

Конформационные свойства мембран



§ 1. Фазовые переходы в мембранных системах

Природные и искусственные мембранные системы могут находиться в двух основных фазовых состояниях: в виде твердого двумерного кристалла (гель) или в жидкокристаллическом (расплавленном) состоянии.

Температурная точка основного фазового перехода, или параметр $T_{\text{фп}}$ систем, образованных из индивидуальных липидов, в сильной степени зависит от длины и степени ненасыщенности углеводородных цепей липидов. Температура фазового перехода увеличивается с увеличением длины цепей и уменьшается с увеличением степени ненасыщенности жирнокислотных остатков.

Жирнокислотные цепи природных липидов обычно содержат ненасыщенные связи. Вследствие этого у большинства природных мембран $T_{\text{фп}}$ лежит в области отрицательных температур, т. е. в естественных условиях они находятся в «жидком» состоянии. Основной фазовый переход в этих мембранах происходит лишь после того, как они окажутся «вморожены» в водную фазу.

В искусственных и реконструированных мембранных системах, построенных из индивидуальных синтетических, как правило насыщенных, липидов, точки фазовых переходов лежат в области положительных температур. Аналогичная картина наблюдается у некоторых аукоотрофных микроорганизмов, которые не способны синтезировать жирные кислоты и используют для построения собственных мембран только липиды, присутствующие в питательной среде. В отношении структурных перестроек переход гель — жидкокристаллическое состояние представляет собой переход углеводородных цепей из полностью *транс*-состояния в разупорядоченное состояние (жидкоподобная α -фаза). При таких переходах площадь, приходящаяся на молекулу липида, меняется. Например, для мембран из дипальмитоиллецитина она меняется от 0,48 до 0,58 нм², среднее расстояние между цепями увеличивается от ~ 0,49 до 0,53 нм, а толщина углеводородного слоя уменьшается почти на 0,5 нм. Относительное изменение объема при фазовом переходе невелико: $\Delta V/V \sim 1,5\%$. Это означает, что латеральное расширение компенсируется утоньшением слоя.

Гипотеза петли (кинка). Плавление жирнокислотных цепей при фазовом переходе обусловлено вращательной изомеризацией (см. § 3 гл. VIII). Наименьшей энергией обладает *транс*-, а наибольшей — *цис*-конфигурация.

Гош-конформации (*goш* (+) и *goш* (–), поворот на $\pm 120^\circ$ относительно *транс*-конформации) сравнительно мало превышают по энергии *транс*-конформацию (на 2–3 кДж/моль), но эти состояния разделяет энергетический барьер высотой

$\sim 12\text{--}17$ кДж/моль. Если углеводородные цепи в полностью *транс*-конфигурации представляют собой линейные структуры, то появление одиночной *гош*-конформации в цепи приводит к искривлению пространственной конфигурации цепи на угол $\sim 120^\circ$ (см. рис. VIII.6–VIII.8). В плотно упакованных мембранных системах с полностью *транс*-конформацией углеводородных цепей это искривление порождает серьезные стерические затруднения, делающие невозможным появление одиночных *гош*-конформаций.

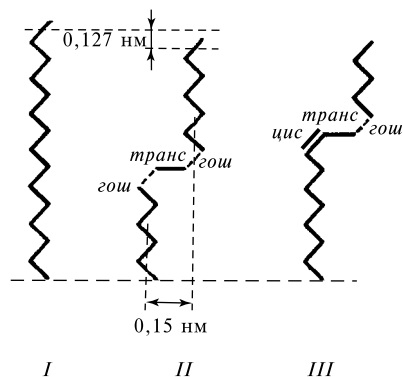


Рис. XVI.1.

Углеводородные цепи в полностью *транс*-конфигурации (I), *гош-транс-гош*-конфигурации (II), *цис-транс-гош*-конфигурации (III)

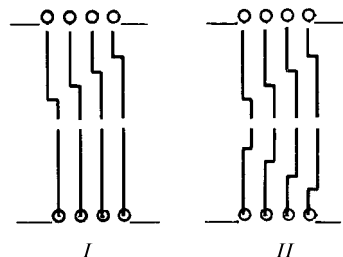


Рис. XVI.2.

Кинк-блоки в углеводородных цепях мембран:

I — в одном полуслое, II — в двух монослоях липидного бислоя

Уменьшение стерических затруднений при плавлении углеводородных цепей в мембранах достигается при синхронном появлении в цепи сразу двух *гош*-конформаций (*гош* (+) и *гош* (–)), разделенных С–С-связью в *транс*-конформации. Хотя энергия такого состояния вдвое выше одиночной *гош*-конформации, возникающее ротационное состояние цепи не вызывает сильного расширения решетки, так как при последовательном повороте цепи на $+120$ и -120° пространственная конфигурация цепи в целом сохраняется прямолинейной (рис. XVI.1). Участок цепи, находящийся в *гош* (+)-*транс-гош* (–)-конформации, формирует уступ или петлю в углеводородной цепи, которую часто называют кинком (от англ. *kink* — петля). □

Образование кинка сопровождается уменьшением эффективной длины цепи на $\sim 0,127$ нм. При этом часть цепи отодвигается на $\sim 0,15$ нм, образуя свободный объем, а занимаемый молекулой липида общий объем увеличивается на $0,025\text{--}0,050$ нм³ (рис. XVI.1).

Хотя появления одного кинка в углеводородной цепи недостаточно для ее плавления, однако одиночные кинки облегчают возникновение кинков в соседних углеводородных цепях, формируя чередующиеся кинк-блоки (рис. XVI.2). Такие блоки могут возникать либо в одном полуслое мембраны, либо в двух противоположно расположенных углеводородных цепях. При увеличении числа кинков в углеводородных цепях разупорядоченность углеводородной зоны мембран резко нарастает.

Двойные (*цис*-) связи в жирнокислотных ненасыщенных цепях мембран могут играть роль зародышей образования кинков в соседних насыщенных цепях. В этом случае для образования кинка в ненасыщенной цепи необходимо появление лишь одной *гош*-конформации при искривлении цепи на 80° . При этом устраняются стерические затруднения, возникающие при размещении ненасыщенной цепи в углеводородной зоне мембран из насыщенных липидов [см. (XVI.1)], что хорошо согласуется с экспериментально наблюдаемым резким снижением $T_{\text{фп}}$ мембран из насыщенных липидов при добавлении к ним небольших количеств ненасыщенных жирнокислотных цепей. Поворот вокруг С–С-связи с образованием *транс*-конформации практически исключен (см. § 3 гл. VIII; § 3 гл. IX).

Таким образом, низкую вязкость (высокая текучесть) углеводородной зоны мембран в жидкокристаллическом состоянии (при $T > T_{\text{фп}}$) связывают с возрастанием амплитуды крутильных осцилляций вокруг С–С-связей, появлением *гош*-конформаций (кинки) и их быстрой изомеризацией в соседние положения. \square

Для оценки эффективности этих процессов полезно сопоставить частоту крутильных колебаний вокруг С–С-связей $(6 \div 8) \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$ с частотой возникновения *гош*-конформаций при комнатных температурах. Полагая, что величина барьера, отделяющего *транс*- от *гош*-конформаций, равна $\sim 12 \text{ кДж/моль}$, находим $\nu = (k_{\text{Б}}T/h) \exp[-\Delta E/RT] \approx 10^{10} \text{ с}^{-1}$ [см. (XIV.1.1)]. Отсюда следует, что *гош*-конформации при комнатных температурах возникают с высокой частотой вследствие крутильных осцилляций.

В условиях высокой текучести гидрофобной зоны мембран кинк может изомеризоваться, смещаясь вдоль углеводородной цепи за счет синхронного поворота на 120° соответствующей последовательности С–С-связей. При смещении в соседнее положение кинк передвигается на $\sim 0,13 \text{ нм}$. Такое перемещение кинка вдоль углеводородной цепи можно рассматривать как своеобразную одномерную диффузию, которую можно охарактеризовать коэффициентом диффузии D_K :

$$D_K = 0,5\nu_K(\Delta L)^2, \quad (\text{XVI.1.1})$$

где ν_K — частота скачка кинка, ΔL — шаг одного скачка. Полагая, что частота скачка кинка по порядку величины соответствует частоте появления *гош*-конформаций ($\sim 10^{10} \text{ с}^{-1}$), находим $D_K \sim 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$. Полученное значение практически совпадает с известными коэффициентами проницаемости липидных мембран для кислорода, воды и небольших молекул неэлектролитов. Это совпадение, а также геометрическое соответствие размеров таких молекул и свободного объема, возникающего при образовании кинка, послужило основанием для утверждения, что трансмембранный перенос малых молекул осуществляется внутри свободного объема, образуемого кинком.

