

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
"Харьковский политехнический институт"

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ

Национальный технический университет
"Харьковский политехнический институт"

МЕХАНИЗМЫ МЕМБРАННЫХ ПРОЦЕССОВ

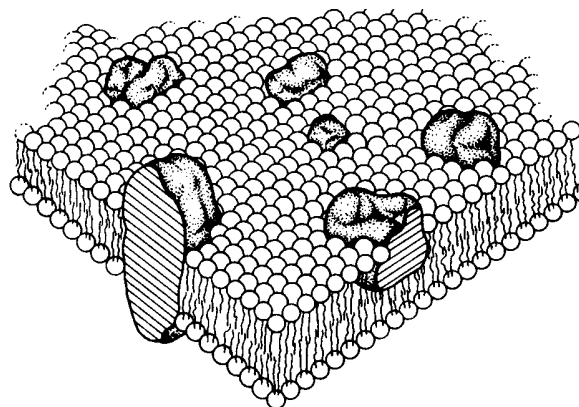
Учебно-методическое пособие по курсу
"Биологические мембраны"

для студентов специальности 7.092901
"Промышленная биотехнология"
заочного обучения

МЕХАНИЗМЫ МЕМБРАННЫХ ПРОЦЕССОВ

Учебно-методическое пособие по курсу
"Биологические мембраны"

для студентов специальности 7.092901
"Промышленная биотехнология"
заочного обучения



Харьков 2006

Утверждено
редакционно-издательским
советом университета,
протокол № 3 от 15.12.2005г.

Харьков НТУ "ХПИ" 2006

ББК 28.05

О 39

УДК 577.352

Рецензенты: А.И. Ильинский, д-р. физ.-мат. наук, проф. НТУ "ХПИ"

С.И. Дихтярев, д-р. фарм. наук, проф. ГП "ГНЦЛС"

Огурцов А.Н. Механизмы мембранных процессов: Учебно-методическое пособие по курсу "Биологические мембраны" для студентов специальности 7.092901 "Промышленная биотехнология" заочного обучения. – Харьков: НТУ "ХПИ", 2006. – 139 с.

Учебно-методическое пособие включает основные понятия и представления теории биологических мембран, изложены функции и свойства биомембран, рассмотрены вопросы транспорта веществ через мембраны, образования мембранных потенциалов, генерации потенциала действия, механизмы функционирования ионных каналов в биологических мембранах.

Предназначено для студентов специальности 7.092901 "Промышленная биотехнология" заочного обучения и может быть полезно студентам всех специальностей биотехнологического профиля как заочного, так и дневного обучения, а также всем, кто изучает мембранную биофизику или интересуется ее проблемами.

Навчально-методичний посібник містить основні поняття та уявлення теорії біологічних мембран, викладені функції та властивості біомембран, розглянуті питання транспорту речовин крізь мембрани, утворення мембранных потенціалів, генерації потенціалу дії, механізми функціонування іонних каналів в біологічних мембранах.

Призначений для студентів спеціальності 7.092901 "Промислова біотехнологія" заочного навчання та може бути корисний студентам усіх спеціальностей біотехнологічного профілю як заочного, так і денного навчання, а також усім, хто вивчає мембранну біофізику або цікавиться її проблемами.

Ил. 65. Табл. 4. Библиогр. 30 назв.

ББК 28.05

© А.Н. Огурцов, 2006 г.

ВСТУПЛЕНИЕ

Предметом учебной дисциплины "Биологические мембраны" являются биофизические и биохимические механизмы мембранных процессов в живой клетке. Научную основу курса "Биологические мембраны" составляют физика и биофизика, общая, органическая, аналитическая, физическая химия и биохимия, общая промышленная биотехнология.

Методическими основами курса являются лекции, в которых излагаются основные положения каждого раздела, практические занятия и самостоятельная работа студентов, которая является основным способом усвоения материала в свободное от аудиторных занятий время.

Для самостоятельной работы выделяется больше половины общего объема времени, предназначенного для изучения данной дисциплины. Самостоятельная работа проводится по всем темам, которые входят в дисциплину, как по тем, по которым читаются лекции, так и по тем, для которых дается только план изучения и ссылки на литературу. В процессе самостоятельной работы студент учится самостоятельно приобретать знания, которые затем используются в ходе выполнения индивидуальной самостоятельной работы, практических занятий, при подготовке к выполнению контрольных работ и к экзамену.

Настоящее пособие подготовлено на основе работ [1–30] таким образом, чтобы максимально облегчить усвоение курса "Биологические мембраны" студентам специальности 7.092901 "Промышленная биотехнология" заочного обучения.

1. КЛАССИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИИ 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 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.

Мембраны играют ключевую роль как в *структурной организации*, так и в функционировании всех клеток – прокариотических и эукариотических, растительных и животных клеток. В клетках эукариот имеет место широко развитая сеть внутриклеточных мембранных образований, которая занимает значительную часть внутреннего объема клетки.

Мембраны не только *разделяют* клетку на отдельные *компарменты*, но и участвуют в регуляции всех связей и взаимодействий, которые осуществляются между наружной и внутренней сторонами этих компарментов [1]. Это может проявляться в виде физического переноса ионов или молекул через мембрану (внутри компартамента или из него) или в форме передачи информации при помощи конформационных изменений, индуцируемых в мембранных компонентах (таблица 1).

Кроме того, с мембранами связаны многие клеточные ферменты. Некоторые из них катализируют трансмембранные реакции, когда реагенты находятся по разные стороны мембраны или когда каталитический акт сопровождается транспортом молекул. Другие ферменты образуют своеобразные комплексы, которые осуществляют цепь последовательных превращений, причем благодаря тому, что эти ферменты располагаются в плоскости мембраны, повышается эффективность всего процесса [2].

Имеются ферменты, которые, действуя на мембраносвязанные субстраты, участвуют тем самым в биосинтезе мембран. С участием мембран в той или иной степени осуществляется большинство жизненно важных клеточных функций, например, протекают такие разные процессы, как репликация прокариотической ДНК, биосинтез белков и их секреция,

биоэнергетические процессы и функционирование систем гормонального ответа.

Таблица 1 – Виды биологических мембран

Биомембраны	Поверхностные мембраны	Цитоплазматические мембраны	
	Внутриклеточные мембраны	Мембраны, образующие сферические структуры	Лизосомальные Митохондриальные Пероксисомальные
		Мембраны, образующие разветвленную сеть	Гладкий эндоплазматический ретикулум Шероховатый эндоплазматический ретикулум
	Мембраны внешней поверхности клетки	Опорные структуры	Клеточная стенка Клеточная оболочка
		Межклеточные структуры	Базальная мембрана
	Комплексы клеток	Клеточный пласт	
Эпителий			

Биомембраны и их составляющие выполняют следующие *функции* (рисунок 1).

1. *Ограничение и обособление* клеток и органелл. Обособление клеток от межклеточной среды обеспечивается плазматической мембраной, защищающей клетки от механического и химического воздействий. Плазматическая мембрана обеспечивает также сохранение разности концентраций метаболитов и неорганических ионов между внутриклеточной и внешней средой.

2. *Контролируемый транспорт* метаболитов и ионов определяет внутреннюю среду, что существенно для *гомеостаза*, т.е. поддержания постоянной концентрации метаболитов и неорганических ионов, и других физиологических параметров.

Регулируемый и избирательный транспорт метаболитов и неорганических ионов через поры и посредством переносчиков становится возможным благодаря обособлению клеток и органелл с помощью мембранных систем.

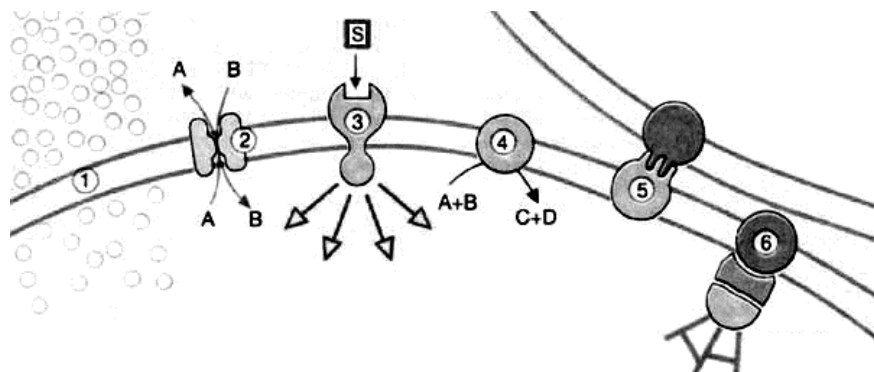


Рисунок 1 – Функции мембран

3. **Восприятие внеклеточных сигналов** и их передача внутрь клетки, а также инициация сигналов.

4. **Ферментативный катализ.** В мембранах на границе между липидной и водной фазами локализованы ферменты. Именно здесь происходят реакции с неполярными субстратами.

Примерами служат биосинтез липидов и метаболизм неполярных ксенобиотиков. В мембранах локализованы наиболее важные реакции энергетического обмена, такие, как окислительное фосфорилирование (дыхательная цепь) и фотосинтез.

5. Контактное взаимодействие с межклеточным матриксом и **взаимодействие с другими клетками** при слиянии клеток и образовании тканей.

6. **Заякоривание цитоскелета**, обеспечивающее поддержание формы клеток и органелл и клеточной подвижности.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Дайте определение биологической мембраны.
2. Перечислите виды биологических мембран.
3. Перечислите основные функции биологических мембран.

2. СТРУКТУРА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Понимание того, что плазматическая мембрана представляет собой вполне определенную структуру, было достигнуто в середине XIX столетия. В конце XIX столетия Овертон обратил внимание на корреляцию между скоростью, с которой небольшие молекулы проникают в растительные клетки, и их коэффициентом распределения между маслом и водой; это привело его к мысли о липидной природе мембран.

В 1925 г. Гортер и Грендел предположили, что липиды в мембране эритроцитов образуют **бимолекулярный** слой [3] (**липидный бислой**) (рисунок 2).

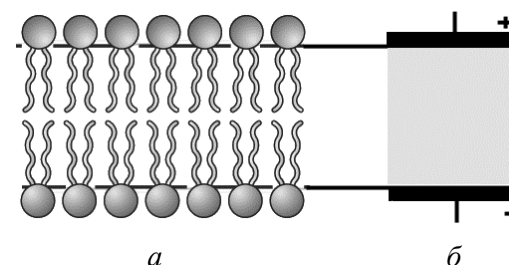


Рисунок 2 – Схема липидного бислоя: а) бимолекулярный слой липидов; б) мембрана как конденсатор

Эта идея возникла на основе результатов простого эксперимента. Липиды эритроцитов экстрагировали ацетоном и затем в кювете Лэнгмюра получали из них тонкую пленку на поверхности воды. С помощью поплавка сжимали слой липидных молекул на границе раздела вода-воздух до тех пор, пока этот слой не начинал оказывать сопротивление дальнейшему сжатию; это явление было объяснено образованием плотноупакованной мономолекулярной липидной пленки.

Измерение площади, занимаемой липидами, и сравнение ее с площадью поверхности эритроцитов, из которых эти липиды были экстрагированы, дали соотношение 2:1. Отсюда был сделан вывод, что мембрана эритроцитов состоит из липидных молекул, расположенных в два слоя. В историческом плане эта работа имела большое значение, поскольку

с тех пор **концепция липидного бислоя** как структурной основы биологических мембран стала доминирующей и на самом деле оказалась верной.

Эту гипотезу подтвердили в 1935 г. Коул и Кертис определив электрические параметры биологических мембран: высокое электрическое сопротивление $R \approx 10^7$ Ом·м² и большую удельную емкость $C \approx 0,5 \cdot 10^{-2}$ Ф/м².

Биологическую мембрану можно рассматривать как **электрический конденсатор** (рисунок 2(б)), в котором пластинами являются электролиты наружного и внутреннего растворов (внеклеточного и цитоплазмы) с погруженными в них головами липидных молекул. Проводники разделены диэлектрическим слоем, образованным неполярной частью липидных молекул – двойным слоем их хвостов. Диэлектрическая проницаемость липидного слоя $\epsilon = 2$.

Емкость плоского конденсатора

$$C = \frac{\epsilon \epsilon_0 S}{d},$$

где $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{12}$ Ф/м – электрическая постоянная, d – расстояние между пластинами конденсатора, S – площадь пластины.

Удельная емкость (емкость, приходящаяся на единицу площади)

$$C_S = \frac{\epsilon \epsilon_0}{d}.$$

Поэтому можно рассчитать расстояние между пластинами конденсатора, соответствующее в нашем случае толщине липидной части мембраны

$$d = \frac{\epsilon \epsilon_0}{C_S} = \frac{8,85 \cdot 10^{-12} \cdot 2}{0,5 \cdot 10^{-2}} \text{ м} = 3,5 \text{ нм}.$$

Это по порядку величины соответствует наблюдаемой толщине мембран.

Кроме липидов в состав мембраны входят белковые молекулы. Так, коэффициент поверхностного натяжения клеточных мембран значительно ближе к коэффициенту поверхностного натяжения на границе раздела белок-вода ($\sim 10^{-4}$ Н/м), чем на границе раздела липид-вода ($\sim 10^{-2}$ Н/м).

Концепция бимолекулярной липидной мембраны получила дальнейшее развитие в предложенной в 1935 г. модели Дэвсона-Даниелли, или **модели "сэндвича"** ("бутербродная" модель) [4]. Согласно этой модели мембрана состоит из трех слоев: два крайних слоя состоят из белковых молекул, а средний слой – липидный. Это была необыкновенно удачная модель, и в течение последующих 30 лет многочисленные экспериментальные данные, особенно полученные с помощью дифракции рентгеновских лучей и электронной микроскопии, полностью подтвердили ее адекватность. Однако тогда же обнаружилось, что мембраны выполняют огромное множество функций, и чтобы объяснить этот феномен, исходная модель Дэвсона-Даниелли неоднократно подвергалась модификациям.

Сингер и Никольсон в 1972 г. на основе совокупности результатов, полученных физическими и химическими методами исследования такими, как рентгеноструктурный анализ и электронная микроскопия, предложили **жидкостно-мозаичную модель** строения биологических мембран [5], которая является общепринятой в настоящее время. Согласно Сингеру и Никольсону, структурную основу биологической мембраны образует двойной слой фосфолипидов, в котором располагаются белковые молекулы (рисунок 3). Различают поверхностные (или периферические) и интегральные белки.

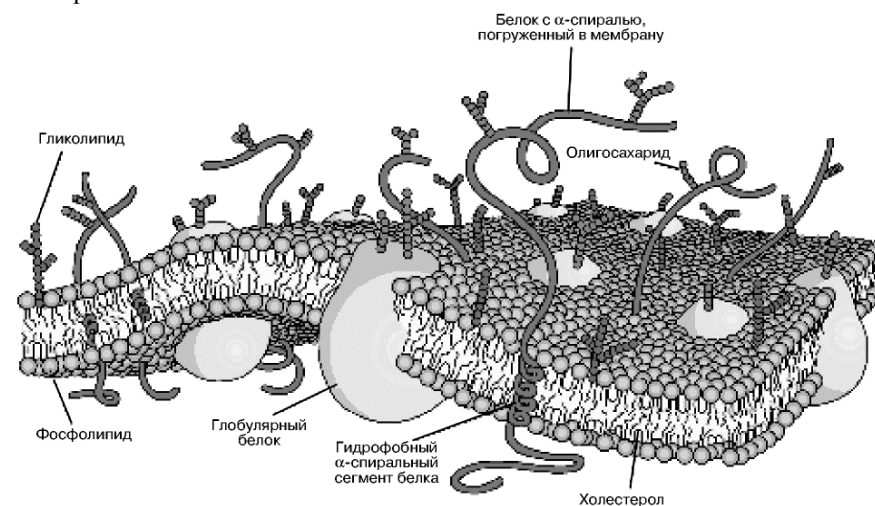


Рисунок 3 – Жидкостно-мозаичная модель плазматической мембраны

Липиды находятся при физиологических условиях в жидком агрегатном состоянии. Это позволяет сравнить мембрану с **фосфолипидным морем**, по которому плавают белковые "айсберги". В разных мембранах соотношение между содержанием белков и фосфолипидов различно в различных мембранах: в миелиновой мембране белков в 2,5 раза меньше, чем липидов, а в эритроцитах, напротив, белков в 2,5 раза больше, чем липидов. Не вся поверхность биологической мембраны покрыта белками. Так, например, более чем половина поверхности мембраны кишечной палочки образована полярными головами липидов.

Белки могут быть интегрированы с мембраной двумя способами: тривиальной сорбцией на поверхности или погружением в гидрофобный слой [6]. Примеры такого рода погружения показаны на рисунке 4.

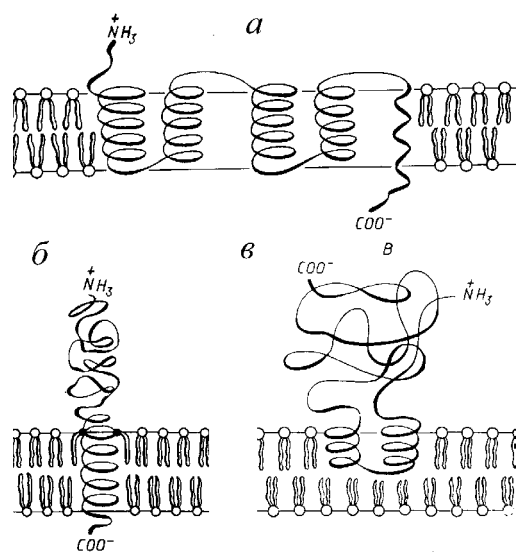


Рисунок 4 – Различные типы организации мембранных белков: а – белок почти полностью погружен в мембрану; полипептидная цепь пересекает мембрану несколько раз, образуя α -спиральные колонны; б – сравнительно небольшая гидрофобная часть белка погружена в мембрану, пересекая всю ее толщину; для стабилизации связи с мембраной иногда наблюдается ковалентное присоединение жирных кислот к белку (показаны черными точками); в – гидрофобный "якорь" белка проникает только на расстояние фосфолипидного монослоя

Помимо фосфолипидов и белков, в биологических мембранах содержатся и другие химические соединения. В мембранах животных клеток много холестерина (в сравнимом количестве с фосфолипидами и белками). Есть в мембранах и другие вещества, например гликолипиды, гликопротеиды.

Модель строения мембраны Сингера и Никольсона (жидкостно-мозаичная) в настоящее время общепринята. Однако, как всякая модель, она дает довольно упрощенную картину строения мембраны. В частности, обнаружено, что белковые "айсберги" не всегда свободно "плавают" в липидном море, а могут быть "заякорены" на внутренние (цитоплазматические) структуры клетки. Кроме того, не все липиды в мембране расположены по принципу бислоя. Липидная фаза мембран содержит также участки, в которых липидные молекулы не образуют двойной слой.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Опишите эксперимент Гортела и Грендела.
2. В чем различие между моделями биологической мембраны Дэвсона-Даниелли и Сингера-Никольсона?
3. Перечислите способы интеграции белков с мембраной.

3. МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ

В мембранах содержатся разные фосфолипиды. Например, в мембране эритроцитов их около 20 видов. Варьирует химическая формула полярной головы молекулы.

Молекулы фосфолипидов, входящие в состав биологических мембран, обладают свойствами **амфифильности**, которое заключается в том, что часть молекулы полярна (а потому гидрофильна), а другая – неполярна (и гидрофобна). Это обусловлено особенностями химической структуры фосфолипидов (рисунок 5) [7], молекулы которых строятся из глицерина, жирных кислот, фосфорной кислоты и полярного соединения, характерного для каждого класса фосфолипидов (холин, этаноламин, серин и др.). По своей форме молекулы фосфолипидов напоминают **сплющенный**

цилиндр (рисунок 5(а)) [8], около 1/4 которого (по длине) гидрофильна, а 3/4 – гидрофобна.

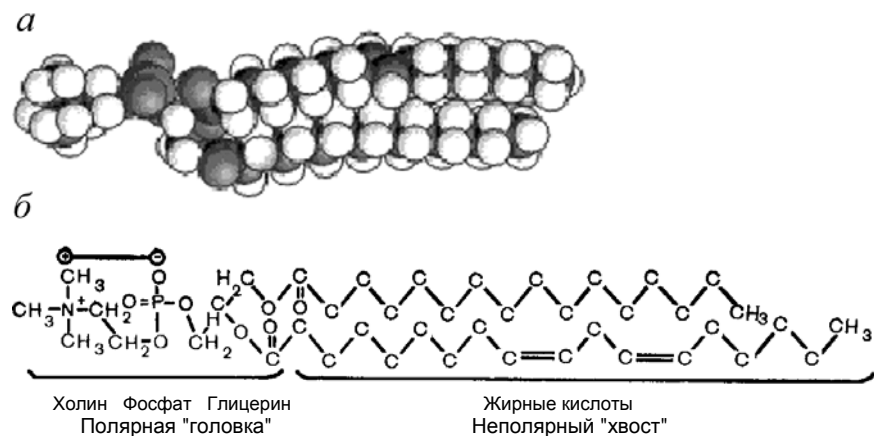


Рисунок 5 – Схемы липидов: *а* – молекула фосфоглицерида, *б* – молекула лецитина

У некоторых фосфолипидов головы кроме двух зарядов противоположного знака, создающих дипольный момент, но оставляющих молекулу в целом нейтральной, несут один **некомпенсированный** отрицательный заряд, вследствие чего молекула оказывается заряженной отрицательно. Углеводородные хвосты фосфолипидной молекулы содержат приблизительно 20 атомов углерода, в хвосте может быть 1–4 двойных ненасыщенных связей.

Полярные головы, молекул фосфолипидов – гидрофильны, а их неполярные хвосты – гидрофобны. В смеси фосфолипидов с водой термодинамически выгодно, чтобы полярные головы были погружены в состоящую из полярных молекул воду, а их неполярные хвосты были бы расположены подале от воды (рисунок б).

Такое расположение **амфифильных** (имеющих и гидрофильную, и гидрофобную части) молекул соответствует наименьшему значению энергии Гиббса по сравнению с другими возможными расположениями молекул.

Существенным является то обстоятельство, что молекулы фосфолипидов имеют **два хвоста**. Такая молекула в пространстве имеет форму, близкую к **цилиндру** (рисунок 5(а)). Из молекул фосфолипидов в водной среде происходит **самосборка** бислоевой мембраны (рисунок 6(3)).

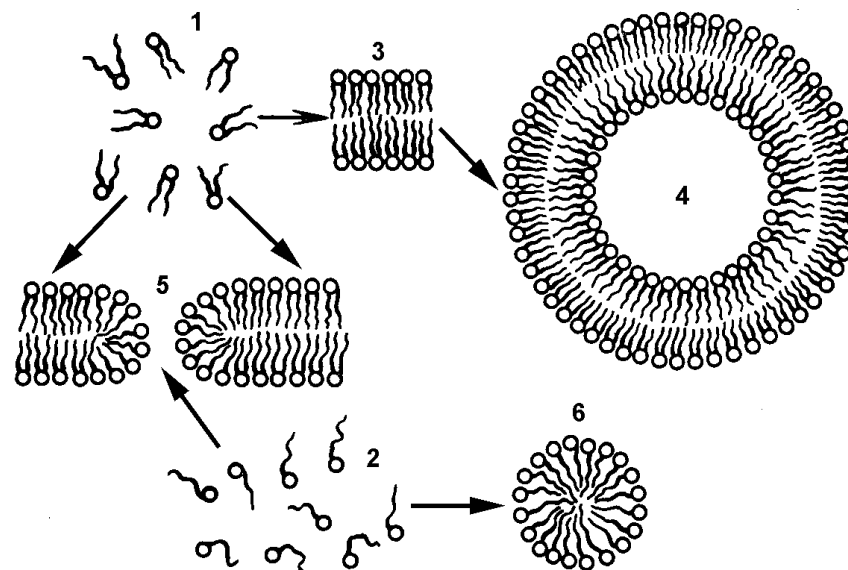


Рисунок 6 – Самосборка фосфолипидных везикул в водном растворе: 1 – молекулы фосфолипидов; 2 – их лизоформы; 3 – бислоевая мембрана; 4 – липосома; 5 – пора в бислоевой мембране; 6 – мицелла

Липидные бислои, если они имеют достаточно большую протяженность, стремятся замкнуться сами на себя, чтобы спрятать гидрофобные участки фосфолипидных молекул от воды; в результате образуются фосфолипидные **везикулы-липосомы** (рисунок 6(4)) [7].

