно связаны с действием на поверхность клетки сил, называемых максвелловскими напряжениями. Величина и направление силы, действующей на клеточные мембраны в электрическом поле определяется соотношением

$$\mathbf{T} = \varepsilon\varepsilon_0 \left[ \mathbf{E}[\mathbf{E}\mathbf{n}] - \frac{E^2}{2}\mathbf{n} \right], \quad (\text{XV.5.11})$$

где  $\mathbf{T}$  — сила,  $\mathbf{E}$  — напряженность поля,  $\mathbf{n}$  — вектор нормали к поверхности,  $\varepsilon$  — относительная диэлектрическая проницаемость диэлектрика,  $\varepsilon_0$  — абсолютная диэлектрическая проницаемость вакуума  $\approx 8,85 \cdot 10^{-12}$  Ф/м.

В случае воздействия на клетку низкочастотного поля силовые линии обходят клетку (рис. XV.18, А), т. е. поле направлено тангенциально к поверхности. По определению векторного произведения,  $[\mathbf{E}\mathbf{n}] = En \cos \varphi$ , где  $\varphi$  — угол между вектором поля и радиус-вектором  $\mathbf{n}$ . Так как векторы  $\mathbf{E}$  и  $\mathbf{n}$  взаимно перпендикулярны, произведение векторов  $[\mathbf{E}\mathbf{n}]$  равно нулю. Поэтому

$$\mathbf{T} = -\frac{\varepsilon\varepsilon_0 E^2}{2}\mathbf{n}. \quad (\text{XV.5.12})$$

Из (XV.5.12) видно, что на клетку в области экватора действует направленное внутрь давление, которое заставляет клетку вытягиваться вдоль силовых линий поля.

В случае воздействия высокочастотного поля силовые линии проходят через клетку (рис. XV.18, Б), т. е. поле направлено перпендикулярно мембране на обоих концах клетки, обращенных к электродам. При совпадении направлений векторов поля и нормали к поверхности произведение  $\mathbf{E}\mathbf{n}$  равно  $En$  и  $[\mathbf{E}[\mathbf{E}\mathbf{n}]] = E^2\mathbf{n}$ . Поэтому

$$\mathbf{T} = \frac{\varepsilon\varepsilon_0 E^2}{2}\mathbf{n}. \quad (\text{XV.5.13})$$



Из (XV.5.13) видно, что высокочастотное поле создает усилие, которое растягивает концы клеток в направлении к электродам. Деформация клеток в переменных электрических полях наблюдается экспериментально и содержит информацию о вязкоупругих характеристиках клетки. Помимо обратимых деформаций, исчезающих после выключения поля, обнаружены и необратимые изменения клеточной морфологии, обусловленные воздействием переменных полей. Показано, что наложение электрического поля приводит к формированию у фибробластов отростков, которые по своей морфологии сходны с отростками, формирующимися в физиологических условиях, например, при распластывании клеток на субстрате.

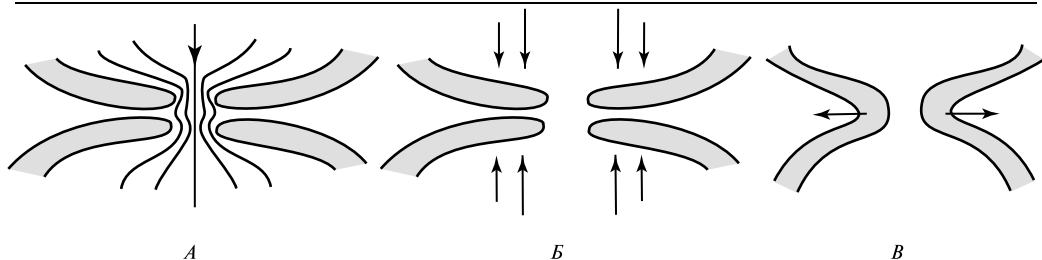


Рис. XV.19.