Молекулярный параметр порядка. Высокая подвижность углеводородных цепей в мембранах позволяет судить лишь о динамической конформации этих структур или о наиболее вероятной (средняя) форме цепей. Даже в твердом бислое при полностью *транс*-конформации обнаруживается подвижность звеньев углеводородных цепей, которая заметно возрастает к концу цепи по мере удаления от карбонильного атома. При этом нарушения *транс*-конфигурации не происходит, а подвижность звеньев возрастает за счет последовательного суммирования к концу

цепи небольших амплитуд одиночных торсионных осцилляций. В «жидком» бислое вращательный беспорядок резко нарастает за счет *транс-гош*-ротамеризации.

При температурах выше точки основного фазового перехода гибкие углеводородные цепи стремятся принять конфигурацию статистического клубка. Этому, однако, препятствуют силы поверхностного натяжения, мешающие возрастанию эффективной площади на молекулу в бислое. В результате наблюдается некоторое увеличение площади на молекулу, однако при этом в мембранах реализуются далеко не все возможные конформации цепей.

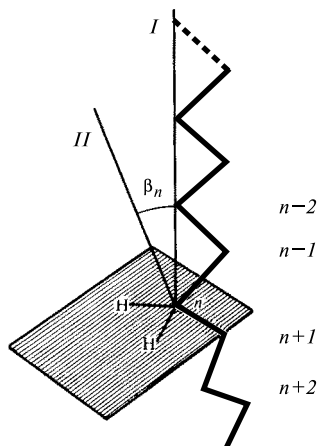


Рис. XVI.3.

Нахождение угла β между нормалью I к поверхности мембраны и нормалью II к плоскости, образованной векторами C—H-связей n -го сегмента углеводородной цепи

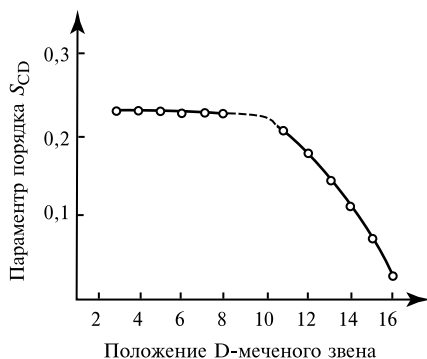


Рис. XVI.4.

Зависимость параметра порядка S_{CD} -связи от положения дейтерированного звена в пальмитиновой цепи, биосинтетически включенной в мембраны микоплазм *A. laidlawii* при 42°C ($S_D = 0,5S_{CH}$)

Для описания динамического отклонения конформации таких цепей от нормали к поверхности используют молекулярный параметр порядка S_n :

$$S_n = \frac{3}{2} \overline{\cos^2 \beta_n} - \frac{1}{2}, \quad (\text{XVI.1.2})$$

где β_n — угол между нормалью к бислою и нормалью к плоскости, образованной двумя векторами C—H-связей n -го сегмента цепи (рис. XVI.3). Очевидно, что при идеальной упорядоченности $S = 1$, а для изотропной среды $S = 0$. \square

На рис. XVI.4 показано, как изменяется S для каждого последующего дейтерированного звена в пальмитиновой кислоте, биосинтетически включенной в мембраны микоплазмы *A. laidlawii*. Аналогичное распределение параметра порядка S вдоль цепи наблюдается и в бислоях яичного лецитина или некоторых синтетических липидов.

Как видно, после 8–9-го метиленового звена разупорядоченность резко возрастает, приближаясь к изотропному движению у концевых метильных групп. Возможно, что начальные плотноупакованные участки углеводородной зоны обеспечивают когезионные взаимодействия между цепями, необходимые наряду с гидрофобными эффектами для поддержания целостности бислоя. В то же время «жидкая» углеводородная середина обеспечивает заполнение возможных дефектов в гетерогенных системах и поддерживает вязкость системы на необходимом низком уровне. Примечательно в связи с этим, что в большинстве природных ненасыщенных жирных кислот двойные связи размещаются после 9-го углеродного атома и таким образом прямо не снижают плотность упаковки начальных участков углеводородных цепей.

Для экспериментального определения параметра порядка применяют ЯМР-метки, которыми являются липиды, дейтерированные в различных метиленовых положениях углеводородной цепи или меченные ядрами ^{13}C . Используют также спин-меченные липиды, в которых парамагнитные группы связаны с разными углеродными атомами углеводородной цепи. В последнее время благодаря усовершенствованию техники метода ЯМР стало возможным определять S по параметрам релаксации ядер ^{13}C , присутствующих в углеводородах мембран за счет естественного содержания изотопа.

Термодинамические параметры фазовых переходов. С термодинамической точки зрения фазовые переходы в мембранных системах можно рассматривать как превращения агрегатных состояний ($1 \leftrightarrow 2$).

При фазовом переходе в мембранах изменяются скачком упорядоченность системы (энтропия) и ее объем, т. е. объем и энтропия системы, являющиеся первыми производными свободной энергии ($\partial G/\partial T = -S$ и $\partial G/\partial p = V$), претерпевают разрыв в точке фазового перехода. Это означает, что фазовые переходы в мембранах относятся к переходам первого рода (см. § 3 гл. VII). □

Типичные экспериментальные кривые изменения теплоты и теплоемкости при фазовом переходе приведены на рис. XVI.5. Измерив поглощение теплоты при фазовом переходе ΔQ и зная количество образца в пробе m (в молях), можно рассчитать молярную энтальпию перехода $\Delta H = \Delta Q/m$ и затем молярную энтропию перехода $\Delta S = \Delta H/T$.

При плавлении кристаллов общее изменение энтропии обусловлено увеличением конформационной, позиционной и ориентационной разупорядоченности. В мембранах при плавлении углеводородных цепей, находящихся полностью в *транс-*

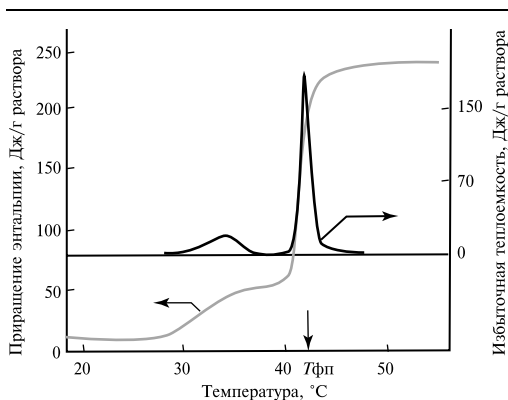


Рис. XVI.5.

Зависимость приращения энтальпии и избыточной удельной теплоемкости дисперсии дипальмитоилфосфатидилхолина от температуры

конформации, основной вклад в изменение энтропии обусловлен возможностью появления новых конфигураций за счет *транс-гош*-изомеризации. Отсюда фазовый переход в мембранах можно рассматривать как конфигурационное плавление.

Для фосфатидилхолинов наблюдается линейная зависимость приращения энтропии при фазовом переходе от длины углеводородных цепей n при $14 \leq n \leq 22$. Инкремент приращения энтропии на одну СН-группу составляет $\Delta S \approx 5,25$ Дж · град⁻¹ · моль⁻¹. Это позволяет, исходя из больцмановского определения энтропии, оценить вероятность *транс*-состояний p_t при температурах, несколько превышающих точку фазового перехода. Пользуясь уравнением

$$\Delta S = R \left[p_t \ln \frac{1}{p_t} + (1 - p_t) \ln \frac{2}{1 - p_t} \right],$$

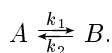
можно показать, что для фосфатидилхолинов вероятность нахождения СН₂-группы в *транс*-конформации $p_t \simeq 0,8$. Поскольку $p_t + 2p_g = 1$, вероятность *гош*-конформации $p_g \simeq 0,1$. Из полученных значений вероятности следует, что при температурах выше точки фазового перехода в углеводородных цепях из 16 углеродных атомов в среднем возникает $\sim 2,8$ *гош*-конформаций.

Фазовые переходы в липидных бислоях происходят в сравнительно широком температурном интервале ($\Delta t \sim 0,2 \div 1,0^\circ \text{C}$). Это обусловлено тем, что в бислое одна фаза обязательно возникает в матриксе другой фазы («жидкий» и «твердый» бислои) с образованием большого числа доменов новой фазы микроскопических размеров, но с большой удельной площадью поверхностей.