Окисление одно из жирнокислотных цепей фосфолипида при свободнорадикальном процессе перекисного окисления или отщепление ее под действием фермента **фосфолипазы** приводит к образованию молекулы, у которой размер "головки" в плоскости мембраны превышает размеры гидрофобной части: молекула по форме ближе уже не к цилиндрической, а к **конической**. Присутствие молекул таких дефектных молекул с одним

хвостом (лизолецитин), имеющих в пространстве форму, близкую к конусу, разрушает клеточные мембраны.

Фосфолипидные молекулы, лишённые одного из хвостов, образуют **поры в бислоевой мембране**, нарушается барьерная функция мембран (рисунок 6(5)). Такие дефектные молекулы, собираясь вместе, образуют не бислой, а сферические мицеллы (рисунок 6(6)).

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем заключается амфифильность фосфолипидов?
2. Перечислите структуры, которые реализуются в ходе самосборки фосфолипидов.
3. Как влияют на структуру мембран наличие в ее составе лизоформ фосфолипидов?

4. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕМБРАН

Функционирование биологических мембран существенно зависит от вязкости липидного бислоя, подвижности фосфолипидных молекул в мембране и фазового состояния мембранных липидов. Липидная фаза биологических мембран при физиологических условиях (давлении, температуре, химическом составе окружающей среды) находится в жидком агрегатном состоянии. Это доказано методами **флуоресцентного анализа** (с использованием флуоресцентных зондов и меток), **электронного парамагнитного резонанса** (ЭПР), с использованием спиновых зондов и меток, и **ядерного магнитного резонанса** (ЯМР).

В естественном состоянии мембрана не флуоресцирует. Для проведения исследования мембраны флуоресцентным методом, необходимо искусственным путем ввести в мембрану молекулы или молекулярные группы, способные к флуоресценции. В качестве **флуоресцентных зондов** используются: ДМХ – диметиламинохалкон; МБА – 3-метоксисбензантрон; АНС – 1-анилин-нафталин-сульфонат и др. (рисунок 7) [9].

Флуоресцентный анализ дает возможность исследовать подвижность фосфолипидных молекул в мембране, оценить вязкость липидной фазы мембраны (так называемую вязкость мембран).

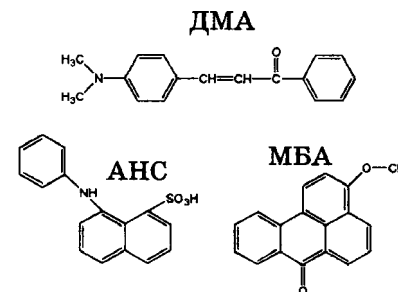


Рисунок 7 – Структура некоторых флуоресцентных зондов, применяемых при изучении биологических мембран

Микровязкость мембраны можно оценить по изменениям спектров флуоресценции, а также по степени поляризации P флуоресцентного излучения при освещении мембраны **поляризованным светом**. Связь степени поляризации P и микровязкости мембраны η выражается **формулой Перрена и Яблонского**

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \left(1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right),$$

где P_0 – степень поляризации света на неподвижных молекулах, $R = 8,31 \text{ Дж}/(\text{К} \cdot \text{моль})$ – универсальная газовая постоянная, T [K] – температура, V – молярный объем флуоресцирующих молекул, τ – время жизни возбужденного состояния.

Наиболее полные сведения об агрегатном состоянии липидных бислоев дают методы ЭПР и ЯМР.

Электронный парамагнитный резонанс – это явление резкого возрастания поглощения энергии электромагнитной волны системой парамагнитных частиц (электронов с некомпенсированными спинами), помещенных во внешнее магнитное поле, при резонансной частоте волны ν_{res} .

Наличие спина у электрона $\left(S = \frac{1}{2}, m_s = \pm \frac{1}{2} \right)$ приводит к тому, что во внешнем магнитном поле B , вследствие двух возможных ориентаций

спина электрона по отношению к этому полю, энергия электрона может принимать одно из двух значений

$$E_{m_s} = 2\mu_B m_s B,$$

где $\mu_B = \frac{e\hbar}{2m_e} = 0,927 \cdot 10^{-23}$ Дж/Тл — магнетон Бора, m_e — масса электрона.

Поэтому, при усилении приложенного магнитного поля энергия электронов со спином $m_s = +\frac{1}{2}$ повышается $E_{+1/2} = \mu_B B$, а энергия электронов со спином $m_s = -\frac{1}{2}$ понижается $E_{-1/2} = -\mu_B B$ (рисунок 8(а))

[10], причем разность энергий этих двух спиновых состояний будет

$$\Delta E = E_{+1/2} - E_{-1/2} = 2\mu_B B.$$

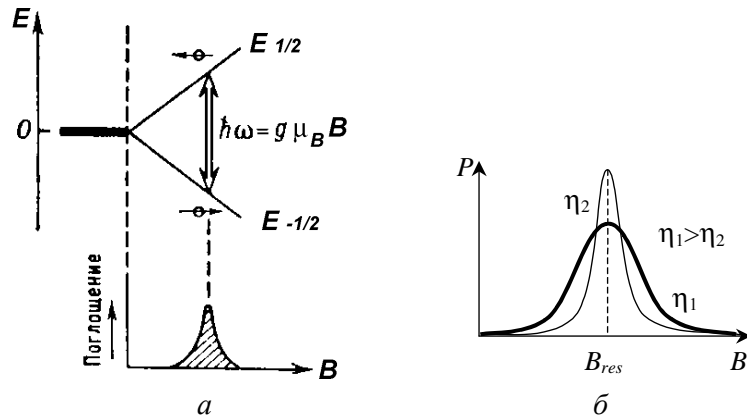


Рисунок 8 – Электронный парамагнитный резонанс: а – схема энергетического сдвига уровней в магнитном поле; б – схема изменения спектров ЭПР при уменьшении микровязкости (увеличении подвижности молекул)

Если облучать образец полем с частотой ν , то при достижении магнитным полем такой величины, что

$$h\nu = 2\mu_B B$$

резко возрастает поглощение — наблюдается электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) системы двух уровней с окружающим излучением. Парамагнитным резонанс называется потому, что он возможен *только для*

системы с неспаренными спинами ($m_s \neq 0$), т.е. для парамагнитных веществ.

В действительности, вследствие взаимодействия спина электрона с локальным магнитным полем, создаваемым ядрами и электронами молекулы, коэффициент в формуле отличается от 2, его называют g -фактор, условие резонанса записывают

$$\nu_{res} = \frac{g\mu_B B}{h}.$$

При проведении экспериментов удобнее оставлять частоту ν электромагнитной волны постоянной, а медленно менять индукцию магнитного поля B . Резонансное поглощение энергии будет наблюдаться при значении индукции

$$B_{res} = \frac{h\nu}{g\mu_B}.$$

В ЭПР используются частоты электромагнитного поля $\nu \sim 10^{10}$ Гц и магнитное поле индукцией $B \sim 0,3$ Тл.

Спектром ЭПР называется зависимость мощности поглощения P электромагнитной волны от величины магнитной индукции B .

Спектры ЭПР тем шире, чем сильнее взаимодействие между атомами и молекулами образца. И наоборот, чем слабее взаимодействие между частицами (больше подвижность молекул), тем уже спектры ЭПР (рисунок 8(б)). Следовательно, по ширине спектров ЭПР можно судить о подвижности молекул вещества.

Поскольку молекулы фосфолипидов диамагнитны, для исследований биомембран методом электронного парамагнитного резонанса используются *спиновые зонды* и *спиновые метки* — молекулы или молекулярные группы с неспаренными электронами. Формула одного из таких соединений, часто используемого при исследовании мембран, представлена на рисунке 9 [10].

Парамагнитные спиновые зонды вводятся в липидную мембрану, спектры поглощения спиновыми зондами электромагнитной волны дают информацию о свойствах липидного окружения, в частности о подвижности липидных молекул в мембране.

Несмотря на ценную информацию, которую удалось получить при исследовании биологических объектов методом ЭПР с использованием спиновых зондов, этот метод обладает существенным **недостатком** – внесение в биологический объект чужеродных молекул-зондов может изменять структуру объекта. От этого недостатка свободен метод ЯМР.

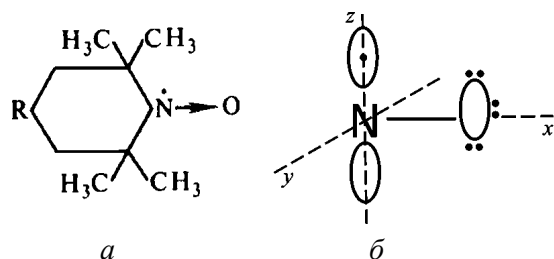


Рисунок 9 – Спиновые зонды: *a* – формула спинового зонда ТЕМПО (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксин); *б* – схема электронного строения парамагнитного фрагмента нитроксильного радикала

Ядерный магнитный резонанс – это явление резкого возрастания поглощения энергии электромагнитной волны системой атомных ядер, обладающих магнитным моментом, помещенных во внешнее магнитное поле, при резонансной частоте волны ν_{res} :

$$\nu_{res} = \frac{g_n \mu_n B}{h},$$

где g_n – ядерный множитель Ланде, имеющий, например, для протона значение $g_n = 5,58$; μ_n – ядерный магнетон, который составляет 1/1836 часть магнетона Бора.

Магнитным моментом обладают такие ядра как ^1_1H , $^{13}_6\text{C}$. Такие ядра, как ^4_2He , $^{16}_8\text{O}$, $^{12}_6\text{C}$ не обладают магнитным моментом. В биологических мембранах содержится много протонов (^1_1H), поэтому ЯМР активно используется при исследовании биомембран.

В ЯМР применяют более сильные магнитные поля ($B \sim 1$ Тл), но меньшие частоты переменного электромагнитного поля ($5 \cdot 10^7$ Гц), чем в

ЭПР. Как и в случае ЭПР, спектры ЯМР тем шире, чем больше вязкость и меньше молекулярная подвижность исследуемого объекта.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какие свойства биомембран позволяет исследовать флуоресцентный анализ?
2. Для каких систем применим метод электронного парамагнитного резонанса?
3. Приведите примеры спиновых зондов.
4. Дайте определение ядерного магнитного резонанса.

5. ПОДВИЖНОСТЬ И ДИФФУЗИЯ ЛИПИДОВ В МЕМБРАНАХ.

Исследования методами ЭПР, ЯМР и флуоресцентного анализа показали, что **подвижность** фосфолипидных молекул в мембране сравнительно велика, а вязкость мала. В естественных физиологических условиях липидная часть мембраны находится в жидком агрегатном состоянии. Вязкость липидной мембраны сравнима с вязкостью подсолнечного масла: $\eta \approx (30 - 100)$ мПа·с. (Для сравнения: вязкость воды при 20°C составляет 1 мПа·с).

Микровязкость мембраны у концов липидных хвостов меньше, чем около полярных голов. Это доказано методом ЭПР с использованием спин-меток (рисунок 10) [6]. Спиновые метки присоединялись к разным местам фосфолипидной молекулы.

Как показано на рисунке 10, второму положению спиновой метки соответствует более узкий спектр ЭПР, а, следовательно, подвижность участка 2 фосфолипидной молекулы больше, чем участка 1. Поэтому в середине мембраны упорядоченность во взаимном расположении хвостов фосфолипидных молекул меньше.

Высокая подвижность липидных молекул обуславливает латеральную (боковую) диффузию (рисунок 11(a)) [8].

Латеральной диффузией называется хаотическое тепловое перемещение молекул липидов и белков в плоскости мембраны. При латеральной диффузии рядом расположенные молекулы липидов скачком

меняются местами и, вследствие таких последовательных перескоков из одного места в другое, молекула перемещается вдоль поверхности мембраны.

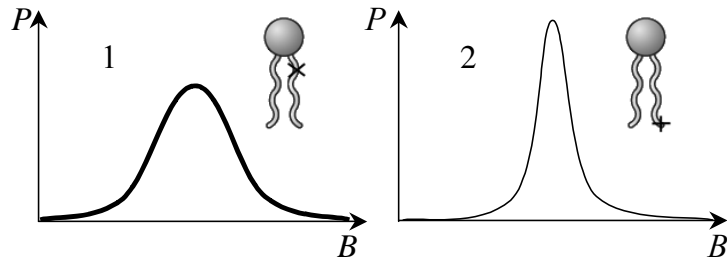


Рисунок 10 – Два способа прикрепления спиновой метки к фосфолипидной молекуле и различие спектров ЭПР для этих двух случаев (схематичное изображение)

Среднее квадратичное перемещение $\langle s \rangle^2$ молекул при диффузии за время t можно оценить по формуле Эйнштейна:

$$\langle s \rangle^2 = 2\sqrt{Dt}.$$

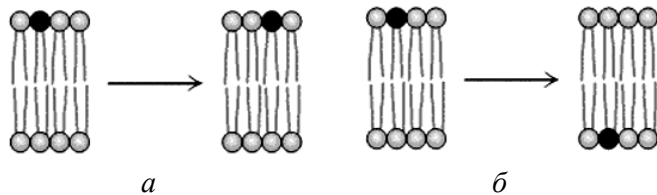


Рисунок 11 – Диффузия липидов в биомембране: *а* – латеральная диффузия, *б* – диффузия "флип-флоп"

Зная $\langle s \rangle^2$, можно найти значение коэффициента латеральной диффузии D . Методом **флуоресцентных меток** (флуоресцирующих молекулярных групп) экспериментально было определено время t среднего квадратичного перемещения молекул по поверхности мембраны клетки. Флуоресцентные метки делают флуоресцирующими молекулы, движение

которых по поверхности клетки можно изучать, например, исследуя под микроскопом скорость расплывания по поверхности клетки светящегося пятна, созданного такими молекулами.

Другой способ, используемый с целью определения скорости перемещения флуоресцирующих молекул – **фотообесцвечивание**. В клетку вводят молекулы, к которым ковалентно присоединены флуоресцентные метки, а затем небольшой участок клеточной поверхности (несколько квадратных микрометров) облучают лазерным лучом. Под действием лазерного излучения молекулы теряют способность флуоресцировать. Измеряя скорость восстановления флуоресценции в обесцвеченной области по скорости уменьшения радиуса обесцвеченного пятна, получают оценку скорости латеральной диффузии.

В экспериментах с флуоресцентными метками было установлено, что среднее квадратичное перемещение за секунду фосфолипидной молекулы по поверхности мембраны эритроцита составляет около 5 мкм, что сравнимо с размерами клеток. Таким образом, за секунду молекула может обжегать всю поверхность небольшой клетки. Обнаруженное среднее квадратичное перемещение белковых молекул составило около 0,2 мкм за секунду.

Рассчитанные по формуле Эйнштейна коэффициенты латеральной диффузии для липидов $D_{\text{липидов}} = 6 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$, для белков $D_{\text{белка}} = 10^{-14} \text{ м}^2/\text{с}$. Частота перескоков (число перескоков в секунду) молекулы с одного места на другое вследствие латеральной диффузии может быть найдена по формуле:

$$\nu = 2\sqrt{3} \frac{D}{S},$$

где S – площадь, занимаемая одной молекулой на мембране.

Для молекул фосфолипидов $D_{\text{липидов}} = 6 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$, $S \sim 7 \cdot 10^{-19} \text{ м}^2$. Для этих значений частота перескоков $\nu = 3 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$.

Каждая молекула, таким образом, в среднем претерпевает десятки миллионов перестановок в плоскости мембраны за секунду, то есть характерное время одного перескока $\tau = 10^{-7} - 10^{-8} \text{ с}$.

Флип-флоп – это диффузия молекул мембранных фосфолипидов поперек мембраны (рисунок 11(б)) [8]. Схематически процесс флип-флопа фосфолипидных молекул представлен на рисунке 12.

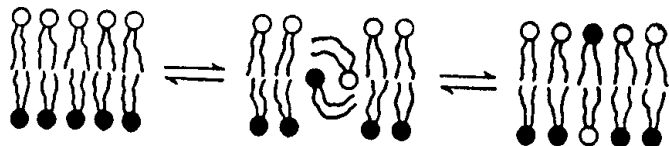


Рисунок 12 – Схема флип-флопа в бислое фосфолипидных молекул

Скорость "флип-флопа" – перескоков молекул с одной поверхности мембраны на другую – была определена методом спиновых меток в опытах на модельных липидных мембранах – липосомах [15].

Часть фосфолипидных молекул, из которых формировались липосомы, метились присоединенными к ним спиновыми метками. Липосомы подвергались воздействию аскорбиновой кислоты, вследствие чего неспаренные электроны на молекулах пропадали – парамагнитные молекулы становились диамагнитными – что можно было обнаружить по уменьшению площади под кривой спектра ЭПР.

Сначала "нейтрализовались" неспаренные электроны молекул, расположенных на внешних поверхностях липосом, что приводило к уменьшению числа неспаренных электронов в два раза. Электронный парамагнитный резонанс затем определялся спиновыми метками на внутренних, не доступных действию аскорбиновой кислоты поверхностях липосом. Однако площадь под спектрами ЭПР продолжала уменьшаться, что свидетельствовало о снижении числа неспаренных электронов. Это объяснялось перескоками меченных спиновыми метками молекул с внутренней поверхности бислоевой мембраны липосомы на внешнюю – "флип-флопом" (рисунок 13).

По скорости уменьшения интенсивности сигнала ЭПР установлено, что половина меченых молекул претерпевает флип-флоп примерно за 6,5 часов, поскольку примерно через это время площадь под кривой спектра

ЭПР (а, следовательно, число неспаренных электронов) уменьшалась в два раза.

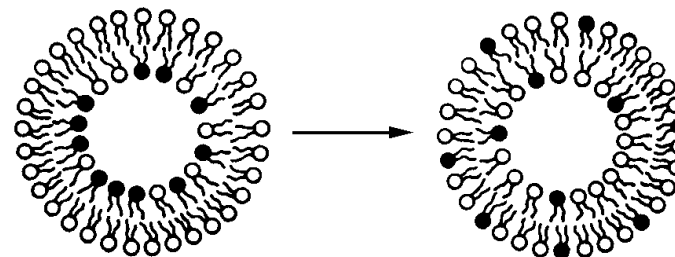


Рисунок 13 – Выход спин-меченных фосфолипидов (черные кружки) на наружную поверхность за счет флип-флопа

Таким образом, перескоки молекул с одной поверхности бислоя на другую ("флип-флоп") совершаются **значительно медленнее**, чем перескоки при латеральной диффузии. Среднее время, через которое фосфолипидная молекула совершает "флип-флоп" ($t \sim 1$ час), **в десятки миллиардов раз** больше среднего времени, характерного для перескока молекулы из одного места в соседнее в плоскости мембраны.

Такое сочетание быстрой диффузии молекул вдоль мембраны и очень медленной диффузии поперек мембраны имеет большое значение для функционирования мембран, а именно для матричной функции мембраны. Вследствие затрудненного перехода поперек мембраны поддерживается **упорядоченность** в молекулярной структуре мембраны, ее **анизотропия**, **асимметрия** (относительно плоскости мембраны) расположения липидных и белковых молекул, определенная **ориентация** белков-ферментов поперек мембраны. Это имеет решающее значение, например, в случае направленного транспорта веществ через мембрану.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Как экспериментально определить микровязкость биомембраны вблизи ее поверхности и во внутренней области?
2. Дайте определение латеральной диффузии.
3. В чем отличие "флип-флопа" от латеральной диффузии?
4. Как методом ЭПР определить скорость "флип-флопа"?

6. ПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Прежде чем приступить к детализации мембранных процессов, перечислим вкратце мембранные структуры клетки и те процессы, которые с ними связаны и которые будут подробнее рассмотрены ниже. Все клетки имеют **внешнюю мембрану**, что обеспечивает постоянство внутриклеточного состава вне зависимости от изменений в окружающей среде.

У клеток тканей высших животных нет жесткой клеточной стенки, но во многих из них плазматическая мембрана окружена ещё и внешней оболочкой, или **гликокаликсом**, образованным из полисахаридов. **Цитоплазматическая мембрана** состоит, в основном из полярных липидов и белков и непроницаема для многих низкомолекулярных соединений, в том числе и для ионов.

Однако особые белки-переносчики, называемые **каналоформерами**, способны избирательно увеличивать проницаемость мембраны для веществ, необходимых организму (**облегченная диффузия**). По каналам вещества и ионы движутся через мембрану по градиенту концентраций.

Помимо такого механизма существуют еще так называемые **насосы**, которые способны переносить вещества через мембрану против градиента концентраций, используя для переноса энергию гидролиза АТФ (**активный транспорт**).

В модельных системах через искусственные мембраны вещества переносятся по градиенту концентраций за счет диффузии до достижения термодинамического равновесия (**пассивный транспорт**).

В живой клетке через цитоплазматическую мембрану постоянно осуществляется транспорт веществ, потребляемых в процессе синтеза основных компонентов клетки, что создает градиент концентрации этих веществ между внутренней и внешней средой.

Плазматическая мембрана не только регулирует вход и выход веществ через клеточную мембрану, но и осуществляет **обмен "информацией" и энергией** между внешней средой и клеткой. Биологические мембраны содержат множество рецепторов, активация которых приводит к повышению внутриклеточной концентрации

вторичных сигнальных веществ, регулирующих клеточный метаболизм.

Биологические мембраны играют важную роль в **превращениях** осмотической и электрической **энергии**. Разность концентраций ионов во внешней и внутренней среде создает **электрохимический градиент**, энергия которого может преобразовываться в другие виды энергии: химическую (синтез АТФ), механическую (движение ресничек и жгутиков) и осмотическую.

Благодаря наличию специфических мест узнавания или изменению формы мембран в специфических местах взаимодействия клеток внешняя поверхность цитоплазматических мембран многоклеточных организмов играет важную роль в создании **межклеточных контактов**.

Многие мембраны, в силу ярко выраженной специализации клеток, обладают весьма **своеобразной структурой**. Например, **миелин**, представляющий собой изоляционную оболочку вокруг аксонов нервных клеток. Он состоит из уплощенных шванновских клеток, наложенных друг на друга. Миелин легко отделяется от других субклеточных структур, выделяемых из гомогената ткани при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Цитоплазматические мембраны миелина лишены какой-либо ферментативной и рецепторной активности. Доминирующим белковым компонентом этих мембран является структурный белок, называемый основным белком миелина.

Цитоплазматические мембраны нервных и мышечных клеток – так называемые **возбудимые мембраны** – способны передавать электрический импульс благодаря наличию каналов проницаемости для ионов. Мембранные каналы открываются при изменении потенциала на мембране. При передаче возбуждения от одного участка нервной клетки к другому сначала повышается проницаемость для ионов Na^+ , которые входят в клетку, а затем – для ионов K^+ , выходящих наружу. За счет такого движения ионов генерируется потенциал действия.

Таким образом, процессы, протекающие в клеточной мембране и определяющие ее функциональное назначение, имеют строго определенное направление (**векторность**), которое осуществляется благодаря сложной молекулярной структуре биомембран.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какова функция белков-каналоформеров?
2. Перечислите механизмы транспорта вещества через мембраны.
3. В чем заключается векторность мембранных процессов?

7. ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ ЛИПИДОВ В БИОМЕМБРАНАХ

Принципиальное отличие твердого тела и жидкости заключается в наличии или отсутствии дальнего порядка и в том, какое время молекулы вещества проводят вблизи положений равновесия между перескоками. Время оседлой жизни молекулы в жидкости много меньше, чем в твердом теле.

Липидные бислоиные мембраны при физиологических условиях – жидкие, время оседлой жизни фосфолипидных молекул в мембране мало: $\tau \approx 10^{-7} - 10^{-8}$ с. Вместе с тем, молекулы в мембране размещены не беспорядочно, в их расположении наблюдается дальний порядок. Фосфолипидные молекулы находятся в двойном слое, а их гидрофобные хвосты приблизительно параллельны друг другу. Есть порядок и в ориентации полярных гидрофильных голов.

Физическое состояние, при котором есть дальний порядок во взаимной ориентации и расположении молекул, но агрегатное состояние жидкое, называется *жидкокристаллическим* состоянием.

Жидкие кристаллы могут образовываться не во всех веществах, а в веществах из "длинных молекул" (поперечные размеры которых меньше продольных). Могут быть различные жидкокристаллические структуры (рисунок 14(б,в,г)): *нематическая* (нитевидная), когда длинные молекулы ориентированы параллельно друг другу (рисунок 14(б)); *смектическая* (мылообразная) – молекулы параллельны друг другу и располагаются слоями (рисунок 14(в)); *холестерическая* – молекулы располагаются параллельно друг другу в одной плоскости, но в разных плоскостях ориентации молекул разные (повернуты на некоторый угол в одной плоскости относительно другой) (рисунок 14(г)) [9].