Механизм электрослияния клеток. А) расположение силовых линий; Б) силы, действующие на мембраны в области кромки пор, длина стрелок соответствует величине действующей силы; В) поле, направленное тангенциально к поверхности мембраны в кромке поры, растягивает пору и приводит к полному слиянию клеток

Силы, действующие на клеточные мембраны в электрическом поле, играют важную роль в сближении мембран при электроиндуцированном слиянии клеток. Механизм электроиндуцированного слияния, вероятно, несколько отличается от механизма слияния плоских БЛМ (см. выше). Согласно одной из гипотез, электрослияние начинается со стадии образования соосных пор в контактных мембранах сближенных клеток (рис. XV.19). В области образования соосных пор линии поля располагаются тангенциально к поверхности мембраны и создают силу, которая заставляет сближаться участки мембраны вблизи поры. В результате действия этих сил повышается вероятность смыкания кромок пор (рис. XV.19, Б). После образования сквозной поры поле, направленное тангенциально к кромке поры, стремится растянуть пору (рис. XV.19, В), что приводит к полному слиянию клеток.

**Электротрансфекция.** Под электротрансфекцией и электротрансформацией понимают введение в клетки чужеродной ДНК. Для проникновения через мембрану ДНК важное значение имеют два фактора: образование в мембране пор под действием поля (электропорация), а также наличие у молекулы ДНК заряда, обеспечивающего электрофоретическое движение ДНК в момент приложения импульса. Электрообработка клеток в присутствии ДНК приводит к более сильному повышению мембранной проницаемости, по сравнению с аналогичной обработкой без ДНК. На основании этих данных выдвинуто предположение о том, что взаимодействие ДНК с мембраной при электропорации приводит к повышению эффективного диаметра пор или увеличению их времени жизни.

**Электроактивация белков.** В качестве примера электроактивации мембранных ферментов можно назвать активацию Na, K-АТФазы в эритроцитах человека при действии переменного поля с амплитудой 20 В/см и частотой 1 кГц. Существенно, что электрические поля такой слабой напряженности не оказывают повреждающего действия на функции клеток и их морфологию. Слабые поля низкой частоты (60 В/см, 10 Гц) оказывают также стимулирующее влияние на синтез АТФ митохондриальной АТФазой. Предполагают, что электроактивация обусловлена влиянием поля на конформацию белков. Теоретический анализ модели облегченного мембранного транспорта с участием переносчика (модель с четырьмя состояниями транспортной системы) указывает на взаимодействие транспортной системы с переменным полем. В результате такого взаимодействия энергия поля может использоваться транспортной системой и преобразовываться в энергию химической связи АТФ.

Слабые постоянные поля могут вызывать движение свободных клеток (электрофорез), а также вызывать латеральное перемещение заряженных рецепторов по поверхности клеточной мембраны у иммобилизованных клеток. Явления электрофореза мембранных рецепторов используется как инструмент для изучения подвижности белков в плазматической мембране.

**Взаимодействие клеточных мембран.** В обычных физиологических условиях слияние клеточных мембран является важным биологическим процессом, лежащим в основе таких явлений как экзоцитоз гормонов, ферментов, нейротрансмиттеров, а также при образовании гигантских клеток в воспалительных процессах, при внедрении вирусов, обладающих оболочкой, в клетки хозяев (вирус СПИД). Рассмотренные выше механизмы действия электрических полей на бислойные мембраны и клетки дают представление о физико-химических факторах, влияющих на взаимодействие клеточных мембран, которые приводят к их слиянию. Однако, конкретные молекулярные механизмы этого биологического явления намного сложнее. Основная особенность состоит в активном участии специальных мембранных белков в процессе слияния. В качестве примера рассмотрим роль гемоагглютинаина (ГА) вируса простудных заболеваний (Уайт, 1992). Молекула этого белка состоит из трех субъединиц, каждая из которых содержит пептид с большим количеством гидрофобных аминокислот. ГА играет важную роль в первичном связывании вируса и атакуемой им клетки. Вследствие изменения третичной структуры ГА вируса происходит освобождение его глобулярных пептидов и их присоединение к мембране атакуемой клетки.

Эта стадия предшествует появлению поры в мембране, в образовании которой принимают активное участие несколько тримеров ГА. Именно пептиды ГА взаимодействуют с мембранными липидами вируса и клетки, обеспечивая их «перемешивание». Таким образом, как белки, так и липиды входят в состав элементов конструкции поры.

Большое значение имеют здесь гидрофобные участки  $\alpha$ -спиралей пептидов, которые непосредственно обеспечивают взаимодействие с липидами. По-видимому, модель действия ГА несет в себе достаточно общие черты, которые отражают активную роль интегральных мембранных белков в слиянии двух липидных бислойных мембран и в других случаях.