По границе домена молекулы находятся в необычной упаковке, что отражается на внутреннем поверхностном натяжении σ . Вследствие изменения объема системы при фазовых переходах на границе раздела фаз (доменов) будут действовать механические силы χ . В результате жидкокристаллические фазы доменов будут находиться под влиянием сил сжатия, а гель-объемы будут испытывать растяжение. Следовательно, для двух сосуществующих фаз (1 и 2) в липидном бислое появляется дополнительная зависимость их энергий (G_1 и G_2) от внутреннего поверхностного натяжения и механических сил:

$$G_1 = f(T, p, \sigma_{1,2}, \chi_{1,2}) \quad \text{и} \quad G_2 = f(T, p, \sigma_{2,1}, \chi_{2,1})$$

В результате сложное равновесие между фазами устанавливается в сравнительно широком температурном интервале, и крутизна фазового перехода уменьшается, что указывает на снижение степени кооперативности перехода (см. § 5 гл. IX). Резкий переход возможен только в случае бесконечной кооперативной единицы, образованной взаимодействующими молекулами, что соответствует плавлению совершенного кристалла. В липидах мембранных структур число молекул N , объединяющихся в кооперативные единицы, не превышает нескольких сотен. Это означает, что в мембранах макроскопических размеров возникает огромное число мозаично разбросанных кооперативных единиц, которые по закону «все или ничего» находятся в виде одной (А) либо другой (В) фазы:



Если долю молекул (или кооперативных единиц) в состояниях A и B обозначить C_A и C_B , то степень перехода Θ можно охарактеризовать как

$$\Theta = \frac{C_A}{C_B + C_A}. \quad (\text{XVI.1.3})$$

Кажущаяся константа равновесия этого процесса равна

$$K = k_1/k_2 = \Theta/(1 - \Theta). \quad (\text{XVI.1.4})$$

Подход к фазовому превращению как к химической реакции позволяет описать зависимость K от температуры с помощью уравнения Вант-Гоффа:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_{\text{ВГ}}}{RT^2} = \frac{1}{\Theta(1 - \Theta)} \frac{d\Theta}{dT}, \quad (\text{XVI.1.5})$$

где $\Delta H_{\text{ВГ}}$ — теоретическая теплота реакции или энтальпия Вант-Гоффа.

Так как в средней точке перехода $\Theta = 0,5$ (при $T = T_{\text{фп}}$), то

$$\frac{\Delta H_{\text{ВГ}}}{4RT_{\text{фп}}^2} = \left(\frac{d\Theta}{dT} \right)_{T_{\text{фп}}},$$

что совпадает с уравнением (IX.5.3).

Зависимость Θ от температуры может быть найдена экспериментальным путем с помощью калориметрических, радиоспектральных и флуоресцентных методов. Предложено несколько приближенных методов оценки энтальпии Вант-Гоффа, например по полуширине перехода $\Delta T_{1/2}$:

$$\Delta H_{\text{ВГ}} \simeq \frac{7T_{\text{фп}}^2}{\Delta T_{1/2}}. \quad (\text{XVI.1.6})$$

Для оценки степени кооперативности процесса сравнивают вычисленную $\Delta H_{\text{ВГ}}$ и измеряемую калориметрическую теплоту перехода ΔQ . При отсутствии кооперативности $\Delta\Theta/\Delta H_{\text{ВГ}} = 1$, а для кооперативного процесса эта величина много меньше единицы. В общем виде степень кооперативности задается соотношением [ср. (IX.5.3)] $\Delta H_{\text{ВГ}} = N\Delta Q$, где N — число молекул в кооперативной единице. Для характеристики степени кооперативности процесса часто используют также параметр кооперативности σ [см. (IX.5.6)] $\sigma = (\Delta Q/\Delta H_{\text{ВГ}})^2$. Очевидно, что чем меньше σ , тем больше кооперативность процесса. Связь параметра кооперативности с размером кооперативной единицы определяется выражением

$$N = 1/\sqrt{\sigma}. \quad (\text{XVI.1.7})$$

□

Вычисленные из экспериментальных данных (при фазовых переходах) размеры кооперативных единиц в мембранах липосом, состоящих из различных фосфолипидов, представлены ниже.

Фосфолипид	Количество молекул в кооперативной единице N
Димиристоилфосфатидилхолтин (ДМФХ)	200 ± 40
Дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ)	70 ± 10
Дистеарилфосфатидилхолин (ДСФХ)	80 ± 10
Димиристоилфосфатидилэтаноламин (ДМФЭ)	70 (100)
Дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ДЛФЭ)	260
Дилаурилфосфатидилэтаноламин (ДЛФЭ)	440

Следует, однако, с осторожностью использовать уравнение Вант-Гоффа и калориметрические данные, которые могут зависеть не только от изменения теплоемкости, но и от внутримолекулярных перестроек в биомембранах (ср. § 3 гл. VII).

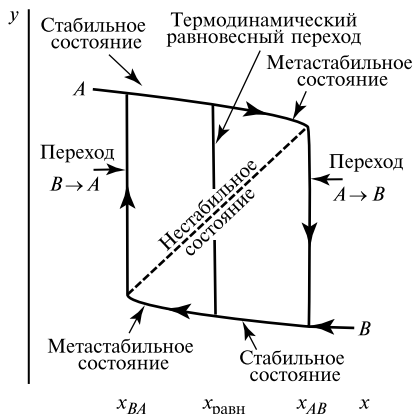


Рис. XVI.6.

Фазовый переход через метабильное состояние (гистерезис)

Переход в направлении $A \rightarrow B$ при изменении независимой переменной x (например, температуры) происходит через метабильное состояние при изменении независимой переменной от $x_{равн}$ до x_{AB} . Собственно переход от A к B происходит при x_{AB} . В случае обратного перехода от B к A система вновь попадает в метабильное состояние при изменении независимой переменной от $x_{равн}$ до x_{VA} , и переход от B к A осуществляется в точке x_{VA} .

Особенности протекания фазовых переходов в мембранных системах могут быть связаны с появлением у них гистерезиса, т. е. смещения точки фазового перехода, регистрируемой при нагревании или охлаждении системы. Появление гистерезиса возможно, когда кинетические барьеры для фазового перехода достаточно высоки, так что затрудняется установление термодинамического равновесия между фазами при температуре равновесного перехода. В результате процесс перехода совершается через метабильное состояние (рис. XVI.6).

Экспериментально гистерезис обнаружен в искусственных мембранных системах из синтетических и природных липидов. Например, для ДПФХ и ДМФХ гистерезисное смещение $T_{фп}$ в определенных условиях может достигать $3-5^\circ \text{C}$. Гистерезисная петля обнаружена и в ряде природных мембран, причем гистерезисное смещение $T_{фп}$ в мембранах *E. coli* оказалось существенно больше, чем в искусственных мембранах, построенных из липидов, которые были выделены из мембран этих микроорганизмов. Примечательно, что гистерезис проявляется и на функциональных характеристиках биологических мембран. Так, широкая гистерезисная петля ($\sim 10^\circ \text{C}$) наблюдается при регистрации потенциала действия на гигантском аксоне кальмара.

Теории фазового перехода. Попытки теоретически описать фазовые переходы липидов в мембранах предпринимались неоднократно. В общих теориях стремятся дать полное описание процесса и вычислить температуру фазового перехода и его тепловой эффект. Возможные конфигурации липидов, определяющие фазовый переход, находят, исходя из анализа энергии системы, представляющей собой сумму энергий внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий. Наиболее простая модель, предложенная Дж. Ф. Найглом (1973), рассматривает фазовый переход бислоя в рамках поворотно-изомерной теории (см. § 3 гл. VIII) как переход порядок-беспорядок с допущением произвольного сочетания *транс*- и *гос*-конформаций в каждой цепи. При подсчете числа возможных конфигураций предполагают, что соседние цепи находятся в одной плоскости и их углеродные атомы могут занимать ячейки плоской гексагональной решетки. Стерические ограничения учитывают путем допущения, что в одной ячейке решетки не может находиться более одного С-атома. Вычисленная на основе такого грубого двумерного приближения теплота перехода оказалась достаточно близкой к экспериментально измеренным величинам.

Модели фазового перехода, учитывающие большее число факторов, построены на основе теории молекулярного поля с использованием понятия «параметра порядка». В этих моделях полагают, что конфигурация системы липидных молекул, подобно нематическим жидким кристаллам, определяется взаимной ориентацией соседних молекул.

В модели, предложенной С. Марчельи (1974), энергию углеводородной цепи с конфигурацией i в бислое определяют следующим образом:

$$E^i = E_{\text{вн}}^i + E_{\text{дисп}}^i + pA^i. \quad (\text{XVI.1.8})$$

Первый член $E_{\text{вн}}^i$ представляет собой внутримолекулярную энергию цепи, которую находят с помощью поворотно-изомерной теории.

Третий член pA^i введен для учета бокового давления на цепь в бислое, возникающего за счет стерического отталкивания, электростатических взаимодействий и гидрофобного эффекта. Обычно в расчетах принимают, что значения p составляют $\sim 2 \cdot 10^{-4}$ Н/см; A — эффективная площадь продольного сечения цепи $\sim 0,2$ нм².

Второй член $E_{\text{дисп}}^i$ введен для учета межмолекулярных дисперсионных взаимодействий.