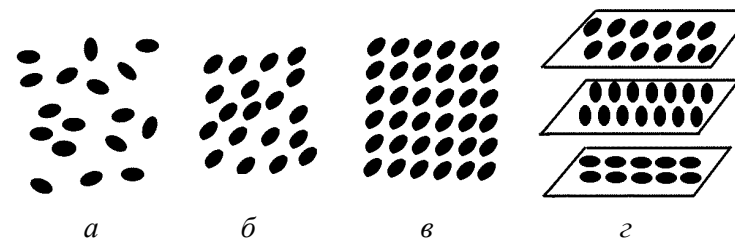


Рисунок 14 – Схема расположения молекул: *а* – в аморфной фазе, *б* – в нематическом жидкокристаллическом состоянии, *в* – в смектическом жидкокристаллическом состоянии, *г* – в холестерическом жидкокристаллическом состоянии

Бислоиная липидная фаза биологических мембран соответствует *смектическому* (рисунок 14(в)) жидкокристаллическому состоянию.

Жидкокристаллические структуры чувствительны к изменению температуры, давления, химического состава, к наличию электрического поля. Это определяет динамичность липидных бислоиных мембран – изменение их структуры при различных, даже небольших изменениях внешних условий или химического состава. При изменении условий бислоиная мембрана может перейти в другое фазовое состояние.

Различными физическими методами исследования – дилатометрией (измерение коэффициента объемного расширения) и калориметрией (измерение теплоемкости), методом рентгеноструктурного анализа и пр. – показано, что липидная часть биологических мембран при определенных температурах испытывает *фазовый переход первого рода*. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, радиоспектроскопии, флуоресцентного анализа, инфракрасной спектроскопии и др. в фосфолипидной мембране при понижении температуры происходит *переход из жидкокристаллического в гель-состояние*, которое условно иногда называют твердокристаллическим (рисунок 15).

В гель-состоянии молекулы расположены *еще более упорядочено*, чем в жидкокристаллическом. Все гидрофобные углеводородные хвосты фосфолипидных молекул в гель-фазе полностью вытянуты строго параллельно друг другу (имеют полностью *транс*-конформацию). В

жидком кристалле за счет теплового движения возможны *транс-гош*-переходы, хвосты молекул изгибаются, их параллельность друг другу в отдельных местах нарушается, причем особенно сильно в середине мембраны [11]. Это приводит к тому, что толщина мембраны в гель-фазе больше, чем в жидком кристалле (рисунок 15).

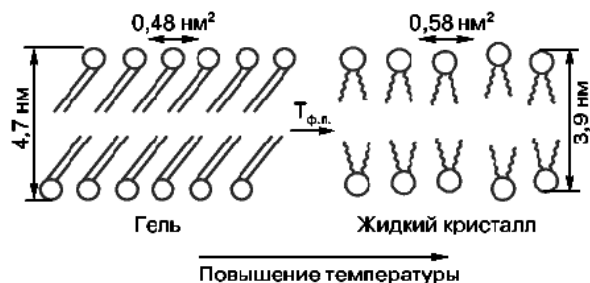


Рисунок 15 – Изменение структуры мембраны при переходе из жидкокристаллического в гель-состояние и обратно при изменении температуры

При переходе из твердого в жидкокристаллическое состояние объем мембраны несколько увеличивается, поскольку значительно увеличивается площадь мембраны, приходящаяся на одну молекулу (от $0,48 \text{ nm}^2$ до $0,58 \text{ nm}^2$). Так как в твердокристаллическом состоянии больше порядок, чем в жидком кристалле, ему соответствует меньшая энтропия.

Для нормального функционирования мембрана должна быть в жидкокристаллическом состоянии. Поэтому в живых системах при продолжительном понижении температуры окружающей среды наблюдается *адапционное изменение* химического состава мембран, обеспечивающее понижение температуры фазового перехода.

Температура фазового перехода понижается при увеличении числа ненасыщенных связей в жирно-кислотных хвостах. В хвосте молекулы может быть до четырех ненасыщенных связей. В зависимости от химического состава липидных мембран температура фазового перехода гель–жидкий кристалл может меняться от -20°C (для мембран из ненасыщенных липидов) до $+60^\circ\text{C}$ (для насыщенных липидов).

У микроорганизмов, растительных и животных клеток наблюдается увеличение числа ненасыщенных липидов в мембране при понижении температуры обитания. Характерный пример приспособления клеточных мембран к температурным условиям – изменение температуры фазового перехода (за счет изменения химического состава мембранных липидов) ноги полярного оленя. Температура вдоль ноги полярного оленя от копыта до туловища может зимой меняться от -20°C до $+30^\circ\text{C}$. Клеточные мембраны у дистальной части ноги оленя содержат больше ненасыщенных фосфолипидов.

Предполагается, что *первичный механизм криповреждений* (повреждений при охлаждениях) биологических мембран связан с фазовым переходом в гель-состояние. Поэтому биологические мембраны содержат большое количество холестерина, уменьшающего изменения в мембране, сопровождающие фазовый переход. Так, у некоторых микроорганизмов биологические мембраны находятся при температурах, лишь немного превышающих температуру фазовых переходов липидов.

Мембрана содержит десятки разных липидов, которым соответствуют разные температуры фазового перехода, в том числе близкие к физиологическим. При понижении температуры в мембране происходят фазовые превращения в липидном бислое. При фазовых переходах из гель- в жидкокристаллическое состояние и обратно в липидном бислое образуются сквозные каналы, радиусом $\sim 2 \text{ nm}$, по которым через мембрану могут переноситься ионы и низкомолекулярные вещества. Вследствие этого при температуре фазового перехода *резко увеличивается ионная проводимость* мембраны.

Увеличение ионной проводимости мембран может спасти клетку от криповреждений за счет увеличения выхода из клетки воды и солей, что препятствует кристаллизации воды внутри клетки.

Повышение ионной проводимости мембран при фазовом переходе, возможно, позволяет поддерживать метаболический обмен некоторых микроорганизмов. Большой интерес представляет этот эффект для объяснения термо- и хеморецепции.

Перенос ионов через мембрану лежит в основе формирования биопотенциалов, изменение ионной проводимости обуславливает нервный

импульс. Не исключено, что нервный импульс, свидетельствующий о понижении или повышении температуры, образуется за счет изменения ионной проницаемости липидного бислоя при фазовом переходе мембранных липидов.

Некоторые виды хеморецепции также могут быть связаны с фазовым переходом мембранных липидов, поскольку фазовый переход может быть вызван не только изменением температуры, но и изменением химического состава окружающей среды. Например, при данной температуре фазовый переход из жидкокристаллического состояния в гель-состояние может быть вызван увеличением концентрации Ca^{2+} в физиологическом диапазоне от 1 до 10 ммоль/л в водном растворе, окружающем мембрану.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какое состояние конденсированного вещества называется жидкокристаллическим? Перечислите различные возможные жидкокристаллические структуры.
2. Охарактеризуйте фазовый переход из жидкокристаллического в гель-состояние.
3. Какие особенности строения биомембран защищают их от криоповреждений?

8. МОДЕЛЬНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

Липосомы, или фосфолипидные везикулы (пузырьки), получают обычно при набухании сухих фосфолипидов в воде или при впрыскивании раствора липидов в воду. При этом происходит самосборка бимолекулярной липидной мембраны (рисунок 6). Минимуму энергии Гиббса отвечает замкнутая сферическая *одноламеллярная форма* мембраны. При этом все неполярные гидрофобные хвосты находятся внутри мембраны и ни один из них не соприкасается с полярными молекулами воды. Однако чаще получаются несферические *многоламеллярные* липосомы, состоящие из нескольких бимолекулярных слоев, – *многослойные липосомы*. Бимолекулярные слои многослойной липосомы разделены водной средой. Толщина липидных слоев составляет,

в зависимости от природы липидов, 6,5–7,5 нм, а расстояние между ними – 1,5–2 нм. Диаметр многослойных липосом колеблется в пределах от 60 нм до 400 нм и более.

Однослойные липосомы можно получить различными методами, например, из суспензии многослойных липосом, если обработать их ультразвуком. Диаметр однослойных липосом, полученных этим методом, составляет 25–30 нм. Разработаны и другие методы получения однослойных липосом, в том числе диаметром до 400 нм и более.

Липосомы служат моделью для исследований различных свойств клеточных биомембран, поскольку они представляют собой в некотором роде прообраз клетки. Липосомы активно используют в медицине. Лекарственный препарат помещают внутрь липосомы и используют ее как фосфолипидную микрокапсулу для доставки лекарства в определенные органы и ткани. Липосомы не токсичны (при правильном подборе липидов), полностью усваиваются организмом, способны преодолевать некоторые биологические барьеры.

Так, например, инсулин, заключенный в липосому, защищен от действия пищеварительных ферментов. В настоящее время выясняется возможность вводить этот препарат в липосомах перорально, что может избавить больных диабетом от необходимости систематических уколов.

В последние годы проводятся работы по разработке методов липосомальной терапии опухолей, ферментативной недостаточности, атеросклероза. Изучается возможность адресной доставки лекарственного препарата, заключенного в липосомах, к больному органу или даже к больному участку (в частности, к пораженному участку сердца). Для этого к липосоме присоединяется белковая молекула-антитело к соответствующему мембранному антигену органа-мишени. Липосомы с током крови разносятся по всему организму и задерживаются, оказавшись около органа-мишени.

Плоские бислойные липидные мембраны – другой тип модельных мембран. Такие мембраны получают на маленьких отверстиях диаметром около 1 мм в пластинке из пластика (например, фторопласта), погруженной в водную среду (рисунок 16).

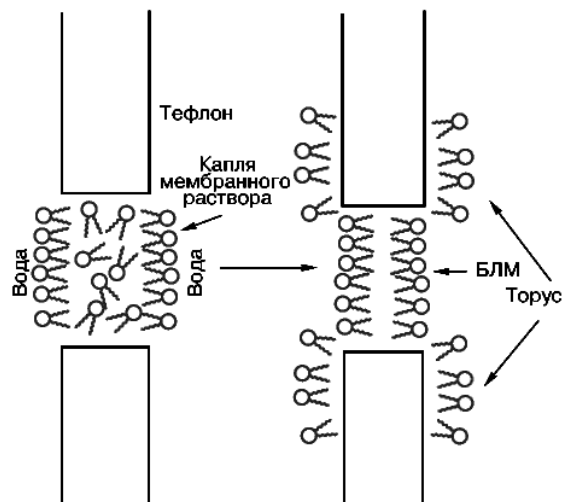


Рисунок 16 – Образование плоской бислоевой липидной мембраны по методу Мюллера

На отверстие наносят каплю раствора липида (в спирте, хлороформе, гептане или других растворителях). Растворитель диффундирует из раствора в воду, и на отверстии остается пленка липида. Эта пленка самопроизвольно утончается до тех пор, пока не образуется бимолекулярный слой толщиной около 6 нм. Лишний липид собирается в виде ободка-торуса у краев отверстия.

Плоские липидные мембраны, наряду с липосомами, широко используются в качестве модельных систем для изучения, например, электрических свойств мембран или их проницаемости. С помощью модельных мембран изучают ряд функций биологических мембран, в том числе, барьерную (например, селективность проницаемости – хорошую проницаемость для воды и плохую для ионов). Вводя в модельную мембрану молекулы-переносчики можно моделировать процессы биологического транспорта.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем отличие одноламеллярных и многоламеллярных липосом?
2. Как используют липосомы в медицине?

3. Опишите метод получения плоской бислоевой липидной мембраны.

9. ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ

Со времен изобретения оптического микроскопа и открытия клеточной структуры биологических объектов с развитой эндоплазматической сетью различают два вида эндоплазматического ретикулума: *гладкий* эндоплазматический ретикулум с гладкой поверхностью и *шероховатый* эндоплазматический ретикулум, к поверхности которого прикреплены нуклеопротеиновые частицы – рибосомы. В клетке эндоплазматический ретикулум представляет собой уплощенные мешочки (цистерны), пузырьки и трубочки, сообщающиеся друг с другом (рисунок 17).

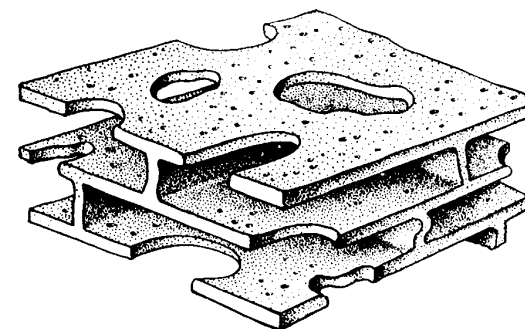


Рисунок 17 – Эндоплазматический ретикулум

Шероховатый эндоплазматический ретикулум состоит из большого числа цистерн, расположенных параллельно друг другу и связанных друг с другом так, что в клетке создается система коммуникаций, по которой синтезируемые на мембранах эндоплазматического ретикулума продукты могут транспортироваться либо в другие части клетки, либо наружу.

В рибосомах, прикрепленных к мембранам эндоплазматического ретикулума в клетках печени и секреторных клетках поджелудочной железы, осуществляется синтез белков из аминокислот. В клетках печени поверхность эндоплазматического ретикулума может достигать 11 м²/мл,

что соответствует высокой метаболической активности данного вида мембран. Как в клетках прокариот, так и в клетках эукариот рибосомы, в которых осуществляется трансляция, состоят из двух нуклеопротеиновых субъединиц: большой и малой (рисунок 18).

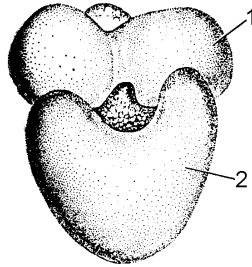


Рисунок 18 – Рибосома: 1 – малая субъединица; 2 – большая субъединица

На рисунке 19 изображена схема биосинтеза белка, протекающего в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме. На его поверхности расположены белки – рецепторы рибосом, функция которых заключена в связывании рибосом с эндоплазматическим ретикулумом.

Синтез полипептидных цепей всегда начинается с метионина (у микроорганизмов – N-формилметионина), которому соответствует триплет нуклеотидов (кодон) АУГ в молекуле мРНК. Затем полипептидная цепь удлиняется и выходит из рибосомы через поры, образованные рецепторным белком, попадая в цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума. Там от полипептидной цепи отщепляется N-концевой метионин и самопроизвольно формируются структуры высших порядков (вторичная и четвертичная). Далее белки транспортируются в составе пузырьков в аппарат Гольджи. Белки, входящие в состав эндоплазматического ретикулума и протоплазмы, не проходят через аппарат Гольджи.

В мембранах эндоплазматического ретикулума существует система транспорта электронов, необходимая для окисления чужеродных веществ. В клетках печени в трубчатых структурах гладкого эндоплазматического ретикулума происходит обезвреживание различных веществ, нарушающих

работу клетки. При протекании процессов детоксикации площадь мембраны гладкого эндоплазматического ретикулума увеличивается в десятки раз. В процессе детоксикации вредные вещества, как правило, плохо растворимые в воде, окисляются до водорастворимых продуктов, которые легко выводятся из организма.

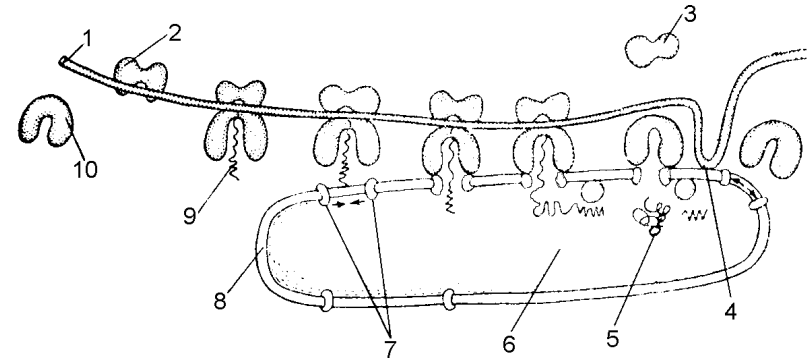


Рисунок 19 – Схема синтеза белков в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме: 1 – 5'-конец мРНК; 2 – связывание малой субъединицы рибосомы; 3 – свободная малая субъединица; 4 – связанный с эндоплазматическим ретикулумом 3'-концевой участок мРНК; 5 – вновь синтезированный белок; 6 – внутренняя полость ретикулума; 7 – белки-рецепторы рибосомы; 8 – шероховатый эндоплазматический ретикулум; 9 – сигнальный пептид; 10 – свободная большая субъединица

Одной из функций гладкого эндоплазматического ретикулума, называемого в мышечных клетках саркоплазматическим ретикулумом, является поглощение ионов кальция, которые выбрасываются в саркоплазму при сокращении мышечного волокна в ответ на стимуляцию. Гладкий эндоплазматический ретикулум сильно развит в тех клетках, которые транспортируют ионы, например в железистых клетках слизистой оболочки желудка.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем отличие гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума?

2. Перечислите основные этапы биосинтеза белков в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме.
3. Какова роль эндоплазматического ретикулума в процессах детоксикации?

10. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ БИОМЕМБРАНЫ

Транспорт веществ через биологические мембраны – это необходимое условие жизни, поскольку живые системы на всех уровнях организации являются *открытыми системами*. Процессы метаболизма клетки, биоэнергетические процессы, образование биопотенциалов, генерация нервного импульса и другие связаны с переносом веществ через мембраны. Нарушение транспорта веществ через биомембраны приводит к различным патологиям. Лечебная терапия во многих случаях требует доставку лекарственных препаратов через клеточные мембраны. Эффективность лекарственного препарата в значительной степени зависит от проницаемости для него мембраны.

Термодинамическое описание процессов транспорта веществ через биомембраны базируется на использовании понятия *электрохимического потенциала*.

Химическим потенциалом данного вещества μ_k называется величина, численно равная энергии Гиббса, приходящаяся на один моль этого вещества. В конденсированных средах термодинамические потенциалы энергия Гиббса и свободная энергия Гельмгольца считаются неразличимыми, их называют свободной энергией и обозначают G . Математически химический потенциал определяется как частная производная от свободной энергии G по количеству k -го вещества, при постоянстве температуры T , давления p и количеств всех других веществ $m_l (l \neq k)$:

$$\mu_k = \left(\frac{\partial G}{\partial m_k} \right)_{p, T, m_{l \neq k}}$$

Для разбавленного раствора вещества концентрации c

$$\mu = \mu_0 + RT \ln c,$$

где μ_0 – стандартный химический потенциал, численно равный химическому потенциалу данного вещества при его концентрации 1 моль/л в растворе.

Электрохимический потенциал $\tilde{\mu}$ – величина, численно равная свободной энергии одного моля данного вещества, помещенного в электрическом поле. Для разбавленных растворов

$$\tilde{\mu} = \mu_0 + RT \ln c + zF\phi,$$

где $F = 96500$ Кл/моль – число Фарадея, z – заряд иона электролита (в элементарных единицах заряда), ϕ – потенциал электрического поля, T [К] – температура.

Транспорт веществ через биологические мембраны можно разделить на два основных типа: пассивный и активный.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какие биологические процессы связаны с транспортом веществ через биомембраны?
2. Дайте определение химического потенциала.
3. В чем отличие электрохимического от химического потенциала?

11. ПАССИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

Пассивный транспорт – это перенос вещества из мест с большим значением электрохимического потенциала к местам с его меньшим значением $\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$ (рисунок 20).

Пассивный транспорт идет с уменьшением энергии Гиббса, и поэтому этот процесс является самопроизвольным.

Плотность потока вещества j_m при пассивном транспорте описывается *уравнением Теорелла*

$$j_m = -Uc \frac{d\tilde{\mu}}{dx},$$

где U – подвижность частиц, c – концентрация. Знак минус показывает, что перенос происходит в сторону убывания $\tilde{\mu}$. Плотность потока вещества j_m – это величина численно равная количеству вещества, перенесенного за

единицу времени через единицу площади поверхности, перпендикулярной направлению переноса

$$j_m = \frac{m}{S \cdot t} \left[\frac{\text{МОЛЬ}}{\text{М}^2 \text{С}} \right].$$

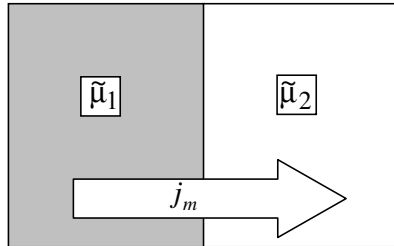


Рисунок 20 – Схема пассивного транспорта

Подставим в последнее соотношение выражение для электрохимического потенциала. Полученное уравнение (для разбавленных растворов при $\mu_0 = const$) называется **уравнением Нернста-Планка**

$$j_m = -URT \frac{dc}{dx} - UczF \frac{d\phi}{dx},$$

которое определяет две причины переноса вещества при пассивном транспорте: (1) градиент концентрации $\left(\frac{dc}{dx}\right)$ и (2) градиент электрического потенциала $\left(\frac{d\phi}{dx}\right)$. Знаки минусов перед градиентами показывают, что градиент концентрации вызывает перенос вещества от мест с большей концентрацией к местам с его меньшей концентрацией; а градиент электрического потенциала вызывает перенос положительных зарядов от мест с большим к местам с меньшим потенциалом.

В отдельных случаях, **вследствие сопряжения** этих двух причин, **может происходить** пассивный перенос вещества от мест с меньшей концентрацией к местам с большей концентрацией, если второй член уравнения Нернста-Планка по модулю больше первого.

Аналогично **может происходить** перенос вещества от мест с меньшим потенциалом к местам с большим потенциалом, если первый член уравнения Нернста-Планка по модулю больше второго.

В случае неэлектролитов ($z=0$) или отсутствия электрического поля ($\frac{d\phi}{dx}=0$) уравнение Теорелла переходит в уравнение:

$$j_m = -URT \frac{dc}{dx}.$$

Сравнивая уравнение Теорелла с законом Фика

$$j_m = -D \frac{dc}{dx},$$

получаем выражение для коэффициента диффузии $D = URT$.

На рисунке 21 представлены основные виды пассивного транспорта через мембрану, а на рисунке 22 – основные разновидности простой диффузии через мембрану.

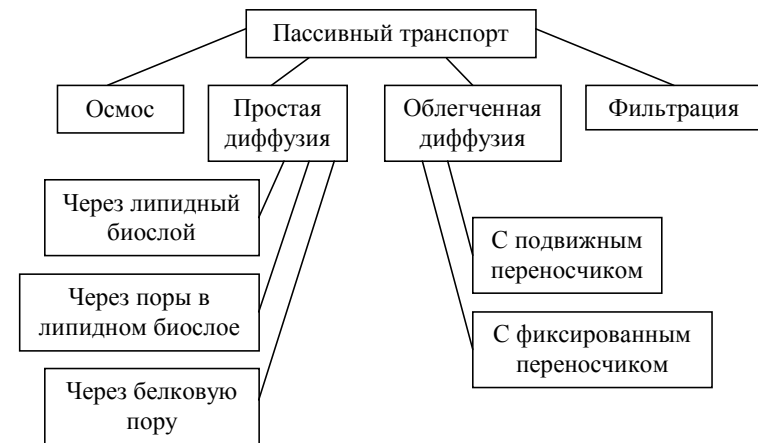


Рисунок 21 – Классификация видов пассивного транспорта

Диффузия – самопроизвольное перемещение вещества из мест с большей концентрацией в места с меньшей концентрацией вещества

вследствие хаотического теплового движения молекул. Диффузия вещества через липидный бислой (рисунок 22(а)) [12] вызывается градиентом концентрации в мембране. По закону Фика

$$j_m = -D \text{grad} c \approx -D \frac{c_2^M - c_1^M}{l} = D \frac{c_1^M - c_2^M}{l},$$

где c_1^M – концентрация вещества в мембране около одной ее поверхности и c_2^M – около другой, l – толщина мембраны.

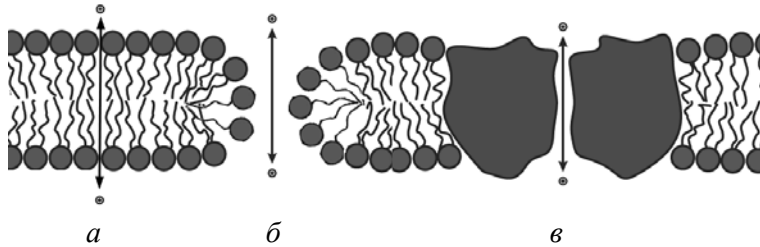


Рисунок 22 – Основные разновидности простой диффузии через мембрану: а – через липидный бислой, б – через пору в липидном бислое, в – через белковую пору

Считаем, что градиент концентрации приблизительно равен $\frac{c_2^M - c_1^M}{l}$, (рисунок 23).

Так как измерить концентрации c_1^M и c_2^M трудно, на практике пользуются формулой, связывающей плотность потока вещества через мембрану с концентрациями этого вещества не внутри мембраны, а снаружи в растворах около поверхностей мембраны, c_1 и c_2 (рисунок 23):

$$j_m = P(c_1 - c_2)$$

где P – коэффициент проницаемости мембраны. Размерность коэффициента проницаемости – м/с.