Модель Марчельи позволяет рассчитать температуру и тепловой эффект перехода, а также основные геометрические параметры цепей, которые находятся в хорошем соответствии с экспериментом.

Фазовые переходы в липидах мембран удастся описать в более общем виде с помощью феноменологической теории Ландау. Она позволяет представить термодинамический потенциал (свободная энергия) вблизи точки фазового перехода в виде степенного разложения по параметру порядка v :

$$G_v = a_1 v + \frac{1}{2} a_2 v^2 - \frac{1}{3} a_3 v^3 + \frac{1}{4} a_4 v^4. \quad (\text{XVI.1.9})$$

Здесь $a_1 = p(S_f - S_s)$, p — латеральное давление, S_f и S_s — поверхностные площади на молекулу в жидкокристаллическом и твердом состояниях, a_2 , a_3 , a_4 — коэффи-

циенты, которые могут быть найдены по зависимости $T_{\text{фп}}$ и ν от латерального давления p .

Параметры фазового перехода находят, минимизируя зависимость G_ν от T и ν . В теории Ландау параметр порядка определен несколько иным образом — через изменение поверхностной площади молекул при фазовом переходе:

$$\nu = \frac{S_f - S}{S_f - S_s}, \quad (\text{XVI.1.10})$$

где S — реальная поверхностная площадь на одну молекулу.

С помощью этого подхода рассмотрено влияние холестерина и белков на фазовые переходы и исследована зависимость параметра порядка липидов в ближайшем окружении молекул белков и холестерина в мембранах. Результаты этих работ в целом согласуются с результатами, полученными из модели Марчелли, в частности они указывают, что липиды могут образовывать несколько молекулярных слоев с постепенно меняющейся упорядоченностью вокруг белковых молекул.

Частные теории посвящены описанию зависимости фазовых переходов в бислое от параметров системы. В модели Трейбла и Эйбла (1974) в качестве такого параметра рассматривают свойства полярных групп липидов. В противоположность электронейтральным (цвиттерионным) липидам у заряженных липидов обычно наблюдается четкая зависимость температуры перехода от многих факторов, определяющих заряд липидов (рН, ионная сила, адсорбция ионов и т. д.). Если бы взаимодействие заряженных групп сводилось к простому отталкиванию одноименных зарядов, то фазовые переходы в заряженных липидах должны были бы происходить при более низких температурах, чем в электронейтральных. Фактически наблюдается обратная картина. В модели вклад электростатического взаимодействия в изменение энтальпии при фазовом переходе определялся в предположении, что свободная энергия заряженной поверхности зависит от плотности поверхностного заряда. В том случае, если заряды на поверхности липидного бислоя распределены равномерно, свободная энергия двойного электрического слоя ϕ может быть рассчитана по уравнению Гуи—Чэпмена (см. § 5 гл. XVIII).

Поскольку площадь, занимаемая молекулой липида в «твердом» бислое, меньше, чем в «жидком», плотность поверхностного заряда и, следовательно, свободная электростатическая энергия должны уменьшаться при фазовом переходе геля в жидкокристаллическое состояние.

Считай, что энтальпия фазового перехода состоит из неэлектростатического компонента ΔH и электростатического члена $\Delta E_{\text{эл}}$, температуру фазового перехода T^* для заряженных липидов можно записать в виде

$$T^* = \frac{\Delta H}{\Delta S} + \frac{\Delta E_{\text{эл}}}{\Delta S}. \quad (\text{XVI.1.11})$$

Смещение точки фазового перехода ΔT для заряженных липидов определяется выражением

$$\Delta T = T^* - T = \frac{\Delta E_{\text{эл}}}{\Delta S} = -\frac{2RT}{\Delta S} \left[\frac{\Delta A}{A_1} - \frac{(\Delta A)^2}{A_1 A_2} \right] a, \quad (\text{XVI.1.12})$$

где A_1 , A_2 — площади, занимаемые молекулой в «твердом» и «жидком» бислоях; a — степень диссоциации соответствующей группы; $\Delta A = A_2 - A_1$.

В предположении, что ΔS не зависит от pH, по этому уравнению можно предсказать, что температура фазового перехода, например фосфатидной кислоты, должна уменьшаться на $\sim 20^\circ \text{C}$ при переходе от протонированной к полностью ионизованной форме молекулы липида. Экспериментальная проверка показала достаточно хорошее совпадение реальных значений с теоретическим расчетом.

В целом термодинамические теории хорошо описывают влияние одновалентных катионов на $T_{\text{фп}}$.

§ 2. Особенности межмолекулярных взаимодействий в мембранах

В реальных условиях не только природные, но часто и искусственные мембраны существенно неоднородны по липидному или белковому составу. В структурной организации стабилизации таких систем наряду с обычными гидрофобными эффектами важное место занимают так называемые липид-белковые и белок-белковые взаимодействия. Эти термины используют для обозначения широкого круга разнообразных, отличающихся по механизмам явлений, которые приводят к неравномерному распределению молекулярных компонентов в мембранах — микрогетерогенности мембран.

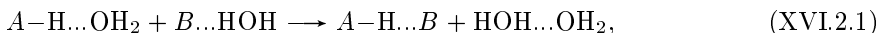
Липид-липидные взаимодействия. Этот термин обычно используют, чтобы выделить специфические взаимодействия, возникающие в мембранных системах вследствие неоднородности липидного состава.

Среди различных факторов, определяющих состояние липидов в мембранах, наибольшее значение имеют электростатические силы притяжения и отталкивания между заряженными полярными головками, стерические факторы, учитывающие форму молекул липидов и характер расположения их головок и гидрофобных углеводородных хвостов, «сила гидратации», а также водородные связи между головками липидов. Гидратационные силы играют важную роль при взаимодействии фосфолипидных мембран между собой. Сохранение слоя воды 10–30 Å около наружной полярной поверхности препятствует сближению мембран и их непосредственному контакту. Для удаления такого слоя воды необходимо нарушить его состояние и затратить энергию, что собственно и лежит в основе проявления гидратационных сил.

Природа гидратационных сил отталкивания носит неэлектростатический характер, а проявляется на фоне кулоновских взаимодействий, резко не экспоненциально возрастая на коротких расстояниях. Так, при сближении бислоев дигексадецилдиметиламиноацетата это происходит на расстоянии $\sim 11 \text{ \AA}$ между поверхностями (Парседжан В., 1989). Однако добавление ионов Ca^{2+} в систему может привести к их взаимодействиям с полярными группами, нарушению из-за этого гидратационного отталкивания и, как следствие, слипанию бислоев в структуру, не содержащую воды.

Гидратация липидов зависит от их природы и во многом определяет их физические свойства. Обычно меньшая гидратация наблюдается у липидов с донорными и акцепторными группами, принимающими участие в образовании водородных связей. Их пониженная гидратация вызывается участием групп полярных головок липидов в образовании водородных связей между собой, а не с окружающими молекулами воды (Боггс, 1987). Для того, чтобы это было возможно, необходимо

разрушить водородные связи с водой липидных групп и образовать «свою» водородную связь:



где $A-H$ — водород-донорная, а B — водород-акцепторная группа двух липидных молекул. В качестве $A-H$ -групп выступают NH_3^+ , NH_2 , POH , COH , $COOH$, $HNC-O$, а B -группы включают PO^- , COO^- , $OC-O$, COC .

Очевидно, реакция (XVI.2.1) будет осуществляться, если при этом суммарная стабильность водородных образованных связей в правой части уравнения будет больше, чем у водородных связей с водой групп $A-H$ и B . Сопровождающее этот процесс освобождение молекул воды с поверхности бислоя вызовет увеличение энтропии системы, что внесет вклад в компенсацию энергетических затрат для разрыва водородных связей между липидами и водой. Такого рода водородные связи легко разрываются и вновь возникают между другими липидами за времена $\sim 10^{-11}$ – 10^{-12} с. Единая система лабильных водородных связей способствует проявлению кооперативных свойств и, в частности, повышает температуру T фазовых переходов гель — жидкий кристалл, блокируя дестабилизирующее действие электростатических сил отталкивания полярных головок, которое, наоборот, снижает T .

Энергию взаимодействия системы, состоящей из двух липидных компонентов A и B , можно представить в виде парных потенциалов Φ_{AA} , Φ_{BB} и Φ_{AB} . Если разность $\Phi_{AB} - 1/2(\Phi_{AA} + \Phi_{BB})$ мала, то в системе будет наблюдаться равномерное распределение компонентов A и B . Когда же потенциалы взаимодействия сильно различаются, становится возможным скомпенсировать уменьшение энтропии за счет возрастания упорядоченности системы. В этом случае следует ожидать неравномерного распределения липидов и расслоения системы. Поскольку основной вклад в энергию взаимодействия липидов в мембранах обусловлен дисперсионным взаимодействием углеводородных цепей, эти эффекты наиболее явно проявляются в мембранах, сформированных из липидов, резко различающихся длиной углеводородных цепей. \square

Так, в мембранах из ДМФХ (14 углеродных атомов) и ДСФХ (18 углеродных атомов) при любом объемном соотношении компонентов (до 75% ДСФХ) наблюдаются два отдельных фазовых перехода (при 23 и 58° С соответственно), амплитуда которых пропорциональна мольной доле компонентов в мембране. Это означает отсутствие смешивания компонентов в твердой фазе. При 23° С < T < 58° С система представляет собой двумерный раствор кристаллических доменов ДСФХ в жидкокристаллической матрице из ДМФХ. Ненасыщенные липиды обычно также плохо смешиваются в твердой фазе с насыщенными липидами.

Иную картину можно наблюдать, когда мембраны сформированы целиком из насыщенных липидов, слабо различающихся длиной углеводородных цепей. В таком случае при любом соотношении компонентов равномерное распределение обнаруживается как в «твердом», так и в «жидком» состоянии. Например, в мембранах из ДПФХ (16 углеродных атомов) и ДСФХ регистрируется один фазовый переход, который постепенно смещается от 41 до 58° С при изменении доли ДСФХ в смеси от 0 до 100% соответственно.

В природных мембранах, содержащих большое число различных компонентов, весьма вероятно гетерогенное распределение липидов. Накоплен значительный экспериментальный материал, подтверждающий эту возможность, однако функциональное значение гетерогенного распределения липидов в мембранах является предметом дискуссий.

Липид-белковые взаимодействия. В основе данных взаимодействий лежат межмолекулярные дисперсионные и электростатические силы, водородные связи или другие эффекты связывания. Липид-белковые взаимодействия и обусловленные ими явления условно классифицируют следующим образом: взаимодействия белок — липидный монослой; взаимодействия белок — липидный бислой; липид-белковые взаимодействия в мембранах, включающие липид-зависимые ферменты.

Взаимодействие белков с липидными монослоями обнаруживается при включении в монослой радиоактивно меченных белков (альбумин, цитохром *c*). Электростатические взаимодействия между белками и монослоем проявляются в виде резкого изменения сорбции белков на заряженных монослоях при отклонении от изоэлектрической точки белков. В опытах с фосфолипазами показано, что электростатические взаимодействия определяют начальные этапы взаимодействия фермент — липидный монослой. Начальные этапы существенно облегчают последующую правильную стереохимическую ориентацию компонентов фермент-субстратного комплекса.

Взаимодействие белок — липидный бислой — высокоспецифичный и многостадийный процесс, характеризующийся наряду с поверхностной сорбцией внутримембранным встраиванием белков. Экспериментальным критерием встраивания белков в липидный бислой обычно служит изменение ионной проницаемости мембран. В модельных экспериментах встраивание мембранных белков в искусственные бислоиные системы играет решающую роль в их успешной функциональной реконструкции.

Липид-белковое взаимодействие в мембранах проявляется при образовании внутри мембран специфичного липидного окружения вокруг белковых молекул. Такие липиды называются связанными или аннулярными (от англ. *annular* — кольцеобразный). В настоящее время, однако, окончательно не решен вопрос о возможности формирования вокруг белков в жидкокристаллических мембранах (при $T > T_{\text{фп}}$) специфического липидного окружения, характеризующегося сравнительно медленным обменом с остальными липидами. Тем не менее с помощью метода ЭПР доказано изменение подвижности и характера упаковки углеводородных цепей под влиянием белков. Более того, методами ЭПР, ЯМР, флуоресценции и другими показано, что пертурбирующее действие различных интегральных и периферических белков (цитохром-*c*-оксидаза, цитохром *c*, полилизин, миелин, родопсин, белки тилакоидных мембран и др.) распространяется вплоть до четвертого слоя липидов, окружающих молекулу белка.

Функциональное значение аннулярных липидов обычно интерпретируют, исходя из экспериментальных наблюдений, согласно которым большая активность белков проявляется в менее вязком липидном окружении. Это показано, например, для цитохром-*c*-оксидазы, встроенной в искусственные липидные мембраны разного состава, или в случае АТФаз в мембранах ауксотрофных микроорганизмов.

В настоящее время описано несколько десятков мембранных ферментов, активность которых зависит от присутствия липидов, ниже перечислены некоторые из них.

<i>Ферментативная активность (функция)</i>	<i>Необходимые липиды</i>
Митохондриальный электронный транспорт	Общие липиды митохондрий
Na ⁺ , K ⁺ -АТФаза	Фосфатидилсерин, фосфатидилглицерол
Гликозо-6-фосфатаза Ca ²⁺ -АТФаза	Фосфатидилэтаноламин
	Лизофосфатидилхолин, фосфатидилхолин, нейтральные детергенты
Комплекс переносчиков НАД-цитохром-с-редуктазы	Фосфатидилхолин: лизофосфатидилхолин (1 : 1)
Стеарил-коэнзим-А-десатураза	Фосфолипиды, триглицериды, жирные кислоты
β-Гидроксibuтиратдегидрогеназа	Фосфатидилхолин

Некоторые из них, например митохондриальные электрон-транспортные белки, слабо чувствительны к липидному составу, но эффективно активируются суммарной липидной фракцией, содержащей некоторое количество ненасыщенных липидов. Для достижения максимальной активности других ферментов требуются липиды строго определенного состава. Эти ферменты проявляют специфичность по отношению к полярным головкам липидов и слабо зависят от жирнокислотного состава. В противоположность этому функциональная активность, например, родопсина зависит от длины углеводородных цепей липидов.

Липидная зависимость активности мембранных ферментов может отчетливо проявляться в условиях селективной экстракции мембранных липидов и при последующем добавлении определенных липидов к делипидизированным мембранам. Так, мягкая эфир-бутанольная экстракция плазматических мембран печени приводит к снижению базальной аденилатциклазной активности и гормон-стимулируемых ответов. Базальная активность полностью восстанавливается при добавлении к мембранам фосфатидилинозитола. Почти полное восстановление гормон-стимулируемой активности наблюдается при добавлении к мембранам фосфатидилсерина. Предполагают, что взаимодействие аденилатциклазы с определенными липидами мембран необходимо для проявления активности каталитического центра и образования активного гормон-рецепторного комплекса (см. гл. XXVI).

Белок-белковые взаимодействия. Эти взаимодействия проявляются в мембранах в виде обратимой внутримембранной агрегации мембранных белков, часто сопровождающейся изменением функциональной и ферментативной активности системы. Так, в мембранах эритроцитов равномерно распределены белковые внутримембранные частицы, обратимо агрегирующие при значениях рН ниже 5,5. Агрегация чувствительна к составу водной фазы; при возрастании концентрации электролитов и низких значениях рН агрегация приостанавливается. Эта внутримембранная агрегация белковых частиц в эритроцитах коррелирует с изменением распределения поверхностных рецепторов.

К настоящему времени выявлено, что циклы агрегации-деагрегации белков в клеточных мембранах — широко распространенное явление, проявляющееся при

пиноцитозе, на ряде стадий клеточного цикла, при взаимодействии и слиянии мембран и т. д. Полагают, что в основе агрегационных взаимодействий могут лежать силы электростатического характера или более сложные взаимодействия, опосредованные особенностями липидного окружения белков, а также локальная кристаллизация липидов в мембранах.

§ 3. Перекисное окисление липидов биомембран

Перекисное окисление липидов — процесс, наблюдаемый при нормальном функционировании биомембран, обычно возрастает при патологических состояниях организма.

В изучении механизма этого явления важную роль сыграли теории перекисного окисления Баха—Энглера (1897) и цепных разветвленных реакций Н. Н. Семенова (1934), а также работы школ Н. М. Эмануэля о жидкофазном окислении углеводов и Б. Н. Тарусова о роли цепного свободнорадикального окисления липидов в действии повреждающих факторов на клетку.

Процесс перекисного окисления липидов начинается с образования свободнорадикальных продуктов за счет разрыва в молекуле углеводорода С—Н или С—С-связей. Легче он протекает в углеводородах, содержащих ненасыщенные двойные связи. Наименьшей энергией разрыва обладает СН-связь, находящаяся рядом с двойной связью в α -положении. Но и в этом случае для ее разрыва необходимо затратить более 300 кДж/моль. Поэтому общая скорость перекисного окисления липидов определяется прежде всего стадией инициирования свободнорадикального процесса.

Перекись липида $ROOH$ возникает в реакции свободнорадикального интермедиата — алкильного радикала $R\cdot$ с кислородом; сначала образуется перекисный радикал $ROO\cdot$, а затем после его взаимодействия с молекулой субстрата RH появляется перекись: $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$.

Реакции, в ходе которых исходный углеводородный радикал R затем регенерируется вновь из неокисленной молекулы субстрата RH , называются цепными. Число циклов, которое успевает совершить свободнорадикальный центр до момента гибели, определяет длину цепи.