Коэффициент проницаемости мембраны зависит от свойств мембраны и переносимых веществ. Если считать концентрации вещества у поверхности в мембране прямо пропорциональными концентрациям у поверхности вне мембраны, $c_1^M = kc_1$, $c_2^M = kc_2$, то

$$j_m = \frac{Dk}{l}(c_1 - c_2).$$

Величина k носит название *коэффициента распределения*, который показывает соотношение концентрации вещества вне мембраны и внутри ее.

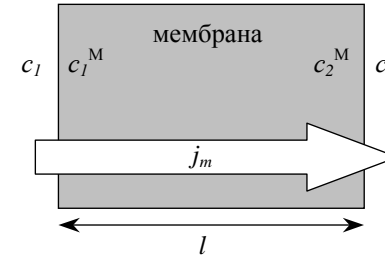


Рисунок 23 – Схема простой диффузии через липидный бислой мембраны

Коэффициент проницаемости

$$P = \frac{Dk}{l}$$

тем больше, чем больше коэффициент диффузии (чем меньше вязкость мембраны), чем тоньше мембрана и чем лучше вещество растворяется в мембране (чем больше k).

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите уравнения Теорелла и Нернста-Планка.
2. Перечислите виды пассивного транспорта.
3. Охарактеризуйте основные виды простой диффузии через мембрану.

12. ДИФФУЗИЯ ПОЛЯРНЫХ МОЛЕКУЛ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

В фосфолипидной фазе мембраны хорошо растворимы неполярные вещества, например органические жирные кислоты, эфиры. Эти вещества хорошо проникают через липидную фазу мембраны. Плохо проходят через

липидный бислоем полярные, водорастворимые вещества: соли, основания, сахара, аминокислоты, спирты.

На этом фоне представляется необъяснимым аномально большое значение коэффициента проницаемости липидной мембраны для воды. В последнее время проникновение через липидные бислоиные мембраны мелких полярных молекул связывают с **образованием** между жирнокислотными хвостами фосфолипидных молекул при их тепловом движении небольших свободных полостей – **кинков** (от англ. *kink* – петля), образованных *гош-транс-гош*-конфигурацией липидных молекул (рисунок 24) [10].

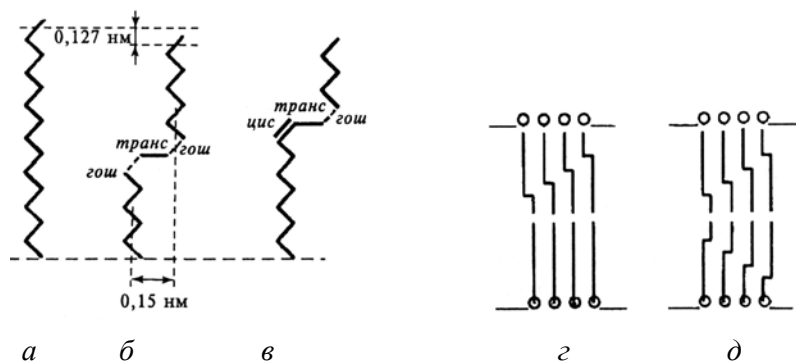


Рисунок 24 – Схема углеводородных цепей: *а* – в полностью *транс*-конфигурации; *б* – в *гош-транс-гош*-конфигурации; *в* – в *цис-транс-гош*-конфигурации; кинк-блоки в углеводородных цепях мембран: *г* – в одном полуслое, *д* – в двух слоях липидного бислоя

Гош-конформации (*гош* (+) и *гош* (–), 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 12–17 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 $\sim 120^\circ$.

В плотно упакованных мембранных системах с полностью *транс*-конформацией углеводородных цепей это искривление порождает серьезные **стерические** затруднения, делающие невозможным появление одиночных *гош*-конформаций.

Уменьшение стерических затруднений при плавлении углеводородных цепей в мембранах достигается при синхронном появлении в цепи сразу двух *гош*-конфигураций (*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 $+120^\circ$ и -120° пространственная конфигурация цепи в целом сохраняется прямолинейной (рисунок 24).

Участок цепи, находящийся в *гош*(+)-*транс-гош*(–)-конформации, формирует уступ или петлю в углеводородной цепи – **кинк**. 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 (рисунок 19).

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** (рисунок 24). 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**.

Вследствие теплового движения хвостов кинки могут перемещаться поперек мембраны и **переносить** попавшие в них мелкие молекулы, в первую очередь молекулы воды.

Двойные (*цис*-) связи в жирнокислотных ненасыщенных цепях (рисунок 24(в)) мембран могут играть **роль инициаторов** 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, что хорошо согласуется с экспериментально наблюдаемым резким снижением $T_{ФП}$ мембран из насыщенных липидов при добавлении к ним небольших количеств ненасыщенных жирнокислотных цепей.

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

Для оценки эффективности этих процессов сравним частоту крутильных колебаний вокруг С–С связей $6 \div 8 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$ с частотой возникновения *gош*-конформаций при комнатной температуре.

Полагая, что величина барьера, отделяющего *транс*- от *gош*-конформаций, равна 12 кДж/моль, находим $v = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT}\right) \approx 10^{10} \text{ с}^{-1}$.

Отсюда следует, что *gош*-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 смещение в соседнее положение кинк передвигается на ~ 13 нм. Такое *перемещение* кинка вдоль углеводородной цепи можно рассматривать как своеобразную *одномерную диффузию*, которую можно охарактеризовать коэффициентом диффузии $D_K = 0,5v_K(\Delta L)^2$, где v_K – частота скачка кинка, ΔL – шаг одного скачка. Полагая, что частота скачка кинка по порядку величины соответствует частоте появления *gош*-конформаций, находим $D_K \approx 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$. 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.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Каким образом мелкие полярные молекулы диффундируют через мембрану?
2. Что такое кинки и кинк-блоки в липидных мембранах?
3. Каким образом кинки переносят молекулы воды через мембрану?

13. ДИФФУЗИЯ ГИДРАТИРОВАННЫХ ИОНОВ

Молекулы нерастворимых в липидах веществ и водорастворимые гидратированные ионы (окруженные молекулами воды) проникают сквозь биомембрану через липидные и белковые поры (рисунок 22(б,в)). Для нерастворимых в липидах веществ и ионов мембрана выступает как молекулярное сито – чем больше размер молекулы, тем меньше проницаемость мембраны для этого вещества.

Наличие в биомембране набора пор определенного радиуса, соответствующих размеру проникающей частицы, обеспечивает избирательность переноса через мембрану. Распределение в этом наборе пор определенного радиуса зависит от мембранного потенциала. Так, избирательные для ионов калия поры в мембране эритроцитов имеют сравнительно низкий коэффициент проницаемости, равный 4 пм/с при мембранном потенциале 80 мВ. Коэффициент проницаемости уменьшается в четыре раза с понижением потенциала до 40 мВ.

Проницаемость, например, мембраны аксона кальмара для ионов калия при уровне потенциала возбуждения определяется калиевыми каналами, радиус которых численно оценивается как сумма кристаллического радиуса иона калия и толщины одной гидратной оболочки ($0,133 \text{ нм} + 0,272 \text{ нм} = 0,405 \text{ нм}$). Необходимо отметить, что селективность ионных каналов неабсолютна, каналы доступны и для других ионов, но с меньшими значениями P (таблица 2).

Таблица 2 – Относительные проницаемости для одновалентных ионов в калиевом канале аксона кальмара

$\frac{P_{\text{ион}}}{P_{\text{калий}}}$	Ион	Кристаллический радиус, нм
0,018	Литий	0,060
0,010	Натрий	0,095
1,000	Калий	0,133
0,910	Рубидий	0,148
0,077	Цезий	0,169

Максимальная величина P соответствует ионам калия (таблица 2). Ионы с большими кристаллическими радиусами (рубидий, цезий) имеют меньшие P , по-видимому, потому, что их размеры с одной гидратной оболочкой превышают размер канала. Ионы лития и натрия имеют меньший по сравнению с калием радиус, но при этом проницаемость мембраны для этих ионов ниже, чем для калия. Л.Муллинз объяснил этот эффект тем, что в растворе вне поры каждый ион имеет **гидратную оболочку**, состоящую из **трех** сферических слоев молекул воды. При вхождении в пору гидратированный ион "раздевается", теряя воду послойно. Пору будет проницаема для иона, если ее диаметр точно соответствует диаметру любой из этих сферических оболочек. Как правило, в пору ион остается с одной гидратной оболочкой. Расчет, приведенный выше, показывает, что радиус калиевой поры составит в этом случае 0,405 нм. Гидратированные ионы натрия и лития, размеры которых не кратны размерам поры, будут испытывать затруднение при прохождении через нее, что представляет собой своеобразное "квантование" гидратированных ионов по их размерам при прохождении через поры.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Каким образом осуществляется избирательность переноса через мембрану жиронерастворимых веществ и водорастворимых гидратированных ионов?

2. Какой эффект отражает квантование гидратированных ионов по их размерам при прохождении через поры?
3. В чем причина относительно низкой проницаемости биомембран для ионов натрия?

14. ОБЛЕГЧЕННАЯ ДИФфуЗИЯ

В биологических мембранах существует еще один вид диффузии – **облегченная диффузия**, которая происходит при участии **молекул переносчиков**. Пример такой молекулы – **валиномицин** – переносчик ионов калия. Молекула валиномицина имеет форму манжетки, устланной внутри полярными группами, а снаружи – неполярными (рисунок 25) [5].

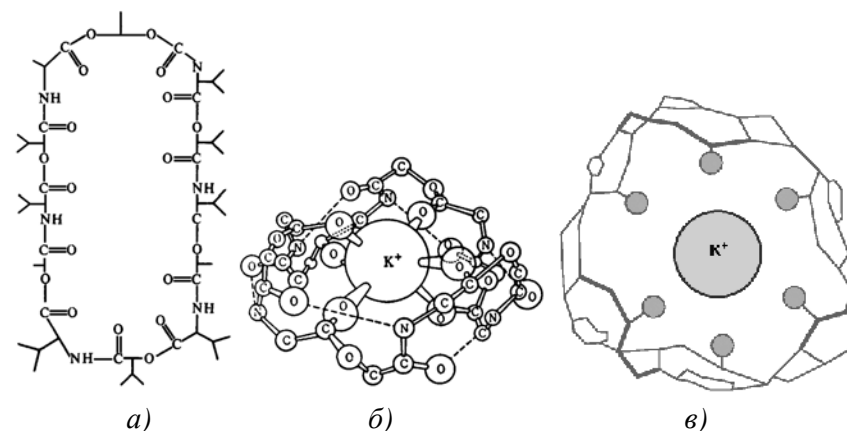


Рисунок 25 – Строение молекулы валиномицина: *a* – химическая формула молекулы валиномицина [L-лактат – L-валин – D-окси-изовалериановая кислота – D-валин]₃; *б* – ван-дер-ваальсова модель комплекса валиномицина с ионом калия, *в* – комплекс молекулы валиномицина с ионом калия (схема) – ион калия фиксируется в центре за счет ион-дипольного взаимодействия с участием карбонильных групп пептида (кружки)

В силу особенности своего химического строения валиномицин, во-первых, способен образовывать комплекс с ионами калия, попадающими внутрь молекулы-манжетки, и, во-вторых, валиномицин растворим в

липидной фазе мембраны, так как снаружи его молекула неполярна. Молекулы валиномицина, оказавшиеся у поверхности мембраны, могут захватывать из окружающего раствора ионы калия (рисунок 25(в)). Диффундируя в мембране, молекулы переносят калий через мембрану, и некоторые из них отдают ионы в раствор по другую сторону мембраны.

Перенос калия валиномицином может происходить через мембрану в обе стороны. Поэтому, если концентрации калия по обе стороны мембраны одинаковы, поток калия в одну сторону будет такой же, что и в другую, и в результате переноса калия через мембрану не будет. Но если с одной стороны концентрация калия больше, чем с другой, то поток калия в сторону уменьшения концентрации будет больше, чем в противоположную.

Облегченная диффузия, таким образом, происходит от мест с большей концентрацией переносимого вещества к местам с меньшей концентрацией. По-видимому, облегченной диффузией объясняется также перенос через биологические мембраны аминокислот, сахаров и других биологически важных веществ.

Отличия облегченной диффузии от простой:

- перенос вещества с участием переносчика происходит **значительно быстрее**;
- облегченная диффузия обладает **свойством насыщения** (рисунок 26) – при увеличении концентрации с одной стороны мембраны плотность потока вещества возрастает лишь до некоторого предела, когда все молекулы переносчика уже заняты;
- при облегченной диффузии наблюдается **конкуренция переносимых веществ** в тех случаях, когда переносчиком переносятся разные вещества; при этом одни вещества переносятся лучше, чем другие, и добавление одних веществ затрудняет транспорт других; так, из сахаров глюкоза переносится лучше, чем фруктоза, фруктоза лучше, чем ксилоза, а ксилоза лучше, чем арабиноза, и т.д.;
- есть вещества, **блокирующие** облегченную диффузию – они образуют прочный комплекс с молекулами переносчика, например, флоридзин подавляет транспорт сахаров через биологическую мембрану.

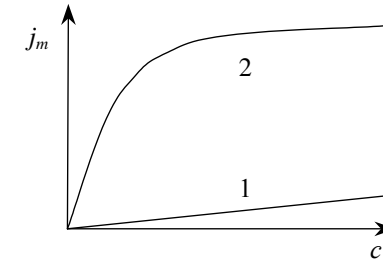


Рисунок 26 – Зависимость плотности потока j_m веществ через биологическую мембрану в клетку в зависимости от концентраций c этих веществ во внеклеточной среде при простой (1) и облегченной (2) диффузии

Если транспорт какого-либо вещества через биологическую мембрану обладает этими особенностями, можно сделать предположение, что имеет место облегченная диффузия.

Разновидностью облегченной диффузии является транспорт с помощью неподвижных молекул-переносчиков, фиксированных определенным образом поперек мембраны. При этом молекула переносимого вещества передается от одной молекулы переносчика к другой, образуя своеобразный молекулярный конвейер.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какова роль молекул-переносчиков в облегченной диффузии?
2. Каким образом молекула валиномицина облегчает транспорт ионов калия через мембрану?
3. Перечислите основные отличия облегченной диффузии от основной.

15. ФИЛЬТРАЦИЯ И ОСМОС. ПОРИНЫ

Фильтрацией называется движение раствора через поры в мембране под действием градиента давления. Скорость переноса при фильтрации подчиняется **закону Пуазейля**:

$$\frac{dv}{dt} = \frac{p_1 - p_2}{w},$$

где $\frac{dv}{dt}$ – объемная скорость переноса раствора, $w = \frac{8\eta h}{\pi r^4}$ – гидравлическое

сопротивление, h – толщина липидного биослоя (длина поры), r – радиус поры, η – коэффициент вязкости раствора.

Явление фильтрации играет важную роль, например, в процессах переноса воды через стенки кровеносных сосудов.

Осмоз – преимущественное движение молекул воды (или другого растворителя) через полупроницаемые мембраны (непроницаемые для растворенного вещества и проницаемые для воды) из мест с меньшей концентрацией растворенного вещества в места с большей концентрацией. Таким образом, осмос – это простая диффузия воды из мест с ее большей концентрацией в места с меньшей концентрацией воды. Осмос играет большую роль во многих биологических явлениях. Явление осмоса, например, обуславливает гемолиз эритроцитов в гипотонических растворах.

И, наконец, необходимо также упомянуть о еще одном способе транспорта веществ через биомембрану, который реализуется с помощью специфических мембранных белков.

Бактерии имеют одну, но достаточно сложно устроенную клеточную стенку. Плазматическая мембрана грамотрицательных бактерий защищена от внешней среды сетью пептидогликанов и **дополнительной наружной мембраной**. Метаболиты, которые бактериальной клетке необходимо абсорбировать или высвободить, должны иметь возможность без труда пересекать наружную мембрану.

Для обеспечения процесса переноса у бактерий имеются трансмембранные **каналообразующие белки**, так называемые **порины**. Эти белки-тримеры образуют поры, заполненные водой и проницаемые для молекул с молекулярной массой до 600 Да. В высших организмах пориноподобные белки найдены в мембранах митохондрий и хлоропластов.

На рисунке 27 представлена схема **бактериального порина**, находящегося в наружной мембране бактерии *Rhodospseudomonas blastica* [8].

Этот порин построен из шестнадцати β -форм вторичных структурных сегментов полипептидной белковой цепи, которые образуют

цилиндрическую пору – пассивный канал **во внешней мембране бактерии**. Пора проходит по оси такого цилиндра.

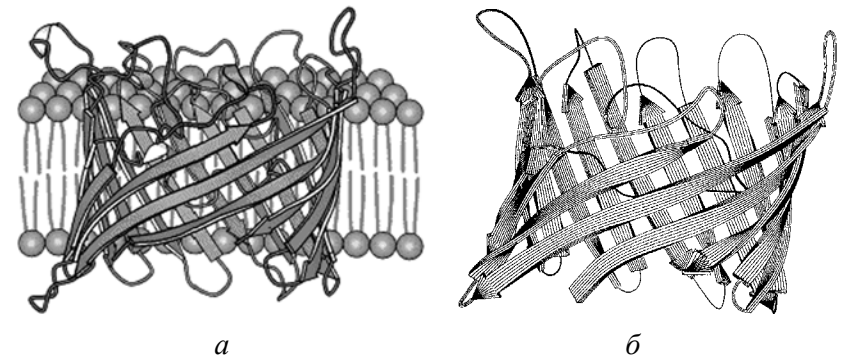


Рисунок 27 – Структура бактериального порина *Rhodospseudomonas blastica*: *a* – интегрированный в биомембрану порин, *б* – пространственное расположение шестнадцати β -форм вторичных структурных сегментов белковой цепи порина

Аминокислотная последовательность белковой цепи порина пространственно организована таким образом, что **внешняя** "поверхность" порина, интегрированная в биомембрану, – **гидрофобна**, а **внутренняя** поверхность канала – **гидрофильна**, и канал заполнен водой.

Поры в биомембранах, формируемые поринами, принципиально отличны от липидных пор, которые фактически являются структурными дефектами липидного бислоя. Подробно такого рода дефекты будут рассмотрены ниже.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Что называется фильтрацией?
2. Запишите закон Пуазейля.
3. Дайте определение осмоса.
4. Какова функция поринов?
5. Чем отличаются внутренняя и внешняя поверхность порина бактерии *Rhodospseudomonas blastica*?

16. АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ

Активный транспорт – это перенос вещества из мест с меньшим значением электрохимического потенциала $\tilde{\mu}_2$ в места с его большим значением $\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$ (рисунок 28).

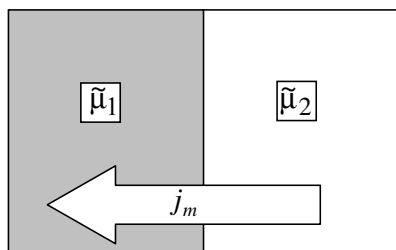


Рисунок 28 – Схема активного транспорта

Активный транспорт в биомембране сопровождается повышением энергии Гиббса, он не может идти самопроизвольно. Активный транспорт возможен **только в сопряжении** с процессом гидролиза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), то есть за счет затраты энергии, запасенной в макроэргических связях АТФ.

Роль активного транспорта веществ через биологические мембраны состоит в том, что за счет активного транспорта в организме создаются градиенты концентраций, градиенты электрических потенциалов, градиенты давления и т.д., поддерживающие жизненные процессы, то есть с точки зрения термодинамики активный перенос веществ удерживает организм в неравновесном состоянии, поддерживает жизнь.

Существование активного транспорта веществ через биологические мембраны впервые было доказано в **опытах Уссинга** (1949 г.) на примере переноса ионов натрия через кожу лягушки (рисунок 29) [9].

Экспериментальная камера Уссинга, заполненная нормальным раствором Рингера, была разделена на две части свежеизолированной кожей лягушки. На рисунке 29 слева – наружная мукозная поверхность кожи, справа – внутренняя серозная. Наблюдались потоки ионов натрия

через кожу лягушки: слева направо от наружной к внутренней поверхности и справа налево от внутренней к наружной поверхности.

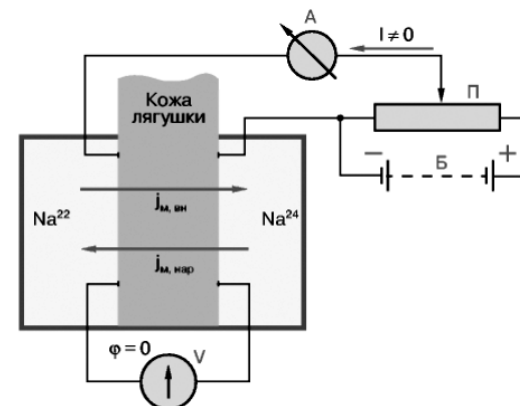


Рисунок 29 – Схема опытов Уссинга (А – амперметр, V – вольтметр, Б – батарейка, П – потенциометр)

Из уравнения Теорелла, описывающего пассивный транспорт, следует **уравнение Уссинга–Теорелла** для отношения этих потоков в случае пассивного транспорта:

$$\frac{j_{m, \text{вн}}}{j_{m, \text{нар}}} = \frac{c_{\text{нар}}}{c_{\text{вн}}} \cdot \exp\left(\frac{zF\Delta\phi}{RT}\right).$$

На коже лягушки, разделяющей раствор Рингера, возникает разность потенциалов ($\Delta\phi = \phi_{\text{вн}} - \phi_{\text{нар}}$) – внутренняя сторона кожи имеет положительный потенциал по отношению к наружной. В установке Уссинга (рисунок 29) имелся блок компенсации напряжения, с помощью которого устанавливалась разность потенциалов на коже лягушки, равная нулю, что контролировалось вольтметром.

Кроме того, поддерживалась одинаковая концентрация ионов с наружной и внутренней стороны $c_{\text{нар}} = c_{\text{вн}}$. При этих условиях, если бы перенос натрия через кожу лягушки определялся только пассивным транспортом, то согласно уравнению Уссинга–Теорелла потоки $j_{m, \text{вн}}$ и

$j_{m,нар}$ были бы равны друг другу. Суммарный поток через мембрану был бы равен нулю. Однако было обнаружено, что в условиях опыта (отсутствие градиентов электрического потенциала и концентрации) через кожу лягушки течет электрический ток I от внешней среды к внутренней, следовательно, происходит односторонний перенос заряженных частиц.

Методом меченых атомов было показано, что поток натрия внутрь больше потока наружу $j_{m,вн} > j_{m,нар}$. Для этого в левый раствор экспериментальной камеры были включены радиоактивные изотопы Na^{22} , а в правый – Na^{24} . Изотоп Na^{22} распадается с излучением жестких γ -квантов. Распад Na^{24} сопровождается мягким β -излучением. Регистрация γ и β -излучения показала, что поток Na^{22} **больше** потока Na^{24} .

Эти экспериментальные данные неопровержимо свидетельствовали о том, что перенос ионов натрия через кожу лягушки **не подчиняется** уравнению пассивного транспорта. Следовательно, имеет место активный перенос.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Что называется активным транспортом вещества через биомембрану?
2. Опишите опыт Уссинга, доказывающий существование активного переноса ионов натрия через кожу лягушки.
3. Как используют метод меченых атомов при исследовании механизмов переноса через биомембраны?

17. ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ ИОННЫЕ НАСОСЫ

Согласно современным представлениям, в биологических мембранах имеются **ионные насосы**, работающие за счет свободной энергии гидролиза АТФ, – специальные системы интегральных белков (транспортные АТФазы). В настоящее время известны три типа **электрогенных** ионных насосов, осуществляющих активный перенос ионов через мембрану (рисунок 30). Перенос ионов транспортными АТФазами происходит вследствие сопряжения процессов переноса с химическими реакциями, за счет энергии метаболизма клеток.

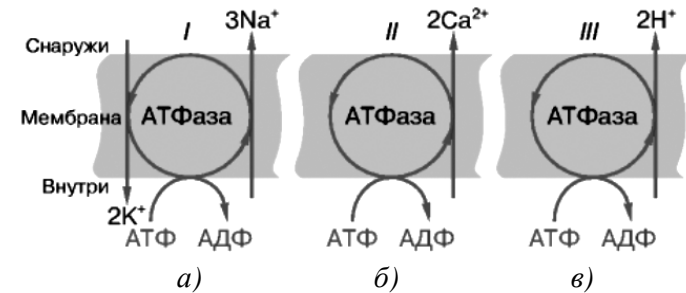


Рисунок 30 – Виды ионных насосов: а – K⁺-Na⁺-АТФаза в цитоплазматических мембранах (K⁺-Na⁺-насос); б – Ca²⁺-АТФаза (Ca²⁺-насос); в – H⁺-АТФаза в энергосопрягающих мембранах митохондрий, хлоропластов (H⁺-насос, или протонная помпа)

При работе K⁺-Na⁺-АТФазы за счет энергии, освобождающейся при гидролизе каждой молекулы АТФ, в клетку переносится два иона калия и одновременно из клетки выкачиваются три иона натрия. Таким образом, создается повышенная по сравнению с межклеточной средой концентрация в клетке ионов калия и пониженная натрия, что имеет огромное физиологическое значение. В Ca²⁺-АТФазе за счет энергии гидролиза АТФ переносятся два иона кальция, а в H⁺-помпе – два протона. Молекулярный механизм работы ионных АТФаз до конца не изучен. Тем не менее, прослеживаются основные этапы этого сложного ферментативного процесса.