В интактных биомембранах обнаружены ферментные и неферментные системы, способные инициировать перекисное окисление липидов. Инициатором свободнорадикального окисления является активированный кислород в форме супероксидного анион-радикала O_2^- , пергидроксильного радикала $HO_2\cdot$, гидроксильного радикала $HO\cdot$ и синглетного кислорода 1O_2 . Важную роль в иницировании окислительных реакций играет перекись водорода.

Активированные формы кислорода. В молекуле кислорода два электрона из 12 неспарены. Поэтому молекула кислорода обладает суммарным спином 1 и свойствами бирадикала. Она парамагнитна, и ее основное состояние триплетное 3O_2 ($\uparrow\uparrow$). В триплетном состоянии $^3\Sigma_g$ кислород легко реагирует с ионами железа, другими парамагнитными радикалами. Вместе с тем молекулярный кислород относительно мало активен при взаимодействии с органическими молекулами, находящимися в основном (синглетном) состоянии. Последовательное одноэлектронное восстановление кислорода до воды приводит к образованию активных промежуточных продуктов (рис. XVI.7).

На первом этапе восстановления кислорода образуется супероксидный анион-радикал O_2^- . Он имеет окислительно-восстановительный потенциал, равный $-0,32$ В, что близко к потенциалам восстановленных пиридиннуклеотидов. В протонных растворителях O_2^- протонируется до пергидроксильного радикала HO_2^\cdot . Константа диссоциации реакции равна 4,8, и потому процессы с участием HO_2^\cdot протекают преимущественно в кислой среде. Дальнейшее восстановление супероксидного анион-радикала приводит к образованию перекиси водорода. Это соединение в присутствии ионов переменной валентности распадается до гидроксильных радикалов HO^\cdot (см. ниже). Диссоциация перекиси водорода на ионы возможна только в щелочной среде ($pK = 11,8$).

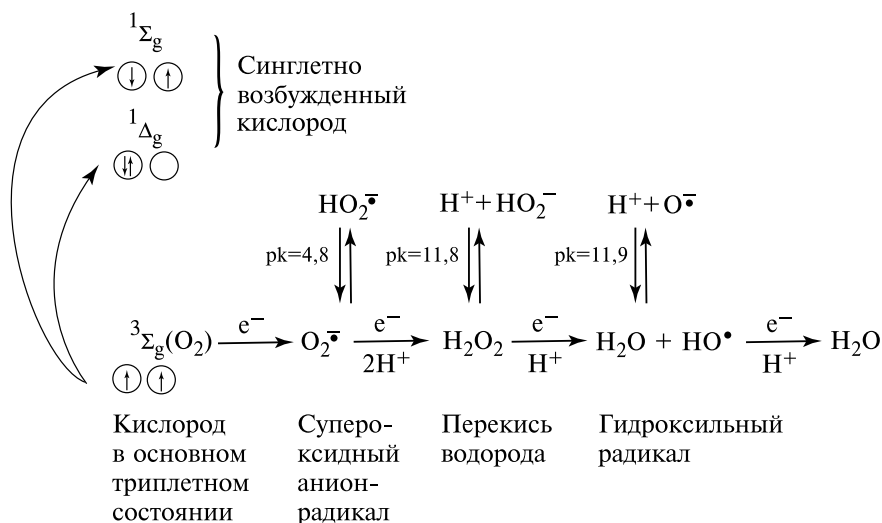


Рис. XVI.7.

Образование форм активированного кислорода в процессах его одноэлектронного восстановления и возбуждения

На следующем этапе одноэлектронного восстановления перекиси водорода происходит разрыв связи между атомами кислорода и образование молекулы воды и гидроксильного радикала HO^\cdot . Завершается восстановление кислорода образованием второй молекулы воды.

Гидроксильный радикал обладает чрезвычайно высокой реакционной способностью. Константа скорости реакции отрыва водорода от углеводородной цепи молекулы радикалом HO^\cdot близка к константе диффузии $10^9-10^{10} \text{ м}^{-1}\text{с}^{-1}$. Взаимодействие гидроксильного радикала с субстратами окисления практически неизбирательное.

Из исходного триплетного состояния кислород может переходить в одно из двух возбужденных состояний, отличающихся локализацией внешних электронов (рис. XVI.7). Такой переход осуществляется в случае получения кислородом энергии как в фотохимических, так и темновых реакциях. Нижнее возбужденное со-

стояние Δg обладает избыточной энергией $94,5 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, что соответствует энергии инфракрасного излучения с длиной волны 1270 нм . Состояние с большей энергией $^1\Sigma_g$ ($156,7 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$) обладает очень малым временем жизни в водных системах (порядка 10^{-10} с) и его участие в биологических процессах маловероятно. Синглетный кислород в воде имеет время жизни около 2 мкс . Он активно вступает в реакции с многими ненасыщенными соединениями, образуя специфические продукты, например, диокситаны и трансаннулярные внутренние перекиси. Константа скорости взаимодействия синглетного кислорода с полиненасыщенными жирными кислотами около $10^4\text{--}10^5 \text{ м}^{-1}\text{с}^{-1}$. На рис. XVI.8 показаны основные реакции преобразования активных форм кислорода.

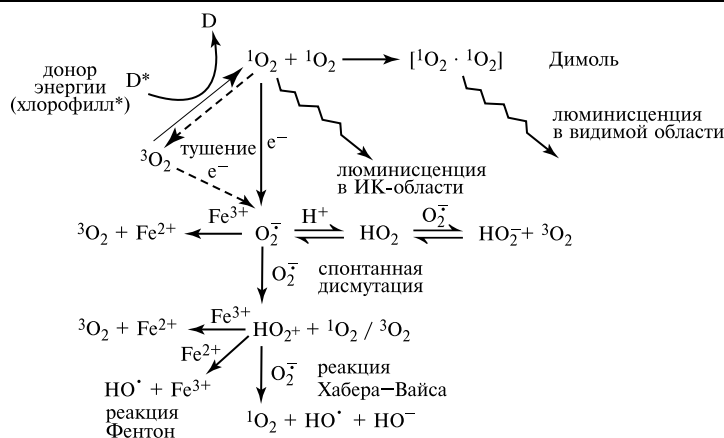


Рис. XVI.8.

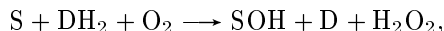
Основные реакции преобразования форм активированного кислорода

В представленной схеме центральное место занимает супероксидный анион-радикал O_2^- . Его спонтанная дисмутация приводит к появлению перекиси водорода и, по некоторым данным, синглетного кислорода. При взаимодействии перекиси водорода с супероксидным анион-радикалом (реакция Хабера—Вайса) образуется гидроксильный радикал HO^\cdot и, возможно, синглетный кислород. Трехвалентное железо или другой окисленный ион переменной валентности могут быть восстановлены перекисью водорода или супероксидным анион-радикалом. Гомолитический распад перекиси водорода при ее взаимодействии с двухвалентным железом (реакция Фентон) дает гидроксильный радикал HO^\cdot .

Активированный кислород в биологических системах. Образование активированного кислорода в клетке происходит в ходе аэробного дыхания и фотосинтеза. Существует некоторая вероятность того, что первичный продукт восстановления кислорода — супероксидный анион-радикал покинет пределы дыхательной или фотосинтетической цепи и окажется в цитозоле. Эффективность этого события обычно возрастает при «перегрузке» электронтранспортной цепи, когда возрастает восстановленность ее переносчиков. В дыхательной цепи донором электрона для кислорода может служить семихинонная форма убихинона. В фотосинтетической

электронтранспортной цепи (см. гл. XXVII) значительная часть O_2^- возникает на уровне акцепторов электронов фотосистемы 1 и ферредоксина. В фотосистеме 2 одноэлектронное восстановление кислорода могут осуществлять пластохинон и пластоцианин.

Кроме того, активация кислорода возможна в системе мембран эндоплазматического ретикулума, где в ходе транспорта электронов от восстановленных пиридиннуклеотидов и при участии переносчика электронов цитохрома *P-450* происходит гидроксилирование стероидных гормонов, холестерина, желчных кислот, а также ксенобиотиков (липофильных чужеродных молекул) по типу монооксигенных реакций:



где *S* — субстрат окисления, DH_2 — донор электронов НАДФН. Важно отметить, что система монооксигенного окисления в отсутствие субстратов гидроксилирования переключается на перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот мембранных липидов. В результате возможно изменение химического состава, физических параметров, ультраструктурной организации и функциональных характеристик биологических мембран.