Рассмотрим основные принципы работы ионных насосов на примере Ca²⁺-АТФазы **саркоплазматического ретикулума** клеток мышц (SR Ca²⁺-АТФаза) (рисунок 31). Этот фермент составляет 80% белков саркоплазматического ретикулума [8] и играет ключевую роль в реализации сокращения мышц, вследствие роста концентрации кальция в цитозоле.

И наоборот, релаксация мышц происходит вследствие уменьшения концентрации кальция в цитозоле и переносом его в саркоплазматический ретикулум (специализированный "отсек" для хранения кальция), который осуществляется Ca²⁺-АТФазой.

Этот насос позволяет снизить концентрацию кальция до 0,1 мкМ (для сравнения, концентрация кальция в саркоплазматическом ретикулуме – 1,5 мМ).

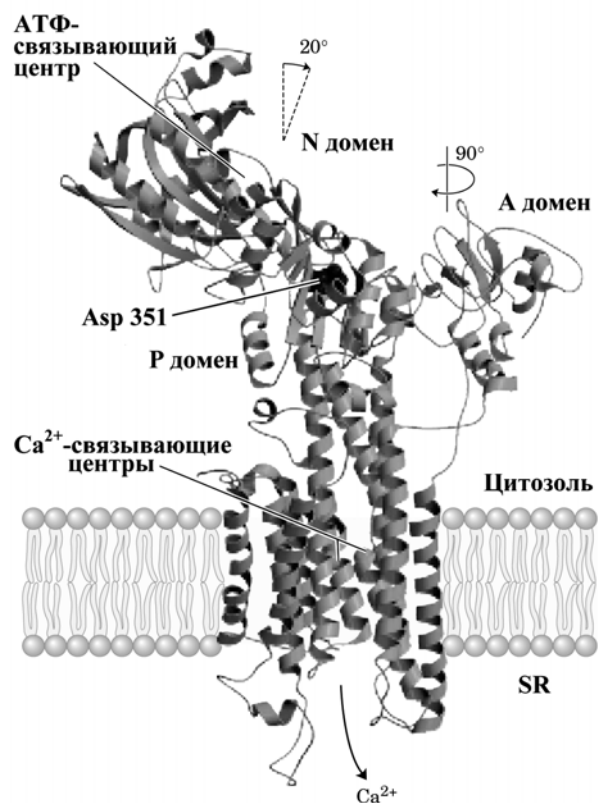


Рисунок 31 – Структура SR Ca²⁺-АТФазы

SR Ca²⁺-АТФаза – это 110 кДа полипептид, трансмембранный домен которого состоит из 10 α-спиралей. Большая цитоплазматическая часть SR Ca²⁺-АТФазы составляет приблизительно половину молекулярной массы белка и состоит из трех доменов (рисунок 31). (Дальтон (Да) = 1 а.е.м = 1,66·10⁻²⁴ г).

Три цитоплазматических домена SR Ca²⁺-АТФазы имеют различные функции. Нуклеатид-связывающий домен N связывает АТФ-нуклеотид, фосфорильный домен P принимает фосфорильную группу на аспарат Asp 351, активаторный домен А активизирует домен N.

Десять трансмембранных α-спиралей формируют канал для прохождения Ca²⁺ через мембрану. Две из этих спиралей доходят только до середины мембраны и те места, в которых белковая нить становится спиралью являются центрами связывания Ca²⁺-ионов. Пространственное положение домена А управляет сродством ионов Ca²⁺ к Ca²⁺-связывающим центрам и последующим выходом ионов кальция в цитозоль или наружу клетки в саркоплазматический ретикулум.

В исходном состоянии между центром фосфорилирования и центрами связывания Ca²⁺-ионов достаточно большое расстояние. В процессе одного транспортного цикла домен N *наклоняется* на 20° вправо (рисунок 31), перемещая АТФ-центр к Asp 351, и домен А *поворачивается* на 90° вокруг нормали к мембране. Такие *изменения конформации* молекулы приводят к перемещению Ca²⁺-связывающих центров сначала на одну сторону мембраны, а затем на другую, изменяя при этом сродство этих центров к ионам Ca²⁺ *от высокого* на цитоплазматической стороне мембраны *до низкого* на саркоплазматической стороне мембраны.

Общим для работы всех насосов является (1) фосфорилирование специфического аспартата – Asp 351 в случае SR Ca²⁺-АТФазы, (2) существование как минимум двух различных конформаций, которые мы обозначим E₁ и E₂. С учетом фосфорилирования, следовательно, существует минимум четыре конформационных состояния E₁, E₁-P, E₂-P, E₂, на основе которых можно построить общую схему работы насосов [8] (рисунок 32).

1. Реакционный цикл начинается со связывания АТФ и двух ионов Ca²⁺ с E₁-конформацией АТФазы.

2. АТФаза переносит фосфорильную группу к целевому аспартату. Кальций уже должен быть связан ферментом, чтобы могло проходить фосфорилирование. Фосфорилирование смещает конформационное равновесие АТФазы в сторону E₂-конформации.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Перечислите виды ионных насосов в биомембранах.
2. Охарактеризуйте этапы переноса ионов, сопряженных с гидролизом АТФ в Ca^{2+} -АТФазе.

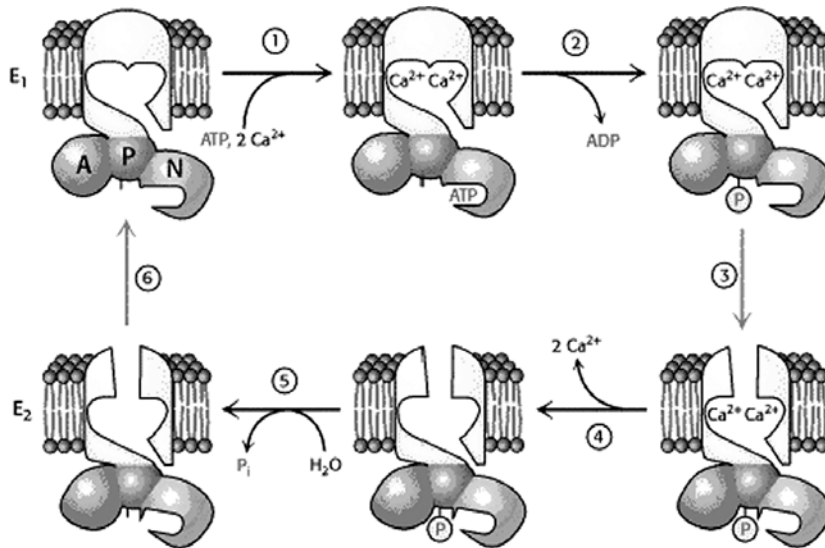


Рисунок 32 – Схема механизма действия SR Ca^{2+} -АТФазы: связывание Ca^{2+} (1) и фосфорилирование АТФазы (2) приводит к переносу (3) центров связывания с цитозольной на внешнюю сторону мембраны и высвобождению Ca^{2+} (4); гидролиз фосфоаспартата (5) и конформационный переход, переносающий центры связывания обратно на внутреннюю сторону мембраны (6), возвращает АТФазу в исходное состояние

3. Переход от E_1 к E_2 конформации приводит к "выворачиванию" ион-связывающих центров так, что диссоциация ионов кальция будет происходить уже на наружной стороне мембраны.

4. В E_2 -P конформации АТФаза имеет низкое сродство к ионам Ca^{2+} , что приводит к их высвобождению.

5. Высвобождение ионов Ca^{2+} сопровождается гидролизом фосфоаспартата и диссоциацией фосфатной группы.

6. АТФаза, лишенная ковалентно связанной фосфорильной группы, конформационно нестабильна в E_2 состоянии. Она "выворачивается обратно" в E_1 -конформацию, завершая реакционный цикл.

18. ВТОРИЧНЫЙ АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ИОНОВ

Помимо ионных насосов, рассмотренных выше, известны сходные системы, в которых накопление веществ сопряжено не с гидролизом АТФ, а с работой окислительно-восстановительных ферментов [17] или фотосинтезом. Транспорт веществ в этом случае является вторичным, опосредованным мембранным потенциалом и/или градиентом концентрации ионов при наличии в мембране специфических переносчиков. Такой механизм переноса получил название вторичного активного транспорта.

В плазматических и субклеточных мембранах живых клеток возможно одновременное функционирование первичного и вторичного активного транспорта. Примером может служить внутренняя мембрана митохондрий. Ингибирование АТФазы в ней не лишает частицу способности накапливать вещества за счет вторичного активного транспорта. Такой способ накопления особенно важен для тех метаболитов, насосы для которых отсутствуют (сахара, аминокислоты).

В настоящее время достаточно глубоко исследованы *три схемы вторичного активного транспорта*. Для простоты рассмотрен транспорт одновалентных ионов с участием молекул-переносчиков. При этом подразумевается, что переносчик в нагруженном или ненагруженном состоянии одинаково хорошо пересекает мембрану.

Источником энергии служит мембранный потенциал и/или градиент концентрации одного из ионов.

Схемы показаны на рисунке 33 [11]. *Однонаправленный перенос иона* в комплексе со специфическим переносчиком получил название *унипорта*. При этом через мембрану переносится заряд либо комплексом, если молекула переносчика электронейтральна, либо пустым переносчиком, если перенос обеспечивается заряженным переносчиком. Результатом

переноса будет накопление ионов за счет снижения мембранного потенциала. Такой эффект наблюдается при накоплении ионов калия в присутствии валиномицина в энергизированных митохондриях.

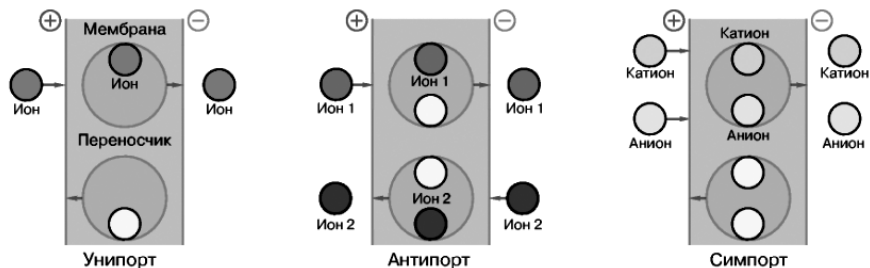


Рисунок 33 – Основные схемы вторичного активного транспорта ионов

Встречный перенос ионов с участием одноместной молекулы-переносчика получил название **антипорта**. Предполагается при этом, что молекула-переносчик образует прочный комплекс с каждым из переносимых ионов. Перенос осуществляется в два этапа: сначала один ион пересекает мембрану слева направо, затем второй ион – в обратном направлении. Мембранный потенциал при этом не меняется. Движущей силой этого процесса является разность концентраций одного из переносимых ионов. Если исходно разность концентрации второго иона отсутствовала, то результатом переноса станет накопление второго иона за счет уменьшения разности концентраций первого. Классическим примером антипорта служит перенос через клеточную мембрану ионов калия и водорода с участием молекулы антибиотика нигерицина.

Совместный односторонний перенос ионов с участием двухместного переносчика называется **симпортом**. Предполагается, что в мембране могут находиться две электронейтральные частицы: (1) переносчик в комплексе с катионом и анионом и (2) пустой переносчик. Поскольку мембранный потенциал в такой схеме переноса не изменяется, то причиной переноса может быть разность концентраций одного из ионов. Считается, что по схеме симпорта осуществляется накопление клетками аминокислот.

В процессе жизнедеятельности границы клетки пересекают разнообразные вещества, потоки которых эффективно регулируются. С этой задачей справляется клеточная мембрана с встроенными в нее транспортными системами, включающими ионные насосы, систему молекул-переносчиков и высокоселективные ионные каналы.

Такое обилие систем переноса на первый взгляд кажется излишним, ведь работа только ионных насосов позволяет обеспечить характерные особенности биологического транспорта – высокую избирательность, перенос веществ против сил диффузии и электрического поля.

Парадокс заключается, однако, в том, что количество потоков, подлежащих регулированию, бесконечно велико, в то время как насосов всего три (рисунок 30). В этом случае особое значение приобретают механизмы ионного сопряжения, получившие название вторичного активного транспорта, в которых важную роль играют диффузные процессы.

Таким образом, сочетание активного транспорта веществ с явлениями диффузионного переноса в клеточной мембране – та основа, которая обеспечивает жизнедеятельность клетки.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какой механизм переноса называется вторичным активным транспортом?
2. Перечислите основные схемы вторичного активного транспорта.
3. В чем сходство и различие антипорта и симпорта?

19. ПОРЫ В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ

Бимолекулярный слой фосфолипидов составляет основу любой клеточной мембраны. **Непрерывность** его определяет барьерные и механические свойства клетки.

В процессе жизнедеятельности непрерывность бислоя может **нарушаться** с образованием структурных дефектов типа сквозных гидрофильных пор. Вполне естественно ожидать при этом изменения всех функций клеточной мембраны, включая проницаемость и стабильность.

Ранее эти проблемы обсуждались раздельно, однако создание модели липидной поры позволяет рассмотреть их с единых позиций. Важен тот факт, что липидные поры, помимо проницаемости, оказались причастными к **стрессовым воздействиям** внешних сил на уровне клеточных мембран.

Фосфолипиды, составляющие основу клеточных мембран, относятся к жидким кристаллам. Как в любом реальном кристалле, в пленке из фосфолипидов могут быть дефекты, в месте которых и развиваются основные события структурных перестроек. Виды дефектов многообразны, но и наиболее естественным для бислоя является дефект типа сквозной гидрофильной поры. Эти поры и будут предметом дальнейшего рассмотрения (рисунок 34) [12].

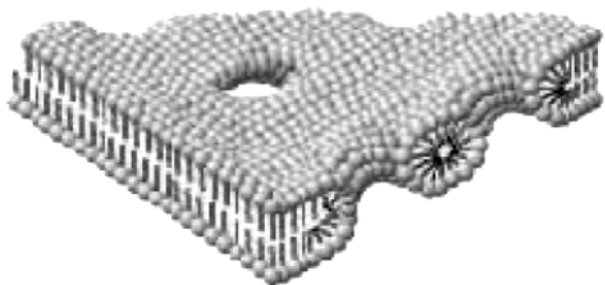


Рисунок 34 – Бислояная липидная мембрана с липидными порами

Очевидное внешнее сходство любой шаровидной клетки с мыльным пузырем, оказывается на самом деле более глубоким. В том и другом случае речь идет о важной роли пограничной бимолекулярной липидной пленки, свойства которой определяют стабильность и проницаемость частиц.

Различие заключается лишь в том, что мыльная пленка образуется на границе раздела с воздухом, а липидный бислой – в воде. Не удивительно поэтому, что часто липидные везикулы – липосомы – широко используются с целью моделирования мембранных свойств живой клетки. В настоящее время выяснено, что механическая прочность живой клетки наряду с липидным бислоем обеспечивается системой белковых микротрубочек и сетью мембранных белков. Однако это не умаляет роли самих липидных

пор и связанного с ними механизма дестабилизации мембран, особенно в тех случаях, когда система микротрубочек отсутствует или не развита.

В липидной бимолекулярной пленке клеточной мембраны поры появляются, если исключить чисто механические повреждения, в результате

- 1) тепловых флуктуации поверхности бислоя,
- 2) электрического пробоя,
- 3) замораживания пленки,
- 4) действия поверхностно-активных веществ,
- 5) осмотического давления,
- 6) перекисного окисления липидов и др.

Один из наиболее типичных и хорошо изученных примеров дестабилизации биологических мембран – **гемолиз эритроцитов**. Это явление включает на начальном этапе набухание клеток в гипотонической среде в результате действия сил осмотического давления. Во время набухания клетки мембрана растягивается, что обуславливает рост мембранного натяжения.

При определенном **пороговом уровне** натяжения появляются гидрофильные липидные поры. Размеры пор достаточны для выхода молекул гемоглобина и низкомолекулярных веществ. Выход веществ сопровождается в свою очередь снижением разности осмотического давления, при этом натяжение мембраны уменьшается и поры залечиваются. Белки цитоскелета позволяют эритроциту сохранить форму, при этом образуется так называемая **тень эритроцита**.

Тень сохраняет осмотическую активность и таким образом процесс дестабилизации приобретает циклический характер. Полного механического разрушения клетки подобного мыльному пузырю в этом случае не происходит. В отсутствие цитоскелета или его недостаточного развития механическая прочность клетки целиком определяется судьбой липидных пор. Если пора имеет размер меньше критического, то она залечивается. В противном случае неограниченный рост поры приводит к разрушению мембраны.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Каким образом наличие липидных пор влияет на стабильность биомембран?
2. Какова роль липидных пор в гемолизе эритроцитов?
3. В чем причина цикличности процесса дестабилизации эритроцита в гипотонической среде?

20. МОДЕЛЬ КРИТИЧЕСКОЙ ПОРЫ

Рассмотрим модель липидной поры (рисунок 35). Будем считать, что боковая поверхность поры имеет форму кругового цилиндра.

Предположим, что боковая поверхность цилиндра изогнута и имеет радиус кривизны $h/2$. Радиус поры равен r . Как видно на рисунка 35, липидный бислоем в целом является плоским, а пора имеет два радиуса кривизны $h/2$ и r .

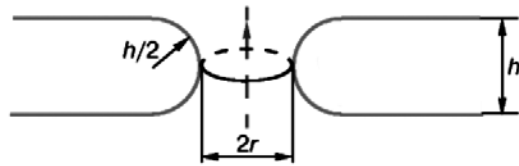


Рисунок 35 – Строение гидрофильной липидной поры: h – толщина липидного бислоя; $h/2$ – радиус кривизны стенки; r – радиус поры

Из физики известно, что искривление поверхности на границе раздела липид-вода сопровождается появлением **дополнительного давления**, называемого лапласовым и равного

$$\Delta p = \frac{2\sigma}{r},$$

где σ – межфазное (поверхностное) натяжение внутри поры, r – радиус кривизны.

В рассматриваемой модели таких радиусов два ($h/2$ и r) и, следовательно, два давления. Одно из них $p(h/2)$ способствует расширению, а другое $p(r)$ – сжатию поры. Дальнейшая судьба поры

зависит от соотношения этих двух давлений. Если $p(h/2) > p(r)$, пора будет расширяться, а если $p(h/2)$ меньше $p(r)$, то пора будет затекать.

Таким образом, на границе поры действуют **две противоположные силы**, одна из которых – **краевое линейное натяжение периметра поры** – способствует росту поры, а вторая сила – **поверхностное натяжение бислоя** – вызывает сжатие поры.

Краевая энергия поры пропорциональна первой степени радиуса и увеличивает суммарную энергию, энергия поверхностного натяжения пропорциональна квадрату радиуса и снижает суммарную энергию. В результате суммарная энергия $E(r)$ равна

$$E(r) = 2\pi r\gamma - \pi r^2\sigma,$$

где первый член определяется энергией кромки поры с линейным натяжением γ , а второй — энергией поверхностного натяжения σ . Вид кривой на рисунке 36 [12] указывает на существование неустойчивого равновесия в точке максимума с критическими значениями энергии (E^*) и радиуса (r^*).

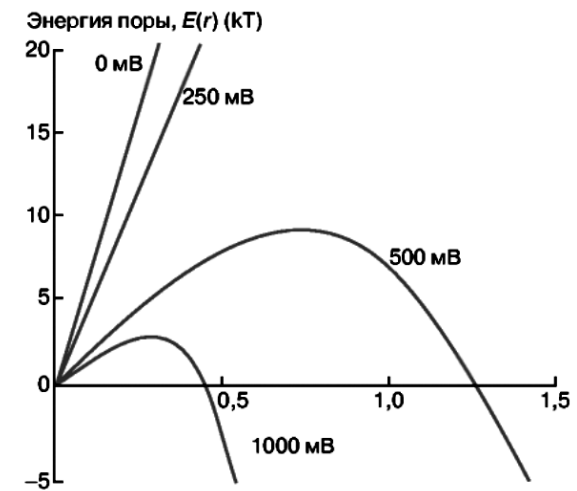


Рисунок 36 – Энергия поры как функция радиуса поры при различных значениях мембранного потенциала

В точке равновесия $\frac{\partial E}{\partial r} = 0$ и уравнение превращается в тождество: $0 = 2\pi\gamma - 2\pi\sigma r^*$, откуда можно определить критический радиус поры $r^* = \gamma/\sigma$. Высота энергетического барьера после подстановки r^* в уравнение $E(r) = 2\pi r\gamma - \pi r^2\sigma$ будет равна $E^* = \frac{\pi\gamma^2}{\sigma}$.

С учетом неустойчивости равновесия можно утверждать, что появление пор с $r > r^*$ будет сопровождаться разрывом мембраны в результате неограниченного роста поры. Напротив, при $r < r^*$ пора будет затекать и стабильность мембраны сохранится.

Таков количественный критерий стабильности липидной бислоевой мембраны.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Перечислите основные параметры модели гидрофильной липидной поры.
2. Каков энергетический критерий существования критической поры?
3. Начертите график зависимости энергии поры как функции радиуса поры при различных значениях мембранного потенциала.

21. МЕМБРАННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ

Одна из важнейших функций биологической мембраны – генерация и передача биопотенциалов. Это явление лежит в основе возбудимости клеток, регуляции внутриклеточных процессов, работы нервной системы, регуляции мышечного сокращения, рецепции.

В процессе жизнедеятельности в клетках и тканях могут возникать разности электрических потенциалов:

- **окислительно-восстановительные потенциалы** – вследствие переноса электронов от одних молекул к другим;
- **мембранные** – вследствие градиента концентрации ионов и переноса ионов через мембрану.

Биопотенциалы, регистрируемые в организме, – это в основном мембранные потенциалы.

Мембранным потенциалом называется разность потенциалов между внутренней (цитоплазматической) и наружной поверхностями мембраны:

$$\Delta\phi_M = \phi_{вн} - \phi_{нар}$$

В дальнейшем величину $\Delta\phi_M$ будем обозначать просто как ϕ_M . Прогресс в исследовании биопотенциалов обусловлен:

- разработкой **микроэлектродного метода** внутриклеточного измерения потенциалов;
- созданием специальных **усилителей биопотенциалов**;
- выбором **удачных объектов** исследования крупных клеток и среди них гигантского аксона кальмара.

Диаметр аксона кальмара достигает 0,5 мм, что в 100–1000 больше, чем диаметр аксонов позвоночных животных, в том числе человека. В гигантский аксон кальмара можно ввести микроэлектрод, не нанеся аксону значительных повреждений. Стеклообразный микроэлектрод (М) представляет собой стеклянную микропипетку с оттянутым очень тонким кончиком (рисунок 37) [14].

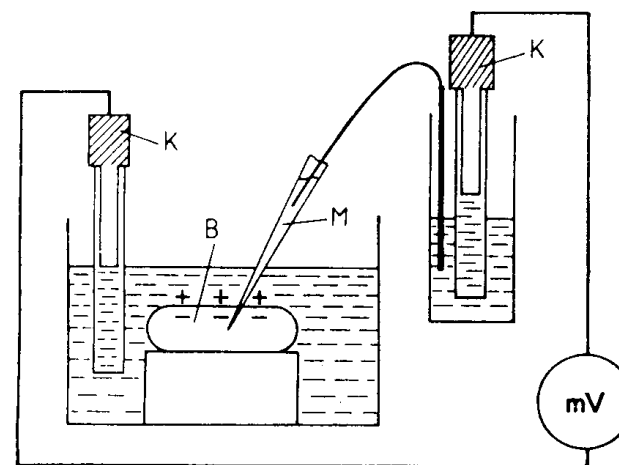


Рисунок 37 – Измерение внутриклеточного потенциала: М – стеклообразный микроэлектрод; К – Каломельный электрод сравнения; В – клетка; mV – милливольтметр

Металлический электрод такой толщины пластичен и не может проколоть клеточную мембрану, кроме того, он поляризуется. Для исключения поляризации электрода используются неполяризующиеся электроды, например серебряная проволока, покрытая солью AgCl. В раствор KCl или NaCl (желатинизированный агар-агаром), заполняющий микроэлектрод.

Второй электрод – электрод сравнения – располагается в растворе у наружной поверхности клетки. Регистрирующее устройство (mV) измеряет мембранный потенциал φ_M . Микроэлектродный метод дал возможность измерить биопотенциалы не только на гигантском аксоне кальмара, но и на клетках нормальных размеров: нервных волокнах других животных, клетках скелетных мышц, клетках миокарда и других.

Мембранные потенциалы подразделяются на потенциалы покоя и потенциалы действия.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Что называется мембранным потенциалом?
2. Опишите устройство микроэлектрода.
3. Опишите схему измерения внутриклеточного потенциала.

22. ПОТЕНЦИАЛ ПОКОЯ В КЛЕТКАХ

Потенциал покоя – стационарная разность электрических потенциалов, регистрируемая между внутренней и наружной поверхностями мембраны в невозбужденном состоянии.

Потенциал покоя определяется разной концентрацией ионов по разные стороны мембраны и диффузией ионов через мембрану.

Если концентрация какого-либо иона внутри клетки $c_{вн}$ отлична от концентрации этого иона снаружи $c_{нар}$ и мембрана проницаема для этого иона, возникает поток заряженных частиц через мембрану, вследствие чего нарушается электрическая нейтральность системы, образуется разность потенциалов внутри и снаружи клетки $\varphi_M = \varphi_{вн} - \varphi_{нар}$, которая будет препятствовать дальнейшему перемещению ионов через мембрану. При установлении равновесия выравниваются значения электрохимических

потенциалов по разные стороны мембраны: $\tilde{\mu}_{вн} = \tilde{\mu}_{нар}$. Так как $\tilde{\mu}_{вн} = \mu_0 + RT \ln c + zF\varphi$, то $RT \ln c_{вн} + zF\varphi_{вн} = RT \ln c_{нар} + zF\varphi_{нар}$. Отсюда легко получить **формулу Нернста** для равновесного мембранного потенциала

$$\varphi_M^0 = \varphi_{вн} - \varphi_{нар} = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{вн}}{c_{нар}}.$$

Если мембранный потенциал обусловлен переносом ионов K^+ , для которого $[K^+]_{вн} > [K^+]_{нар}$ и $z = +1$, то равновесный мембранный потенциал

$$\varphi_{M, K^+}^0 = -\frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{вн}}{[K^+]_{нар}} < 0.$$

Для ионов Na^+ : $[Na^+]_{вн} < [Na^+]_{нар}$, $z = +1$,

$$\varphi_{M, Na^+}^0 = -\frac{RT}{F} \ln \frac{[Na^+]_{вн}}{[Na^+]_{нар}} > 0.$$

Для ионов Cl^- : $[Cl^-]_{вн} < [Cl^-]_{нар}$, $z = -1$,

$$\varphi_{M, Cl^-}^0 = -\frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]_{вн}}{[Cl^-]_{нар}} < 0.$$

При $T = 300$ К и $z = +1$ (с учетом $\ln x = 2,3 \lg x$) $\frac{RT}{zF} \cdot 2,3 = 0,06$ В, откуда

$$\varphi_M^0 = -0,06 \cdot \lg \frac{c_{вн}}{c_{нар}}.$$

Согласно Бернштейну (1902 г.), **причина** мембранного потенциала покоя – **диффузия ионов калия** из клетки наружу. Примем в формуле Нернста $\frac{c_{вн}}{c_{нар}} = 100$, что по порядку величины соответствуют

экспериментальным данным для калия (таблица 3): $\lg \frac{c_{вн}}{c_{нар}} = \lg 100 = 2$, и

мембранный потенциал $|\varphi_M^0| = 0,06 \cdot 2 = 0,12$ (В) = 120 мВ, что несколько больше модуля экспериментально измеренных значений потенциала покоя.

Таблица 3 – Содержание ионов K^+ , Na^+ , Cl^- , равновесные потенциалы φ_M^0 и потенциалы покоя φ_M^e некоторых клеток

Объект	Концентрация, ммоль/л						φ_M^0 , мВ по формуле Нернста			φ_M^e , мВ экспер.
	$[K^+]$		$[Na^+]$		$[Cl^-]$		K^+	Na^+	Cl^-	
	вн	нар	вн	нар	вн	нар				
Гигантский аксон	360	10	70	420	160	500	-90	+50	-30	-60
Мышца лягушки	125	2,5	15	125	11	120	-98	+60	-87	-94

Пользуясь формулами электростатики, оценим, какое количество ионов должно перейти из цитоплазмы в неклеточную среду, чтобы создать такую разность потенциалов. Радиус клетки $r=10 \text{ мкм}=10^{-5} \text{ м}$. Удельная емкость мембраны (емкость на единицу площади) $C_s=10^{-2} \text{ Ф/м}^2$. Площадь мембраны $S=4\pi r^2 \approx 4\pi 10^{-10} \text{ м}^2 \approx 10^{-9} \text{ м}^2$. Тогда емкость мембраны $C=C_s \cdot S \approx 10^{-2} \text{ Ф/м}^2 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2=10^{-11} \text{ Ф}$.

Абсолютная величина заряда каждого знака на поверхности мембраны, если ее представить себе как конденсатор,

$$|q|=C\varphi \approx 10^{-11} \cdot 10^{-1} = 10^{-12} \text{ Кл, что соответствует } \frac{q}{F} \approx \frac{10^{-12}}{10^2} = 10^{-17} \text{ моль}$$

$$\text{ионов. Объем клетки } V = \frac{4}{3}\pi r^3 \approx \frac{4}{3}\pi 10^{-15} \text{ м}^3 \approx 5 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3.$$

Изменение концентрации ионов в клетке вследствие выхода из клетки 10^{-17} моль ионов составит $\Delta c = \frac{10^{-17}}{5 \cdot 10^{-15}} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ ммоль/л}$.

Это *ничтожное* изменение концентрации по сравнению с изменением концентрации ионов калия внутри клетки (таблица 3), составляет всего $10^{-4} \%$ от концентрации калия внутри клетки.

Таким образом, чтобы создать равновесный нернстовский мембранный потенциал, через мембрану должно пройти *пренебрежимо малое* количество ионов по сравнению с общим их количеством в клетке.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Что называется потенциалом покоя?
2. Запишите формулу Нернста для равновесного мембранного потенциала.
3. Оцените, как изменится концентрация ионов в клетке, чтобы мембранный потенциал был равен 120 мВ.

23. УРАВНЕНИЕ ГОЛЬДМАНА

В таблице 3 приведены значения мембранного потенциала, рассчитанного по формуле Нернста для различных клеток и для различных ионов, и экспериментально полученные значения потенциала покоя для этих клеток φ_M^e . Из сравнения рассчитанных и экспериментальных значений мембранного потенциала видно, что потенциал покоя на самом деле ближе к потенциалу, рассчитанному по формуле Нернста для K^+ .

Вместе с тем, обращает на себя внимание значительное расхождение экспериментальных и теоретических значений. Причины расхождения в том, что не учтена проницаемость мембраны для других ионов.

Одновременная диффузия через мембрану ионов K^+ , Na^+ и Cl^- учитывается *уравнением Гольдмана*:

$$\varphi_M = -\frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_{\text{вн}} + P_{Na} [Na^+]_{\text{вн}} + P_{Cl} [Cl^-]_{\text{нар}}}{P_K [K^+]_{\text{нар}} + P_{Na} [Na^+]_{\text{нар}} + P_{Cl} [Cl^-]_{\text{вн}}},$$

где P_K, P_{Na}, P_{Cl} – мембранные проницаемости соответствующих ионов.

В состоянии покоя $P_K \gg P_{Na}, P_K > P_{Cl}$. Для аксона кальмара, например, $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45$.

Перепишем уравнение Гольдмана в виде

$$\varphi_M = -\frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{\text{вн}} + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na^+]_{\text{вн}} + \frac{P_{Cl}}{P_K} [Cl^-]_{\text{нар}}}{[K^+]_{\text{нар}} + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na^+]_{\text{нар}} + \frac{P_{Cl}}{P_K} [Cl^-]_{\text{вн}}}.$$

В случае, когда проницаемость мембраны для ионов натрия и хлора значительно меньше проницаемости для калия, $P_K \gg P_{Na}, P_K \gg P_{Cl}$, из уравнения Гольдмана получается уравнение Нернста для мембранного потенциала покоя:

$$\varphi_M^e = -\frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{вн}}{[K^+]_{нар}}$$

Таким образом, уравнение Нернста – частный случай уравнения Гольдмана.

Мембранный потенциал, рассчитанный по уравнению Гольдмана, оказался по абсолютной величине меньше мембранного потенциала, рассчитанного по формуле Нернста, ближе к экспериментальным его значениям в крупных клетках.

И формула Нернста, и уравнение Гольдмана *не учитывают* активного транспорта ионов через мембрану, наличия в мембранах электрогенных (вызывающих разделение зарядов, а следовательно и возникновение разности потенциалов) ионных насосов, играющих важную роль в поддержании ионного равновесия в мелких клетках. В цитоплазматической мембране работают K^+ - Na^+ -АТФазы, перекачивающие калий внутрь клетки, а натрий из клетки.

С учетом работы электрогенных ионных насосов для мембранного потенциала было получено *уравнение Томаса*:

$$\varphi_M = -\frac{RT}{F} \ln \frac{nP_K [K^+]_{вн} + P_{Na} [Na^+]_{вн}}{nP_K [K^+]_{нар} + P_{Na} [Na^+]_{нар}},$$

где n – отношение количества ионов натрия к количеству ионов калия, перекачиваемых ионными насосами через мембрану. Чаще всего K^+ - Na^+ -АТФаза работает в режиме, когда $n=3/2$, n всегда больше 1. (Нет ионных насосов, перекачивающих Cl^- , поэтому в уравнении Томаса отсутствуют члены $P_{Cl}[Cl^-]$.)

Коэффициент $n > 1$ усиливает вклад градиента концентрации калия в создание мембранного потенциала, поэтому мембранный потенциал, рассчитанный по Томасу, больше по абсолютной величине, чем мембранный потенциал, рассчитанный по Гольдману, и дает совпадение с экспериментальными значениями для мелких клеток.

Нарушение биоэнергетических процессов в клетке и работы K^+ - Na^+ -АТФазы приводит к уменьшению $|\varphi_M|$, в этом случае мембранный потенциал лучше описывается уравнением Гольдмана.

Повреждение клеточной мембраны приводит к повышению проницаемости клеточных мембран для всех ионов: к повышению и P_K , и P_{Na} , и P_{Cl} . Вследствие уменьшения различия проницаемостей абсолютное значение мембранного потенциала $|\varphi_M|$ снижается.

Для сильно поврежденных клеток $|\varphi_M|$ еще меньше, но сохраняется отрицательный мембранный потенциал φ_M за счет содержащихся в клетке полианионов – отрицательно заряженных белков, нуклеиновых кислот и других крупных молекул, которые не могут проникнуть через мембрану (доннановский потенциал).

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем причина значительного расхождения экспериментальных и рассчитанных по формуле Нернста значений мембранного потенциала?
2. Запишите уравнение Гольдмана для равновесного мембранного потенциала.
3. Запишите уравнение Томаса для мембранного потенциала.

24. ПОТЕНЦИАЛ ДЕЙСТВИЯ

Потенциалом действия называется электрический импульс, обусловленный изменением ионной проницаемости мембраны и связанный с распространением по нервам и мышцам волны возбуждения.

Опыты по исследованию потенциала действия проведены (в основном Ходжкиным и его сотрудниками) на гигантских аксонах кальмара методом микроэлектродов с использованием высокоомных измерителей напряжения, а также методом меченых атомов.

На рисунке 38 показаны схема опытов и результаты исследований [11].

В опытах по исследованию потенциала действия использовали два микроэлектрода, введенных в аксон. На первый микроэлектрод подается импульс с амплитудой V от генератора G прямоугольных импульсов, меняющий мембранный потенциал. Мембранный потенциал измеряется при помощи второго микроэлектрода высокоомным регистратором

напряжения P . Возбуждающий импульс вызывает смещение мембранного потенциала лишь на короткое время, спустя которое мембранный потенциал быстро пропадает и восстанавливается потенциал покоя.

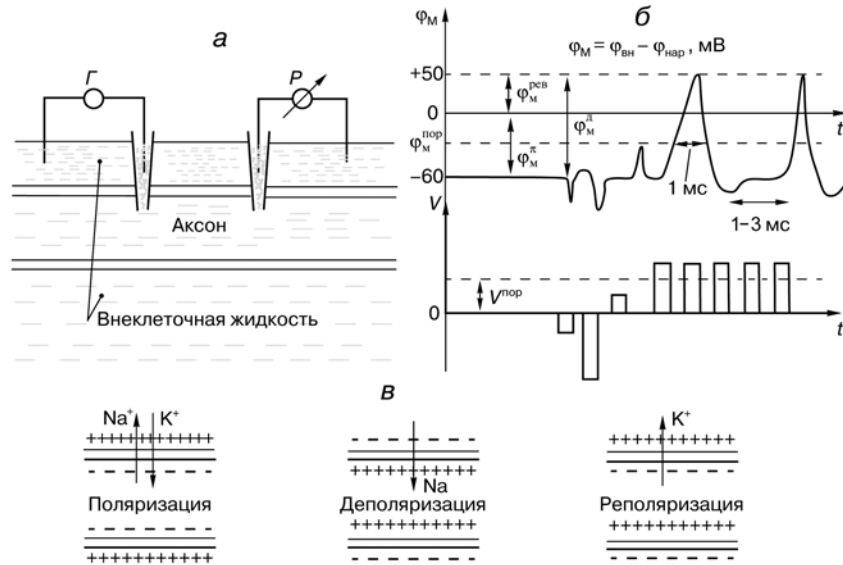


Рисунок 38 – Исследование потенциала действия: a – схема опыта (Γ – генератор импульсов, P – регистратор напряжения); b – потенциал действия (V – амплитуда прямоугольного импульса, $V^{пор}$ – пороговое значение амплитуды, t – время, Φ_M – мембранный потенциал, $\Phi_{вн}, \Phi_{нар}$ – потенциалы на внутренней и наружной поверхностях мембраны, $\Phi_M^Д$ – амплитуда потенциала действия, $\Phi_M^П$ – уровень потенциала покоя, $\Phi_M^{пор}$ – пороговое значение мембранного потенциала, $\Phi_M^{рев}$ – мембранный потенциал реверсии); v – поляризация, деполяризация и реполяризация мембраны

В том случае, когда возбуждающий импульс смещается еще дальше в отрицательную сторону, он сопровождается гиперполяризацией мембраны. Потенциал действия не формируется также и в том случае, когда возбуждающий импульс положительный (деполярирующий), но его амплитуда меньше **порогового значения** $V^{пор}$.

Однако, если амплитуда положительного, деполярирующего импульса окажется **больше** значения $V^{пор}$, Φ_M становится больше $\Phi_M^{пор}$ и в мембране развивается процесс, в результате которого происходит **резкое повышение мембранного потенциала** и мембранный потенциал Φ_M даже меняет свой знак – становится положительным ($\Phi_{вн} > \Phi_{нар}$).

Достигнув некоторого положительного значения $\Phi_M^{рев}$ – **потенциала реверсии**, мембранный потенциал возвращается к значению потенциала покоя $\Phi_M^П$, совершив нечто вроде затухающего колебания. В нервных волокнах и скелетных мышцах длительность потенциала действия около 1 мс (а в сердечной мышце около 300 мс). **После снятия возбуждения** еще в течение 1–3 мс в мембране наблюдаются некоторые остаточные явления, во время которых мембрана **рефрактерна** (невозбудима).

Новый деполярирующий потенциал $V > V^{пор}$ может вызвать образование нового потенциала действия только после полного возвращения мембраны в состояние покоя. Причем **амплитуда потенциала действия** $\Phi_M^Д = |\Phi_M^П| + |\Phi_M^{рев}|$ **не зависит от амплитуды деполярирующего потенциала** (если только $V > V^{пор}$). Если в покое мембрана поляризована (потенциал цитоплазмы отрицателен по отношению к внеклеточной среде), то при возбуждении происходит деполяризация мембраны (потенциал внутри клетки положителен) и после снятия возбуждения происходит реполяризация мембраны.

Характерные свойства потенциала действия:

- 1) наличие **порогового** значения деполярирующего потенциала;
- 2) закон "**все или ничего**", то есть, если деполярирующий потенциал больше порогового, развивается потенциал действия, амплитуда которого не зависит от амплитуды возбуждающего импульса, и нет потенциала действия, если амплитуда деполярирующего потенциала меньше пороговой;
- 3) существует **период рефрактерности**, невозбудимости мембраны во время развития потенциала действия и остаточных явлений после снятия возбуждения;

4) в момент возбуждения **резко** уменьшается сопротивление мембраны (у аксона кальмара от $0,1 \text{ Ом}\cdot\text{м}^2$ в покое до $0,0025 \text{ Ом}\cdot\text{м}^2$ при возбуждении).

Если обратиться к данным для значений равновесных нернстовских потенциалов, созданных различными ионами (таблица 3), можно предположить, что **положительный потенциал реверсии имеет натриевую природу**, поскольку именно диффузия натрия создает положительную разность потенциалов между внутренней и наружной поверхностями мембраны.

Можно менять амплитуду импульса потенциала действия, **изменяя концентрацию натрия** в наружной среде. При уменьшении наружной концентрации натрия амплитуда потенциала действия уменьшается, так как меняется потенциал реверсии. Если из окружающей клетку среды полностью удалить натрий, потенциал действия вообще не возникает.

Опыты, проведенные с радиоактивным **изотопом натрия**, позволили установить, что при возбуждении проницаемость для натрия резко возрастает. Если в состоянии покоя соотношение коэффициентов проницаемости мембраны аксона кальмара для разных ионов:

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45,$$

то в состоянии возбуждения:

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 20 : 0,45,$$

то есть, по сравнению с невозбужденным состоянием, при возбуждении коэффициент проницаемости для натрия **возрастает в 500 раз**.

Расчеты мембранного потенциала реверсии по уравнению Гольдмана, если в него подставить значения проницаемостей мембраны для возбужденного состояния, совпадают с экспериментальными данными.

Возбуждение мембраны описывается **уравнениями Ходжкина-Хаксли**. Одно из уравнений Ходжкина-Хаксли имеет вид:

$$I_M = C_M \frac{d\varphi_M}{dt} + \sum I_i,$$

где I_M – ток через мембрану, C_M – емкость мембраны, $\sum I_i$ – сумма ионных токов через мембрану.

Электрический ток через мембрану складывается из ионных токов: ионов калия – I_{K^+} , натрия – I_{Na^+} и других ионов, в том числе Cl^- , так называемого тока утечки $I_{ут}$, а также емкостного тока.

Емкостной ток обусловлен перезарядкой конденсатора, который представляет собой мембрана, перетеканием зарядов с одной ее поверхности на другую. Его величина определяется количеством заряда, перетекающего с одной обкладки на другую за единицу времени $\frac{dq}{dt}$, а поскольку заряд конденсатора $q = C_M \Delta\varphi$, то емкостной ток равен $C_M \frac{d\varphi_M}{dt}$.

Полный мембранный ток:

$$I_M = C_M \frac{d\varphi_M}{dt} + I_{K^+} + I_{Na^+} + I_{ут}.$$

На рисунке 39(а) представлена эквивалентная электрическая схема элемента возбудимой мембраны.

Каждый ионный ток определяется разностью мембранного потенциала φ_M и равновесного нернстовского потенциала, создаваемого диффузией ионов данного типа φ_i^0 :

$$I = g_i (\varphi_M - \varphi_i^0),$$

где $g_i = 1/R_i$ – проводимость (величина, обратная сопротивлению элемента мембраны для ионов данного типа). Отсюда полный мембранный ток

$$I_M = C_M \frac{d\varphi_M}{dt} + g_{K^+} (\varphi_M - \varphi_{K^+}^0) + g_{Na^+} (\varphi_M - \varphi_{Na^+}^0) + g_{ут} (\varphi_M - \varphi_{ут}^0).$$

Согласно теории Ходжкина-Хаксли, возбуждение элемента мембраны связано с изменениями проводимости g_{Na^+} и g_{K^+} для ионов Na^+ и K^+ .

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Охарактеризуйте процессы поляризации, деполяризации и реполяризации в опытах Ходжкина.
2. Перечислите характерные свойства потенциала действия.
3. Запишите уравнение Ходжкина-Хаксли.

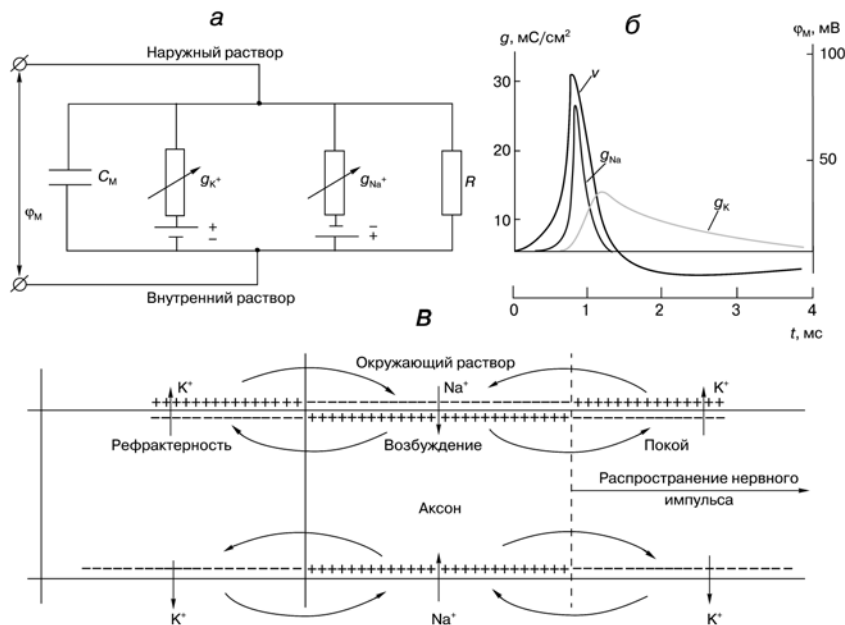


Рисунок 39 – Схема возникновения и распространения потенциала действия: *a* – электрическая эквивалентная схема участка возбудимой мембраны; C_M – емкость мембраны, R – сопротивление канала утечки, g_{K^+}, g_{Na^+} – проводимость мембраны для ионов K^+ и Na^+ ; *б* – появление ионных токов и развитие потенциала действия; *в* – распространение потенциала действия за счет местных круговых токов (показано стрелками)

25. ТОКИ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ С ФИКСИРОВАННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ

Для доказательства решающей роли ионных токов в генерации нервного импульса были поставлены знаменитые опыты с фиксацией мембранного потенциала $\varphi_M = \varphi_{вн} - \varphi_{нар}$ (Ходжкин, Хаксли и др.).

Поддержание постоянного напряжения φ_M при исследовании токов через возбужденную мембрану позволяло:

- 1) избавиться от емкостных токов $C_M \frac{d\varphi_M}{dt}$;

- 2) исключить изменение ионных проводимостей g_{Na^+} и g_{K^+} при изменении φ_M и изучить их изменение в различные фазы развития возбуждения: $g_i = f(t)$.

Постоянная разность потенциалов между внутренней и наружной поверхностями мембраны поддерживается при помощи специальной электронной схемы (рисунок 40), ключевой элемент которой – операционный усилитель (ОУ). (ОУ представляют собой усилители постоянного тока, охваченные глубокой отрицательной обратной связью по напряжению.)

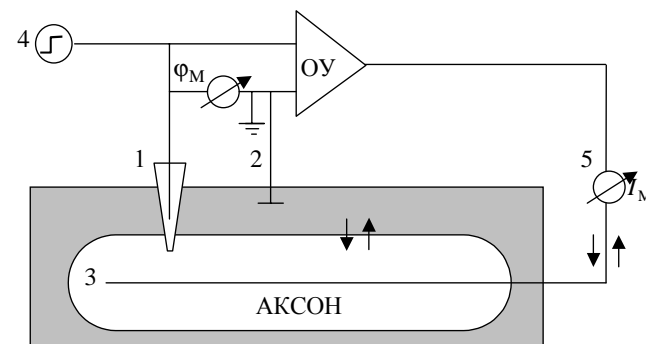


Рисунок 40 – Схема исследования токов через мембрану с фиксацией мембранного потенциала: 1 – микроэлектрод; 2 – электрод сравнения; 3 – серебряный проводник; 4 – генератор постоянного напряжения; 5 – амперметр; ОУ – операционный усилитель

Между входами в ОУ – разность потенциалов микроэлектрода, помещенного внутрь аксона кальмара (1), и электрода сравнения (2), то есть мембранный потенциал $\varphi_M = \varphi_{вн} - \varphi_{нар}$. На выходе операционного усилителя создается напряжение, компенсирующее изменение трансмембранного потенциала. Это напряжение подается на серебряный проводник (3), расположенный вдоль аксона, чтобы по всему волокну была **одна и та же** мембранная разность потенциалов. Электронная схема удерживает на выходе (внутри аксона) тот же потенциал, что и на входе

ОУ, таким образом удерживается постоянный мембранный потенциал: $\varphi_M = const$.