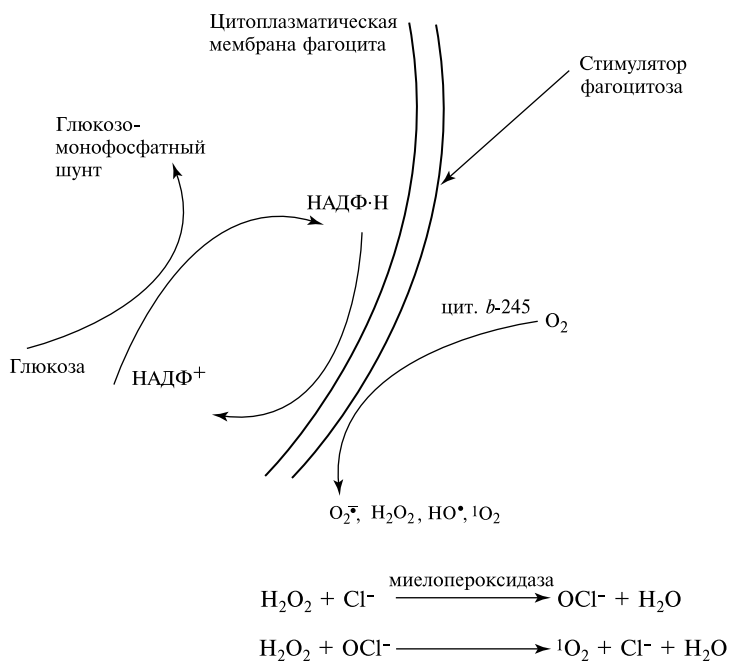


Рис. XVI.9.

Кислородзависимые реакции, сопровождающие фагоцитоз

Особая система генерации активированного кислорода функционирует у фагоцитирующих клеток. Она представлена на рис. XVI.9. Появление чужеродной

частицы на пути фагоцита приводит к активации в клетке гексозомонофосфатного шунта восстановления НАДФН. Затем НАДФН с помощью мембранносвязанного цитохрома *b*-245 восстанавливает кислород до супероксидного анион-радикала. Дальнейшая судьба радикала представлена на схеме рисунка XVI.8. Одновременно при участии миелопероксидазы в клетке генерируются ионы OSi^- . Указанные на схеме рисунка XVI.9 кислородсодержащие свободнорадикальные продукты, являясь мощными бактерицидными агентами, участвуют в уничтожении чужеродных клеток.

Растительный организм не имеет специализированных клеток, использующих «кислородное» оружие для борьбы с внешней инфекцией. Но принцип защиты у растений весьма похож на тот, к которому прибегают животные клетки. Контакт паразита с растительной клеткой вызывает выход из нее во внеклеточное пространство фенольных соединений и окисление последних пероксидазой клеточной стенки. Генерируемые при этом свободнорадикальные продукты являются токсичными для паразита. Это один из механизмов фитоиммунитета. Активные формы кислорода, по-видимому, играют определенную роль и в так называемой реакции сверхчувствительности растения.

Активированный кислород участвует в биосинтетических процессах, например, при образовании простогландинов у животных или фитогормона этилена у растений.

В фотосинтетических реакциях возможна также миграция энергии с возбужденной молекулы пигмента (хлорофилла) на кислород и перевод его в активированное синглетное состояние 1O_2 (рис. XVI.8). Этот процесс может привести к деструкции фотосинтетических мембран, богатых ненасыщенными липидами. На этом основано также фотодинамическое действие света, когда донором энергии для молекулы O_2 служат молекулы красителей. Генерируемый в фотохимических реакциях синглетный кислород ответственен в большой степени за бактерицидное действие солнечного света.

Предполагают, что активные формы кислорода как в физиологических условиях, так и при окислительном стрессе, вызванном различным факторами, могут выполнять роль инициаторов эндонуклеазной фрагментации ДНК (апоптозис, запрограммированная гибель клетки) или даже непосредственно атаковать ДНК (гидроксильный радикал). Биологическое значение клеточного апоптозиса заключается в защите организма от злокачественного перерождения клеток.

Итак, в аэробных условиях в организмах появляется активированный кислород, как побочный продукт ряда биохимических реакций, так и в связи с целенаправленной активацией кислорода в целях защиты от инфекции, удаления ксенобиотиков, а возможно и самоликвидации переродившихся клеток. Формы активированного кислорода в высокой концентрации обладают токсическим и, в частности, бактерицидным действием. Высказаны предположения о роли форм активного кислорода как мессенджера в регуляции гомеостаза клетки. Ненасыщенные липиды биологических мембран представляют собой одну из наиболее уязвимых мишеней активированного кислорода. □

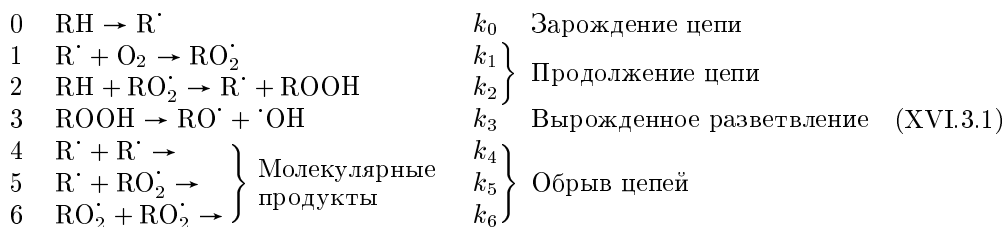
Перекисное окисление липидов является фактором, способным изменять химический состав и физические параметры, ультраструктурную организацию

и функциональные характеристики биологических мембран. Процесс перекисного окисления охватывает главным образом непредельные фосфолипиды биологических мембран, в основном полиненасыщенный фосфатидилэтанолламин. Перекисное окисление приводит к увеличению вязкости мембран за счет уменьшения количества жидких гидрофобных липидов в бислойных участках, появления поперечных межмолекулярных сшивок и возрастания количества упорядоченных липидов, обладающих ограниченной подвижностью в бислое. Происходит также увеличение отрицательного заряда на поверхности мембран, обусловленное появлением вторичных продуктов перекисного окисления липидов, содержащих карбонильные и карбоксильные группы.

В биологических мембранах (мембраны эритроцитов, митохондрий, саркоплазматического и эндоплазматического ретикулаума, лизосом) вследствие перекисного окисления липидов индуцируется проницаемость для различных ионов, неэлектролитов и макромолекул. Этот эффект потери мембранами барьерных функций лежит в основе патогенеза многих заболеваний.

В результате перекисного окисления липидов происходят изменения свойств таких мембранных белков, как транспортные Ca^{2+} -АТФаза, Na^+/K^+ -АТФаза, цитохромы P -450, b_5 , c , глюкозо-6-фосфатаза, моноаминоксидаза, фосфолипаза, родопсин. В основе модифицирующего действия лежит обеднение микроокружения белков полиеновыми фосфолипидами, образование межмолекулярных сшивок за счет взаимодействия со вторичными продуктами перекисного окисления, окисление SH-групп, снижение термоустойчивости белков.

Обычно схема процесса перекисного окисления липидов мембран строится по типу реакций жидкофазного окисления углеводов:



Здесь RH — молекула углеводорода (жирнокислотный остаток), R^{\cdot} и RO_2^{\cdot} — алкильный и перекисный свободные радикалы, ROOH — гидроперекись, k_0, k_1, \dots — константы соответствующих реакций.

Поскольку реакция 1 протекает с высокой скоростью ($k_1 \simeq 10^7 \div 10^8 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$), а концентрация кислорода в жидкофазных системах обычно достаточно велика, полагают, что в жидкофазных системах выполняется условие $[\text{R}] \ll [\text{RO}_2]$. Значит, в жидкофазных системах важнейшим радикалом является радикал RO_2^{\cdot} , только он участвует в процессе продолжения цепи (реакция 2) и вступает в реакции обрыва цепи (реакция 6).

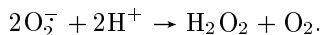
Защитные механизмы. Биологические системы адаптированы к аэробным условиям. Они защищены от токсического действия активных форм кислорода ферментными системами, антиоксидантами и тушителями синглетного кислорода.

Концентрация перекиси водорода в клетке контролируется каталазой, разлагающей перекись без образования активных продуктов, и пероксидазами, использу-

ющими перекись водорода для окисления всевозможных субстратов. Фермент глутатионпероксидаза восстанавливает перекиси липидов и, таким образом, предотвращает их распад до радикальных продуктов и тормозит развитие окислительной реакции (реакция 3 на схеме XVI.3.1). Важную роль в удалении перекиси водорода из хлоропласта играет аскорбат-пероксидаза.

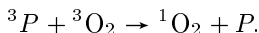
Антиоксиданты — вещества, защищающие биологические системы от окисления за счет взаимодействия со свободными радикалами. Наиболее типичными антиоксидантами являются соединения фенольного типа, способные эффективно взаимодействовать с активными свободными радикалами липидов с образованием малоактивных радикалов ингибитора. В различных природных мембранах это токоферолы и ряд гидрохинонов.