При помощи генератора постоянного напряжения (4) можно "ступенькой" изменить входное напряжение ОУ, например, поднять его выше порогового. Электронная схема будет удерживать это заданное напряжение во время опыта. Амперметр (5) измеряет протекающий при этом через мембрану ток (между электродом сравнения (2) и выходящим электродом ОУ (3)). В опытах с фиксацией напряжения можно исследовать изменение мембранного тока во времени, при развитии возбуждения, задавая разные постоянные значения мембранного потенциала φ_M .

Будем считать ток, направленный из клетки *наружу* в окружающий раствор *положительным*, а *внутрь* клетки из окружающего раствора – *отрицательным*.

Обнаружено, что, если поднять мембранный потенциал φ_M выше порогового (рисунок 41(a)), сначала течет ток внутрь клетки, а затем из клетки наружу (рисунок 41(б)).

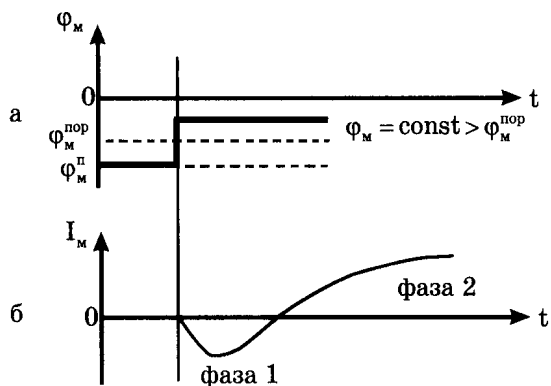


Рисунок 41 – Результаты исследований мембранного тока методом фиксации напряжения.

В экспериментах, проведенных Ходжкиным, Хаксли, Бейкером, Шоу, было доказано, что *фаза 1* мембранного тока связана с потоком ионов *натрия* из окружающей среды (где концентрация натрия больше) в клетку

(где она меньше), а *фаза 2* объясняется вытеканием ионов *калия* из клетки наружу.

В своих опытах Ходжкин и Хаксли изменяли ионный состав окружающего раствора. Было обнаружено, что, если снаружи убирали натрий, первая фаза мембранного тока (ток внутрь клетки) пропадала. Следовательно, *первая фаза* развития потенциала действия связана с увеличением проницаемости мембраны для ионов натрия.

Поток положительных частиц в клетку приводит к деполяризации мембраны – внутренняя ее поверхность заряжается положительно по отношению к наружной.

Во второй фазе резко увеличивается проницаемость мембраны для калия и из клетки наружу выходят положительно заряженные ионы калия, в то время как натриевый ток уменьшается.

Ионный механизм развития потенциала действия был окончательно доказан в эксперименте Ходжкина, Бейкера и Шоу, в котором *аксоплазму* препарированного аксона *заменяли* на наружный раствор, а ионный состав наружного раствора сделали таким же, как у нормальной аксоплазмы. При такой замене ионных составов разность потенциалов на мембране изменила знак. Теперь в покое внутренняя поверхность мембраны была заряжена положительно по отношению к наружной. А потенциал действия оказался отрицательным.

Можно предположить, что селективное (избирательное) изменение ионной проницаемости возбужденной мембраны: сначала для Na^+ , а потом для K^+ – объясняется тем, что в мембране имеются *специальные ионные каналы*.

Существуют отдельно натриевые и калиевые каналы, которые открываются и закрываются во время прохождения через данный участок мембраны нервного импульса. В первой фазе – открываются натриевые каналы, во второй фазе – калиевые. А закрываются, соответственно, сначала натриевые каналы, а затем калиевые. Открывание и закрывание ионных каналов вызывается изменением мембранного потенциала.

Одно из доказательств наличия в мембране ионных каналов – существование веществ, *блокирующих ионные потоки* через мембрану. Так, содержащийся в рыбе фугу *тетродотоксин* блокирует поступление

внутри клетки **натрия** и, таким образом, нарушает передачу нервного импульса, что может привести к летальному исходу. Доказано, что тетродотоксин не влияет на проницаемость клетки для калия, значит, ионы натрия и калия на самом деле проходят через разные каналы.

Из-за своего специфического строения молекулы тетродотоксина, по-видимому, застревают в натриевых каналах. Подсчитав число застрявших в мембране молекул тетродотоксина, удалось определить количество натриевых каналов. В разных нервных волокнах позвоночных оно было разным – от 3 до 75 каналов на один квадратный микрометр площади мембраны (для сравнения количество молекул фосфолипидов $\approx 2 \cdot 10^6 \frac{1}{\text{мкм}^2}$).

Был обнаружен и специфический **ингибитор** калиевых каналов – **тетраэтиламмоний**.

Если обработать мембрану тетродотоксином, блокирующим натриевые каналы, в опытах с фиксацией мембранного потенциала пропадает первая фаза (рисунок 41), а тетраэтиламмоний, прекращающий перенос через мембрану калия, вызывает исчезновение второй фазы.

Таким образом, установлено, что формирование потенциала действия вызывается **ионными потоками** через мембрану: сначала ионов натрия внутрь клетки, а затем – ионов калия из клетки в наружный раствор (рисунок 41), что связано с изменением проводимости мембраны для ионов калия и натрия (рисунок 39(б)).

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Опишите схему исследования токов через мембрану с фиксацией мембранного потенциала.
2. С потоком каких ионов связаны каждая из двух фаз мембранного тока в экспериментах Ходжкиным, Хаксли, Бейкером, Шоу.
3. Каким образом тетродоксин влияет на распространение нервного импульса?

26. РАСПРОСТРАНЕНИЕ ИМПУЛЬСА ВДОЛЬ НЕРВНОГО ВОЛОКНА

Если в каком-нибудь участке возбудимой мембраны сформировался потенциал действия, мембрана деполяризована, возбуждение распространяется на другие участки мембраны. Рассмотрим распространение возбуждения на примере передачи нервного импульса по аксону (рисунок 39(в)).

И в аксоплазме, и в окружающем растворе возникают **локальные токи**: между участками поверхности мембраны с большим потенциалом (положительно заряженными) и участками с меньшим потенциалом (отрицательно заряженными). Локальные токи образуются и внутри аксона, и на наружной его поверхности.

Локальные электрические токи приводят к повышению потенциала внутренней поверхности невозбужденного участка мембраны $\Phi_{\text{вн}}$ к понижению $\Phi_{\text{нар}}$ наружного потенциала невозбужденного участка мембраны, оказавшегося по соседству с возбужденной зоной. Таким образом, отрицательный потенциал покоя $\Phi_{\text{М}}^{\text{П}}$ уменьшается по абсолютной величине, то есть повышается. В областях, близких к возбужденному участку, $\Phi_{\text{М}}$ повышается выше порогового значения. Под действием изменения мембранного потенциала открываются натриевые каналы и дальнейшее повышение происходит уже за счет потока ионов натрия через мембрану.

Происходит деполяризация мембраны, развивается потенциал действия. Затем возбуждение передается дальше на покоящиеся участки мембраны.

Может возникнуть вопрос, почему возбуждение распространяется по аксону не в обе стороны от зоны, до которой дошло возбуждение, ведь локальные токи текут в обе стороны от возбужденного участка. Дело в том, что возбуждение может распространяться только в область мембраны, находящуюся в состоянии покоя, то есть **в одну сторону** от возбужденного участка аксона. В другую сторону нервный импульс не может распространяться, так как области, через которые прошло возбуждение, некоторое время остаются невозбудимыми – рефрактерными.

Большую скорость распространения нервного импульса по аксону кальмара обеспечивает их гигантский по сравнению с аксонами позвоночных диаметр. У позвоночных большая скорость передачи возбуждения в нервных волокнах достигается другими способами. Аксоны позвоночных снабжены миелиновой оболочкой, которая действует как изолятор, поэтому локальный ток проходит *между перехватами Ранвье* [16]. В результате возбуждение передается скачками (*сальтаторно*) от одного перехвата Ранвье к другому, причем с большей скоростью и с меньшими затратами энергии, чем в немиелинизированных волокнах сравнимого диаметра (рисунок 42).

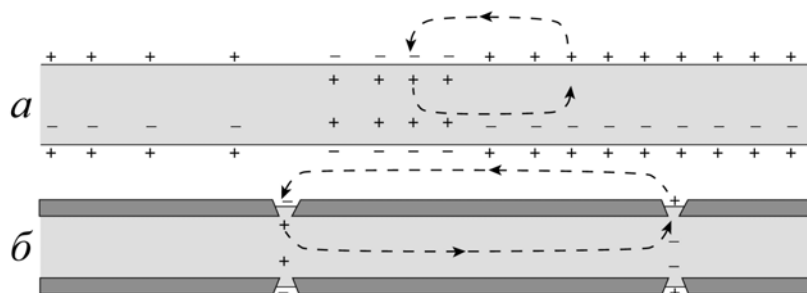


Рисунок 42 – Сальтаторное распространение потенциала действия по миелинизированному волокну: *а* – немиелинизированное нервное волокно, *б* – миелинизированное нервное волокно.

Малые энергетические потери объясняются тем, что электрическая емкость миелиновой оболочки очень мала и на ее зарядку требуется значительно меньше энергии, чем на зарядку мембраны аксона беспозвоночных, имеющей высокую электрическую емкость.

Волокна, по которым распространяется нервный импульс, обычно сравнивают с кабелем, имеющим несовершенные электрические свойства (низкая электропроводность, недостаточные изоляционные свойства мембраны, большая мембранная емкость).

Для моделирования распространения потенциала действия по нервному волокну часто используют *эквивалентную электрическую схему*

мембраны [10], отражающую проводящие ("кабельные") свойства нервных волокон (рисунок 43).

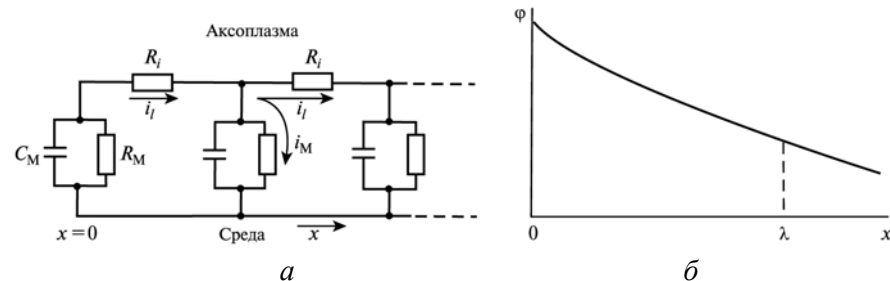


Рисунок 43 – Кабельные свойства волокна: *а* – эквивалентная схема, *б* – распределение потенциала по длине волокна x при "инъекции" тока в точке $x=0$. λ – постоянная длины волокна, C_M – емкость мембраны, R_M – сопротивление мембраны, R_i – сопротивление аксоплазмы, i_l – продольный ток, i_M – мембранный ток

Хотя кабельные свойства аксона несовершенны, непрерывная кабельная связь между соседними участками волокна – необходимый фактор в процессе передачи электрических изменений от одной точки к другой. Отсутствие затухания при распространении импульса объясняется тем, что аксон не обычная кабель: вдоль его волокна в мембране размещены молекулярные "генераторы", подпитывающие бегущий импульс. Нервные импульсы проводятся по аксонам в какой-то степени аналогично тому, как передаются электрические сигналы по кабельно-релейной линии. Электрический импульс передается без затухания за счет его усиления на промежуточных релейных станциях, роль которых в аксонах выполняют участки возбудимой мембраны, в которых генерируются потенциалы действия.

Скорость распространения потенциала действия увеличивается при переходе с тонкого на толстое волокно, соответственно снижается при переходе с более толстого на более тонкое (рисунок 44(а,б)). При определенных соотношениях волокон (как правило при большом расширении волокна) может произойти блокирование распространения импульса.

Блокирование прохождения импульсов может иметь место и в узлах ветвления (рисунок 44(в,г)) [10]. Блокирование зависит от временного сдвига между импульсами. Если он мал, то импульсы "помогают" друг другу, а если временной сдвиг превышает некоторую критическую величину – "мешают" друг другу, так как прошедший первым оставляет узел на некоторое время в рефрактерном состоянии.

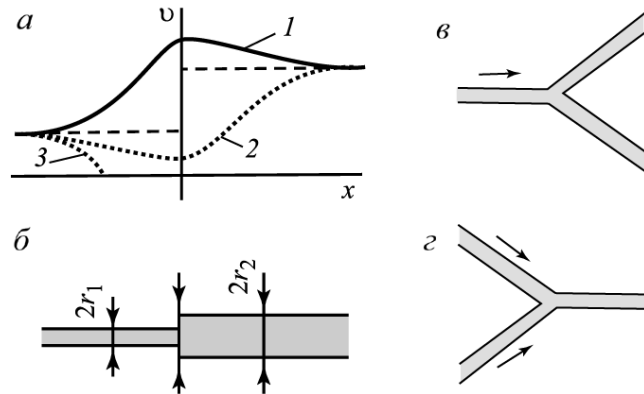


Рисунок 44 – Прохождение импульса по аксону: *a* – изменение скорости импульса в зависимости от его направления (1,2 – импульсы проходят, 3 – импульсы блокируются, штриховая линия показывает скорость распространения импульса вдали от места изменения диаметра волокна), *б* – схема расширяющегося волокна, *в* – прохождение импульсов через узел ветвления – импульс проходит по одному волокну, *г* – импульс проходит сразу по двум волокнам

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Охарактеризуйте сальтаторное распространение потенциала действия по миелинизированному волокну.
2. Начертите эквивалентную электрическую схему мембраны, отражающую кабельные свойства нервных волокон.
3. Как изменяется скорость распространения потенциала действия при изменении диаметра волокна?

27. ИОННЫЕ КАНАЛЫ

Модель возбудимой мембраны по теории Ходжкина-Хаксли предполагает регулируемый перенос ионов через мембрану. Однако непосредственный переход иона через липидный бислой весьма затруднен. В мембране существуют *специальные структуры*, которые проводят ионы – ионные каналы.

На рисунке 45 приведена структурно-функциональная схема канала, где воротное устройство открывается с помощью управляющего сенсора, чувствительного к внешнему электрическому полю [10]. Канал изображен в виде расположенной в мембране макромолекулы со сквозной полостью посередине. Часть молекулы, обращенная в наружный раствор, несет гликозидные группы.

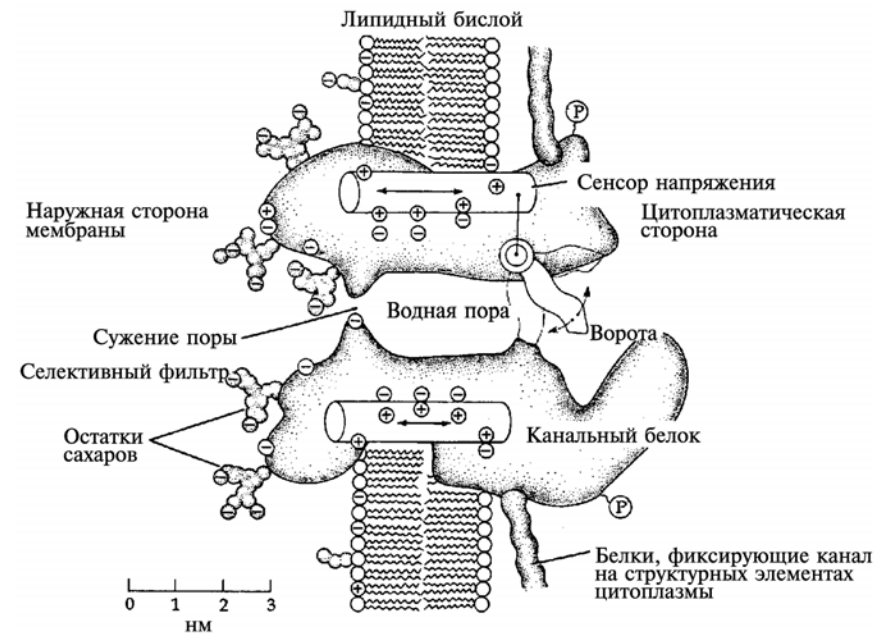


Рисунок 45 – Схематическое изображение ионного канала

"Тело" канала состоит из трансмембранного белка, погруженного в липидный бислой. Макромолекула включает 1900–4000 аминокислотных

остатков, уложенных в одну или несколько полипептидных цепей, а также несколько сот сахарных остатков, ковалентно связанных с аминокислотами во внешнем пространстве. **Внутренняя поверхность** поры включает в основном **гидрофильные** аминокислоты.

Для открытия и закрытия ворот канала требуется обратимое изменение конформации белка, при котором "ворота" переходят в соответствующую позицию. Вероятность закрытия или открытия канала зависит от состояния "сенсора", являющегося частью канала и имеющего несколько заряженных групп,двигающихся под влиянием приложенного мембранного электрического потенциала.

Индукцированные изменениями электрического поля движения зарядов "сенсора" приводит к конформационным перестройкам канала и соответственно открытию (или закрытию) воротного механизма. При открытии или закрытии "ворот" изменения ионного тока носят скачкообразный характер.

Такие потенциал-зависимые ионные каналы широко представлены в клетках возбудимых тканей и обеспечивают проведение потенциала действия.

Другие механизмы управления ионными каналами были обнаружены недавно (рисунок 46) [21].

Натриевый потенциал-зависимый канал KvAP (рисунок 46(a)) блокируется токсинами VSTX1, которые активируют зарядочувствительный сенсор, внедряясь в биомембрану снаружи.

В другом случае (рисунок 46(б)) механочувствительный ионный канал механически блокировался вследствие внедрения в биомембрану белков GsMTx4, которые, раздвигая липиды, препятствовали открыванию канала [13,23].

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какова роль сенсора в работе ионного канала?
2. Каков механизм блокирования потенциал-зависимого ионного канала KvAP токсинами VSTX1?
3. Каков механизм блокирования механочувствительного ионного канала белками GsMTx4?

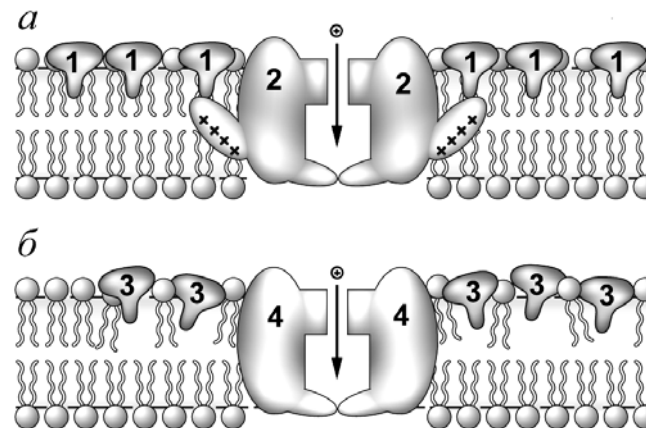


Рисунок 46 – Блокирование ионных каналов: *a* – взаимодействием токсинов VSTX1 (1) с сенсорами канала (2); *б* – блокирование ионного канала (4) увеличением плотности липидного слоя вследствие внедрения белков GsMTx4 (3) в мембрану

28. СТРУКТУРА ИОННЫХ КАНАЛОВ

В модели Ходжкина и Хаксли потенциал действия возникает в результате сильных кратковременных изменений проницаемости мембраны аксона для ионов натрия и калия.

Структурные исследования показали, что **натриевый канал** состоит из четырех гомологичных субъединиц, каждая из которых имеет подобную аминокислотную последовательность (рисунок 47) [8].

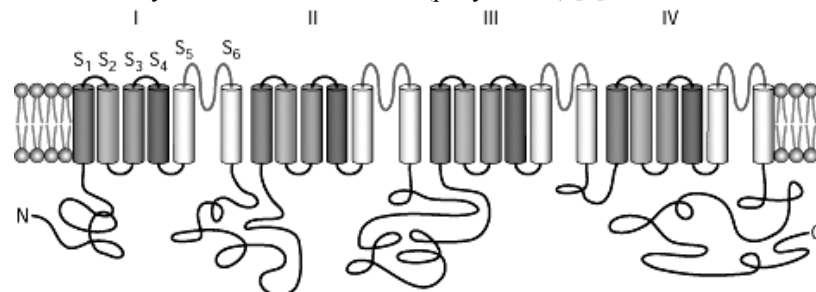


Рисунок 47 – Схема полипептидной цепи Na⁺-канала

Каждая гомологичная субъединица состоит из пяти гидрофобных сегментов (α -спиралей) (S_1 , S_2 , S_3 , S_5 , и S_6) и одной положительно заряженной α -спирали S_4 . Положительно заряженный сегмент S_4 выполняет роль потенциалочувствительного сенсора. Полипептидные петли между S_5 и S_6 α -спиралями формируют пору натриевого канала.

Аналогичную структуру имеет и **кальциевый** канал (рисунок 48) [25]. Потенциалочувствительные сегменты на рисунке 48 заштрихованы, а порообразующие петли выделены черным.

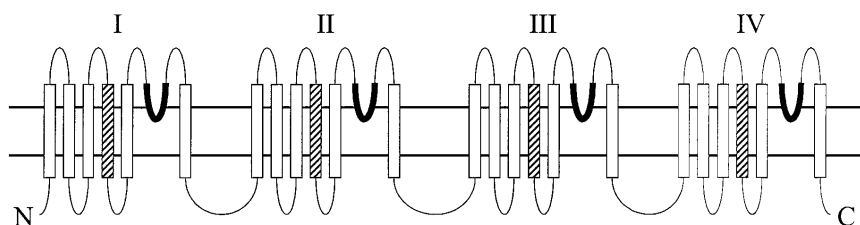


Рисунок 48 – Схема полипептидной цепи Ca^{2+} -канала

Определить структуру **калиевого** канала оказалось наиболее трудоемко. В настоящее время считается, что калиевый канал образуется четырьмя тождественными субъединицами, порообразующие петли которых подобны петлям натриевого и кальциевого каналов (рисунок 49) [8].



Рисунок 49 – Схема субъединиц ионных каналов: 1 – Na^{+} -канал; 2 – Ca^{2+} -канал; 3 – K^{+} -канал эукариот; 4 – K^{+} -канал прокариот

Некоторые K^{+} -каналы бактерий содержат только две трансмембранные α -спирали S_5 и S_6 .

Этот факт подтверждает гипотезу о том, что область между S_5 и S_6 (порообразующая петля) является ключевым компонентом во всех трех типах ионных каналов.

Пространственная ориентация четырех субъединицы ионных каналов показана на рисунке 50 для случая Ca^{2+} -канала [25].

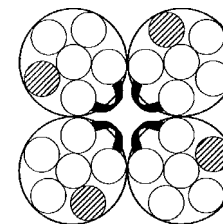


Рисунок 50 – Схема Ca^{2+} -канала, штриховкой отмечены потенциалочувствительные α -спирали (сенсоры канала)

Исследования ионных каналов рентгеноструктурными методами позволили воссоздать **пространственную картину** расположения белковых цепей формирующих каналы.

На рисунке 51 [8] представлена схема бактериального **калиевого** канала *Streptomyces lividans*, имеющего коническую форму ("вершина" конуса обращена внутрь мембраны).

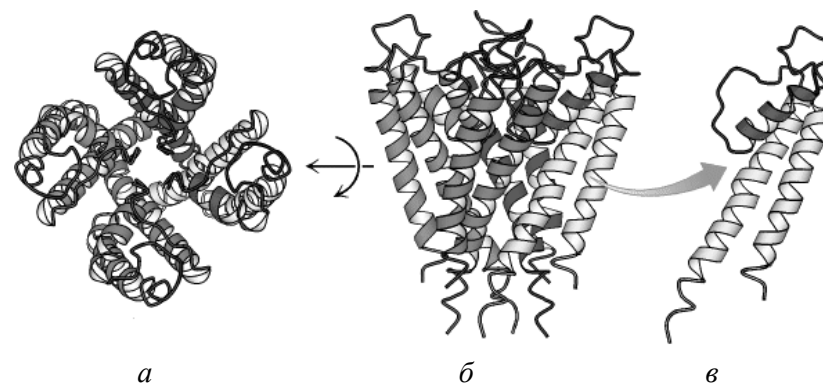


Рисунок 51 – Структура K^{+} -канала: а – вид вдоль оси канала внутрь мембраны, б – вид сбоку, в – одна из четырех каналообразующих субъединиц

Сечение *калиевого* канала представлено на рисунке 52 [26]. Внутри клетки канал поры сначала имеет диаметр 10 Å, который затем уменьшается до 8 Å.