Другую группу антиоксидантов образуют соединения, эффективно взаимодействующие с активными формами кислорода. Они резко снижают концентрацию супероксидных радикалов в системе, катализируя реакцию дисмутации (супероксиддисмутаза (СОД)), с образованием перекиси водорода и кислорода в триплетном состоянии:



Константа скорости этой реакции ($2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) очень велика.

∎ Антиокислительное действие в системах, где генерируется $^1\text{O}_2$, оказывают тушители синглетного кислорода. В этом отношении наиболее эффективен β -каротин, скорость тушения которым $^1\text{O}_2$ контролируется диффузией ($k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). α -Токоферол также достаточно эффективно тушит $^1\text{O}_2$ ($k \sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Этот процесс преимущественно протекает по механизму физического тушения, в котором дезактивируется синглетное состояние кислорода. Процесс химического тушения $^1\text{O}_2$ сопровождается окислением ингибитора и, как правило, идет с меньшей скоростью (для токоферола $k \sim 10^6 \div 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Суммарная константа физического и химического взаимодействия с $^1\text{O}_2$ для гистидина, триптофана порядка $(3 \div 5) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. В фотосинтетических мембранах синглетный кислород образуется в реакции кислорода $^3\text{O}_2$ с мономерными молекулами хлорофилла или бактериохлорофилла P (см. гл. XXVII, XXVIII), находящимися в триплетном состоянии (см. рис. XVI.8):



В результате последующих реакций пигмент окисляется, а в системе возникает хемилюминесценция (см. ниже):



за счет рекомбинации радикалов при разложении лабильных перекисей пигментов.

Защитные функции каротиноидов (см. гл. XXVII) осуществляются по механизму физического тушения. □

В целом, в адаптированных к аэробным условиям биологических системах токсическое действие активных форм кислорода в большей или меньшей степени блокировано ферментными системами, антиоксидантами и тушителями синглетного

кислорода. Содержание супероксидных радикалов в клетках контролируется супероксиддиомутазой, которая является основным фактором, приводящим к элиминированию супероксидного аниона.

Концентрация перекиси водорода в клетке контролируется каталазой, разлагающей перекись без образования активных продуктов, и пероксидазами, использующими перекись водорода для окисления некоторых субстратов, например глутатиона в случае глутатионпероксидазы. Кроме того, глутатионпероксидаза может восстанавливать перекиси липидов и, таким образом, предотвращать распад перекисей до радикальных продуктов и продолжения цепи (реакция 3 на схеме XVI.3.1 на с. 66). Важнейшую роль в удалении перекиси водорода в хлоропластах играет аскорбат-пероксидаза.

Таким образом, аэробные организмы обладают многоуровневой защитой от развития неуправляемых свободнорадикальных процессов. Однако в ряде случаев эти средства защиты оказываются недостаточными, что и приводит к патологическим состояниям организма.

Хемилюминесценция. Хемилюминесценцией ХЛ называют свечение, генерируемое в ходе химической реакции. В механизме ХЛ реакции выделяют две стадии: химическую и физическую. На химической стадии возникают электронно-возбужденные продукты. Вероятность их образования, равная отношению числа возбужденных молекул к числу прореагировавших молекул, определяет квантовый выход возбуждения V_b . На следующей физической стадии ХЛ происходит переход возбужденной молекулы продукта из синглетного или триплетного состояния в основное с испусканием кванта света. Вероятность испускания кванта света, т. е. отношение числа излученных квантов к числу возбужденных молекул продукта, называют квантовым выходом люминесценции V_d . Квантовые выходы возбуждения и люминесценции всегда меньше единицы.

Таким образом, интенсивность излучения в химической реакции пропорциональна скорости химической реакции W и произведению квантовых выходов возбуждения и излучения продуктов реакции:

$$I_{ХЛ} = V_b V_d W. \quad (XVI.3.2)$$

На интенсивность световой реакции влияют физические тушители — вещества, которые перехватывают энергию возбужденного продукта и диссипируют ее в тепло.

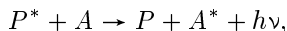
Зависимость уровня ХЛ от концентрации тушителя передает уравнение Штерна—Фольмера:

$$I_t = \frac{I_0}{I + \tau \cdot k[T]}, \quad (XVI.3.3)$$

где I_0 — интенсивность ХЛ в отсутствие тушителя, I_t — под действием тушителя, τ — время жизни возбужденного состояния продукта реакции, $[T]$ — концентрация тушителя и k — константа взаимодействия тушителя с возбужденным продуктом.

Добавление в реагирующую систему соединений, обладающих более высоким квантовым выходом люминесценции (активаторов, A), чем излучающий продукт ХЛ реакции, может усилить излучение системы. Происходит это потому, что с продукта реакции энергия возбуждения может мигрировать на молекулу актива-

тора:



где P^* и P — молекула продукта в возбужденном и основном состояниях, A^* и A — молекула активатора в возбужденном и основном состояниях. Активатор не должен участвовать в химическом процессе и влиять на скорость реакции, а только изменять уровень свечения.

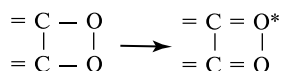
Спектр излучения ХЛ реакции обычно соответствует люминесцентным характеристикам конечного продукта реакции или вещества активатора. Спектр излучения активатора сдвинут в более длинноволновую область по сравнению со спектром излучения продукта. Возбужденная молекула излучает свет либо с синглетного (флуоресценция), либо с триплетного (фосфоресценция) уровня. Коротковолновую границу спектра ХЛ определяют следующим условием:

$$h\nu \leq E_a + \Delta H,$$

где $h\nu$ — величина коротковолнового кванта на границе спектра ХЛ, E_a — энергия активации химической реакции, ΔH — изменение энтальпии.

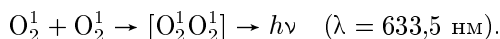
Для излучения кванта света в видимой части спектра в единичном химическом акте должна освобождаться энергия от 1,8 до 3,1 электрон-вольт (41–71 ккал/моль или 171–298 кДж/моль). Наиболее экзотермичными реакциями являются рекомбинация свободных радикалов или ионных пар, а также перенос электрона от анион-радикала на окислитель. Эти реакции могут сопровождаться ХЛ при соответствующих условиях.

Другим темновым химическим процессом, в результате которого возникают электронно-возбужденные продукты, является распад органических эндоперекисей. Последние наиболее вероятно образуются в биологических системах при взаимодействии различных субстратов с активированным кислородом. Образующиеся перекисные соединения класса диокситанов при распаде дают электронно-возбужденное состояние одного из карбонильных продуктов (кетонов):



Испускание кванта в акте перехода карбонильного соединения из возбужденного состояния в основное приводит к ХЛ.

Генерация синглетного возбужденного кислорода с последующим переходом его в основное состояние также может дать начало ХЛ. Наибольшее значение имеет переход из синглетного состояния $^1\Delta_g$ в основное с испусканием квантов инфракрасного излучения $\lambda = 1270$ нм с очень низким квантовым выходом. Время жизни $^1\Delta_g$ -состояния в водных растворах не превышает нескольких микросекунд. Кроме того возможно образование димерной формы возбужденного кислорода, которое сопровождается изменением в видимой области спектра



Хемилюминесценция синглетного кислорода может наблюдаться в химических системах, где он активно генерируется. Так, в химической реакции взаимодействия

гипохлорита Na с перекисью водорода в видимой области спектра излучают димеры синглетного кислорода. Однако в целом такого типа реакции в биологических системах вряд ли возможны, поскольку синглетно возбужденный кислород быстро реагирует с различными ненасыщенными соединениями, а время жизни его в воде соответственно всего около 2 мкс. Кроме того в клетках синглетный кислород эффективно тушат каротиноиды, токоферолы и другие молекулы.

По-видимому, наблюдаемая в биологических системах ХЛ происходит с участием активированных молекул кислорода в основном в результате распада продуктов окисления органических соединений, а не за счет непосредственного испускания кванта синглетно возбужденным кислородом.

Как правило, спонтанная ХЛ животных и растительных тканей сопровождает их нормальную жизнедеятельность. Это свечение обычно возрастает при стрессовых воздействиях, что указывает на активацию окислительных процессов в этих условиях. Большой вклад в исследование природы свечения живых организмов вне-сла отечественная школа Б. Н. Тарусова.

Хемилюминесценция является одним из наиболее чувствительных методов обнаружения и оценки уровня протекания реакций с участием форм активированного кислорода в биологических системах. Часто для обнаружения и измерения концентрации активированного кислорода в исследуемую систему добавляют хемилюминесцентный индикатор — люминол или люцигенин. Эти соединения окисляются формами активированного кислорода и при этом хемилюминесцируют с высоким квантовым выходом.