Гидратированные ионы калия проникают в пору на глубину 22 Å, тем самым эффективная толщина мембраны уменьшается от 34 Å до 12 Å.

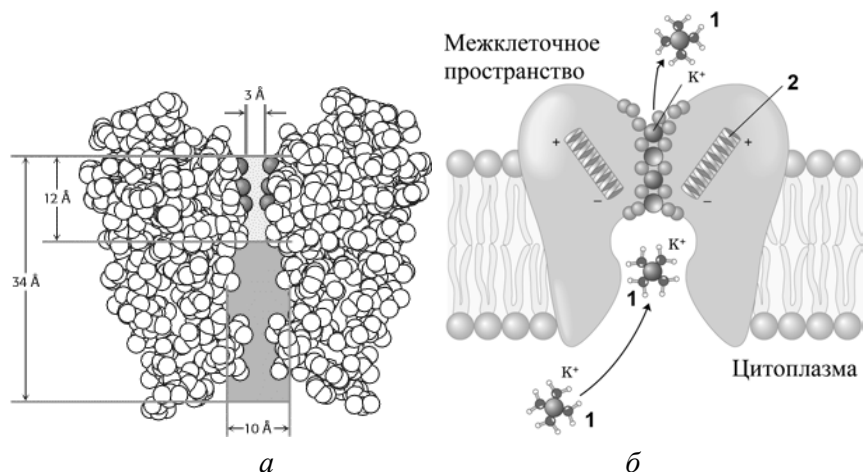


Рисунок 52 – Сечение K^+ -канала: *a* – два участка на пути ионов калия, *б* – схема прохождения ионов калия через канал: 1 – гидратированные ионы калия; 2 – диполь (α -спираль) стабилизирующий электростатический градиент

Самое узкое место канала имеет сечение 3 Å. Ион *калия* освобождается от гидратной оболочки и присоединяется к полипептидным петлям субъединиц, которые имеют последовательность Thr-Val-Gly-Tyr-Gly (Треонил-Валин-Глицил-Тирозил-Глицил) и обеспечивают селективность калиевого канала (рисунок 53) [8].

Баланс энергий дегидратации иона и присоединения его к карбонильным группам Thr-Val-Gly-Tyr-Gly-последовательности (рисунок 54) [8] обеспечивает прохождение ионов *калия* через канал, но запрещает прохождение ионов *натрия*, несмотря на то, что ионы натрия имеют меньший радиус, чем ионы калия.

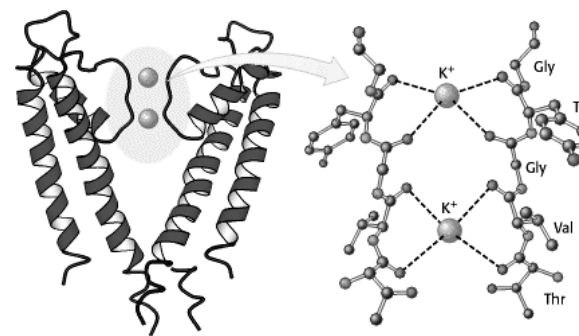


Рисунок 53 – Селективный фильтр K^+ -канала

Дегидратация ионов K^+ компенсируется формированием связей с атомами кислорода карбоксильных групп канала. Для ионов натрия такой компенсации не происходит и в целом дегидратация и присоединение ионов натрия к K^+ -каналу энергетически невыгодно.

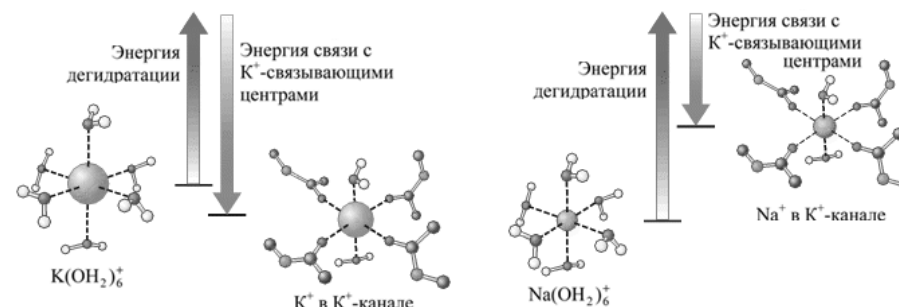


Рисунок 54 – Энергетика селективности K^+ -канала

Ионные радиусы кислорода, калия и натрия 1,4; 1,33 и 0,95 Å соответственно. Кольцо кислородных атомов расположено так, что $K^+ - O$ -расстояние 2,73 Å (1,4+1,33 Å) – оптимально для взаимодействия кислорода с калием. Для натрия $Na^+ - O$ -связь короче (0,95+1,4=2,35 Å).

Наличие двух центров связывания ионов в канале необходимо для обеспечения быстрого высвобождения ионов из канала в межклеточное

пространство. Рассмотрим процесс ионной проводимости канала (рисунок 55) [8]. В результате энергетически выгодного процесса ион калия связывается с *первым* связывающим центром (нижний центр на рисунке 24, 1 этап). Затем он может перескочить во *второй* связывающий центр (верхний центр на рисунке 55), имеющий одинаковое с первым центром сродство к иону калия (этап 2).

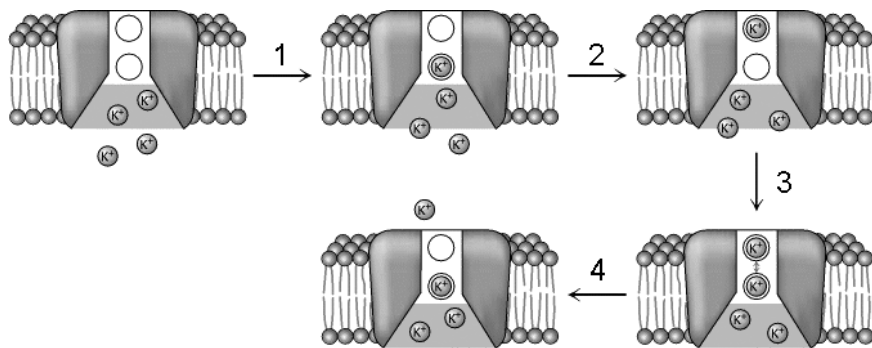


Рисунок 55 – Двухцентровая модель проводимости K^+ -канала

Дальнейшему высвобождению иона калия в межклеточное пространство препятствует энергетический барьер (этот процесс, как показано выше, энергетически не выгоден).

Однако если к нижнему связывающему центру присоединяется следующий ион калия (этап 3), то электростатическое отталкивание двух ионов калия помогает первому иону преодолеть энергетический барьер и выталкивает его из канала наружу (этап 4).

Этот механизм объясняет парадоксальное *сочетание* высокой селективности канала (которая требует сильной связи ионов внутри канала) с высокой скоростью прохождения ионов через канал.

Селективность натриевых каналов частично определяется также и *стерическими факторами*. Ионы натрия и лития, так же как и гидроксилламин ($^+H_3N-OH$) и гидразин ($^+H_3N-NH_2$) соответствуют размерам канала (рисунок 56) [8].

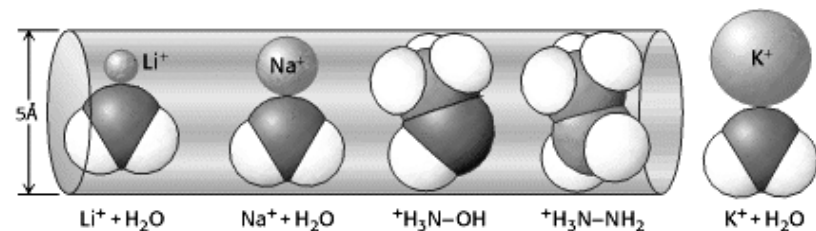


Рисунок 56 – Стерическая избирательность Na^+ -канала

В отличие от этого гидратированный ион калия оказывается слишком большим для канала.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Сравните схемы белковых цепей натриевого и калиевого каналов.
2. Что обеспечивает селективность калиевого канала?
3. Опишите двухцентровую модель проводимости калиевого канала.
4. Какова роль стерического фактора в обеспечении избирательности ионных каналов?

29. ПЭТЧ-МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Революцию в исследовании ионных каналов совершили в 1976 году Эрвин Нехер (Erwin Neher) и Берт Сакман (Bert Sakmann) (рисунок 57) [27].

Они предложили использовать *стеклянные пипетки микроэлектродов* (с несколько более толстым кончиком, чем те, которые использовались для исследования мембранных потенциалов), но *не вводить* их сквозь мембрану, а плотно прижимать и, за счет небольшого снижения давления, "присасываться" кончиком микропипетки к поверхности мембраны.

Такая методика "пэтч-регистрации" (*patch-clamp technique*) позволила более чем в 100 раз увеличить чувствительность электрических измерений и дала возможность изучать функцию *одиночного* ионного канала в реальном времени, поскольку наблюдение велось только за тем участком биомембраны, который оказался внутри кончика микропипетки.

Плотный контакт (*seal*) микропипетки с поверхностью биомембраны обеспечивает чрезвычайно **высокое** электрическое сопротивление (чрезвычайно низкую электрическую проводимость) такого контакта порядка нескольких гигаом ($1 \text{ ГОм} = 10^9 \text{ Ом}$).

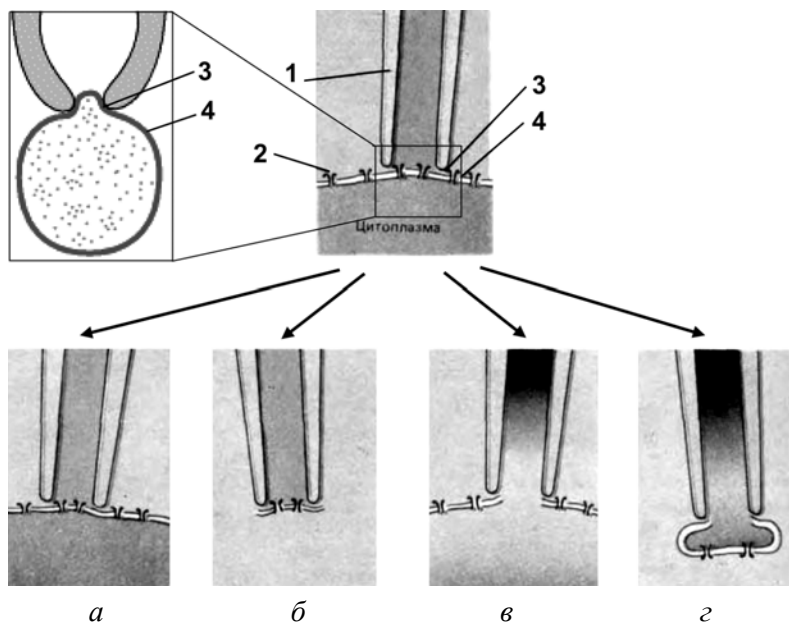


Рисунок 57 – Схема "пэтч"-регистрации: сверху – схема присоединения стеклянной микропипетки (1) к поверхности биомембраны (4) с образованием плотного контакта (3), при котором только два ионных канала (2) оказываются внутри кончика микропипетки. Внизу – четыре стандартных варианта "пэтч"-регистрации

Такой "гигаcontact" (*gigaseal*) гарантирует, что электрический ток, который будет протекать через микропипетку тождественен току, который проходит через присоединенный к кончику микропипетки участок биомембраны.

Использование техники пэтч-контактов позволяет зарегистрировать работу **единичного** ионного канала – изменения тока между открытым и

закрытым состояниями ионного канала с микросекундным разрешением во времени (рисунок 58) [8].

Более того, преимуществом этого метода является исследование работы ионных каналов в естественном мембранном состоянии, причем в неповрежденной клетке.

Метод пэтч-регистрации активности каналов чрезвычайно гибок. Он позволяет как проводить исследования на неповрежденной клетке (рисунок 57(а)), так и манипулировать фрагментами биомембраны.

Можно, например "оторвать" присоединенный к кончику микропипетки фрагмент биомембраны с ионными каналами (рисунок 57(б)) или "прорвать" мембрану и, соединив напрямую цитозоль с внутренней частью электрода (*whole-cell mode*), отслеживать работу всех ионных каналов клетки (рисунок 57(в)).

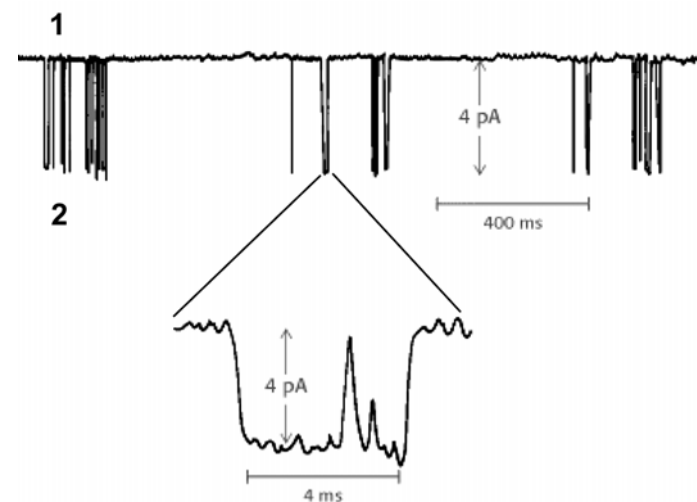


Рисунок 58 – Пэтч-сигнал ацетилхолинового рецептора: 1 – рецептор закрыт; 2 – рецептор открыт. Внизу – зависимость пэтч-тока через микропипетку от времени в увеличенном масштабе

И, наконец, можно, отделив участок мембраны от клетки, моделировать изменение химических условий в клетке за счет введения

определенных веществ через сравнительно толстую регистрирующую микропипетку (рисунок 57(г)).

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. В чем суть пэтч-метода исследования ионных каналов?
2. Сравните четыре стандартных варианта пэтч-регистрации активности ионных каналов.

30. ИОННЫЕ КАНАЛЫ КАК ФЕРМЕНТЫ

Кинетическую теорию переходного состояния Эйринга и Поляни, используемую в ферментативном катализе, успешно применяют для описания различных транспортных систем, в том числе для количественного описания работы молекул-переносчиков и ионных каналов.

В основе этого подхода лежит предположение о том, что система может находиться *в нескольких дискретных состояниях*, каждому из которых соответствует стандартное значение электрохимического потенциала. При этом взаимные переходы между двумя состояниями происходят с преодолением энергетических барьеров и константы скоростей переходов зависят от высоты этих барьеров.

На рисунке 59 представлена схема ионного канала и соответствующие профили свободной энергии. Эти профили (рисунок 59 справа) соответствуют случаю, когда в канале имеется *единственное место связывания*, локализованное где-то вблизи от входа в канал. Глубина впадины (точка Б) отвечает слабому связыванию.

При наличии трансмембранной разности потенциалов на профиль свободной энергии налагается профиль электрического потенциала ($\Delta\psi$). В этом случае высота энергетических барьеров, соответствующих k_1 и k_2 будет меньше и скорость транспорта катионов через канал увеличится. *Минимумы* на кривых изменения свободной энергии (рисунок 59) соответствуют *местам связывания* транспортируемых веществ.

Можно предположить, что канал или переносчик имеет одно или несколько мест связывания переносимых веществ. При достаточно высоких

концентрациях переносимого вещества все эти места оказываются занятыми и скорость переноса достигает своего максимального значения w_{\max} , равного *максимальной скорости работы фермента*.

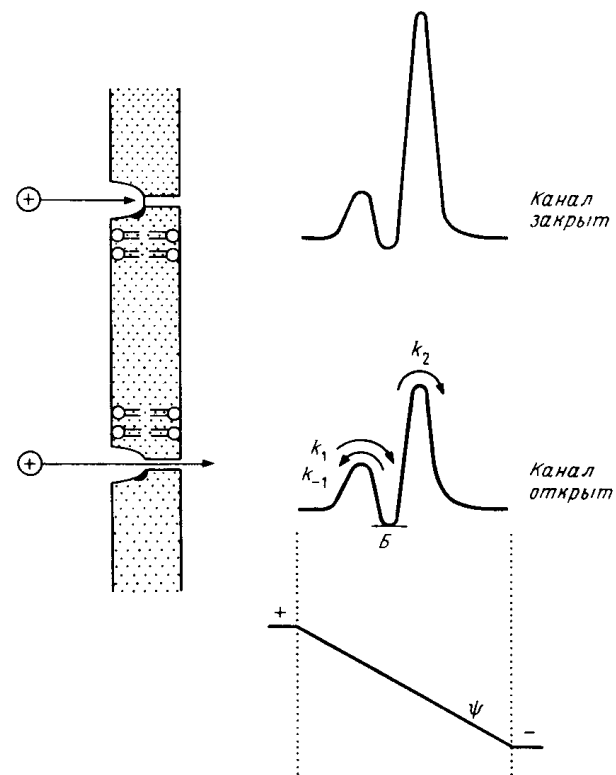
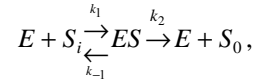


Рисунок 59 – Схема простого ионного канала (слева) с широкими "воротами", ведущими в более узкий канал, через который и проходит ион и соответствующие профили свободной энергии (справа)

Примем для простоты, что ионы изначально присутствуют только с одной стороны мембраны, внутри канала имеется единственное место связывания и что ионы не могут свободно проникать внутрь канала или покидать его.

Необходимо отметить, что случай, когда внутри канала имеется много мест связывания, по которым ион может последовательно передаваться, *формально* сводится к ситуации, когда в канале есть единственное место связывания, и кинетика работы такого фермента по-прежнему описывается уравнением Михаэлиса.

Если принять, что трансмембранное напряжение $\Delta\psi$ равно нулю, то такую "ферментативную реакцию" можно представить следующим образом



где E – канальный белок (фермент) в "открытом" состоянии, S_i и S_0 – транспортируемое вещество (субстрат) внутри и снаружи мембраны, ES – комплекс субстрата с местом связывания внутри канала. На рисунке 59 справа показаны профили свободной энергии для закрытого и открытого каналов.

Для феноменологического рассмотрения процесса переноса иона сквозь мембрану необязательно знать микроскопический механизм блокирования канала, который, например, может заключаться в изменении пространственного положения α -спирали или какой-либо боковой цепи мембранного белка. Достаточно предположить, что кинетика переноса ионов белком-переносчиком (или белком – ионным каналом) описывается моделью ферментативной кинетики, простейшей из которых является модель Михаэлиса-Ментен [17]. Тогда скорость транспорта ионов (число транспортируемых ионов в единицу времени) будет подчиняться *уравнению Михаэлиса*

$$w = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]}$$

где $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ – константа Михаэлиса, $[E]_0$ – суммарная концентрация переносчика.

Рассмотрим два предельных случая.

1. Избыток субстрата $[S] \gg K_M$, при котором все места связывания заняты ($[E]_0 \approx [ES]$) и скорость достигает своего максимального значения, определяемого высотой энергетического барьера для выхода из канала

$$w_{\max} = k_2[E]_0$$

2. Низкая концентрация субстрата $[S] \ll K_M$, при которой наблюдается линейная зависимость скорости от концентрации субстрата

$$w = \left(\frac{k_2}{K_M} \right) \cdot [E]_0[S] = \frac{w_{\max}}{K_M} [S]$$

Полученное уравнение хорошо описывает работу большинства (если не всех) ионных каналов. Даже для такого простого случая константа скорости это не истинная микроскопическая константа скорости, а комбинация констант скоростей

$$\frac{k_2}{K_M} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$$

Таким образом, измеряемая константа скорости, которая определяет скорость транспорта по открытому ионному каналу, содержит информацию о кажущемся средстве иона к месту связывания (K_M) и о числе превращения (числе оборотов) k_2 . В отсутствие напряжения на мембране эта константа скорости прямо связана с проницаемостью, обусловленной единичным каналом.

Если внутренний барьер мал ($k_2 \gg k_{-1}$), то константа скорости транспорта будет равна k_1 – константе скорости второго порядка для иона, входящего в канал. Лимитирующим фактором для этой реакции может служить диффузия, при этом k_1 будет составлять $10^8 - 10^9 \frac{1}{\text{М} \cdot \text{с}}$.

Если внутренний энергетический барьер велик ($k_2 \ll k_{-1}$), то константа скорости транспорта будет равна произведению $\frac{k_1 k_2}{k_{-1}}$.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Как изменяется профиль свободной энергии при открытии ионного канала?

2. Запишите уравнение Михаэлиса.
3. Запишите выражения для скорости транспорта ионов в двух предельных случаях $[S] \gg K_M$ и $[S] \ll K_M$. Охарактеризуйте каждый из этих случаев.

31. НЕРАВНОВЕСНОСТЬ БИОСИСТЕМ

Биохимические процессы, протекающие в клетке, сопровождаются переносом энергии и вещества через биомембраны.

Термодинамика анализирует энергетический баланс и направление протекания химических реакций.

Если рассматривать некоторую *изолированную* часть живой клетки как *равновесную* химическую систему, то ответы на вопросы:

- будет ли данная реакция протекать самопроизвольно?
- может ли она совершать биологически полезную работу?
- как изменение внешних условий влияет на выход и направление реакции?
- какое количество энергии выделяется или поглощается в биохимической реакции?

могут быть найдены с использованием *равновесной* термодинамики. Однако не все свойства биосистем могут быть описаны таким образом. Жизнь есть *принципиально неравновесный* динамический процесс, и для феноменологического описания, в частности, трансмембранных процессов необходимо использовать аппарат неравновесной термодинамики.

Неравновесная термодинамика естественным образом *продолжает* равновесную, включая в себя последнюю как часть, как предельный случай (подобно тому, как релятивистская механика в пределе скоростей намного меньших скорости света переходит в классическую механику).

В неравновесной системе могут возникать силы, например, за счет протекания химических реакций, температурных и концентрационных градиентов, являющихся разностью соответствующих величин в различных участках данной системы.

Силы образуют течения, или *потоки*, которые, в конце концов, истощают силы, их породившие. Все градиенты постепенно исчезают, и система достигает окончательного состояния равновесия.

Например, температурный градиент между двумя точками предмета является источником движущей силы и порождает *поток теплоты* – перенос из горячей в холодную часть тела некоторого количества теплоты через единичную площадь в единицу времени. Этот поток теплоты увеличивает температуру холодного участка за счет горячего и постепенно приводит систему к состоянию теплового равновесия.

Наличие сил и потоков в неравновесной системе означает, что эта система *неоднородна* и что в ней происходят химические процессы.

Стандартным приемом при описании неоднородных систем является разбиение системы на бесконечно малые объемы, в каждом из которых систему можно считать однородной, при этом можно строго определить *локальные переменные* и интегральные свойства всей системы получать, интегрируя по всему объему системы.

Так, для γ -го компонента системы вводится ρ_γ – парциальная масса единицы объема (*парциальная плотность*), при этом плотность $\rho = \sum_\gamma \rho_\gamma$.

Используем молярные величины:

$$s = \frac{S}{n} \text{ – молярная энтропия,}$$

$$v = \frac{V}{n} \text{ – молярный объем,}$$

$$g = \frac{G}{n} = \mu \text{ – молярная энергия Гиббса,}$$

и т. д.

Тогда

$$\tilde{s} = \rho s \text{ – энтропия единицы объема (локальная энтропия),}$$

$$\tilde{y} = \rho \mu \text{ – внутренняя энергия единицы объема (локальная энергия),}$$

и *объем* больше *не является* независимой переменной, поскольку $\rho v = 1$.

Локальная энтропия является функцией локальной энергии и парциальных плотностей $\tilde{s} = \tilde{s}(\tilde{u}, \rho_1, \dots, \rho_\gamma)$ и эта функциональная зависимость описывается соотношением

$$T d\tilde{s} = d\tilde{u} - \sum_{\gamma} \mu_{\gamma} d\rho_{\gamma},$$

которое является частным случаем уравнения Гиббса $du = T ds - p dv + \sum_{\gamma} \mu_{\gamma} dN_{\gamma}$, где N_{γ} – масса данного компонента в одном моле вещества системы.

Общая энтропия системы может быть получена интегрированием локальной энтропии по всему объему системы

$$S = \int_V \tilde{s}(\tilde{u}, \rho_1, \dots, \rho_\gamma) dV.$$

Свойства необратимости и неравновесности состояния выражаются термодинамически через "производство" энтропии (изменение энтропии со временем), и наша задача – связать изменение локальной энтропии во времени с силами (градиентами, сродством) и потоками, которые обеспечивают неравновесность системы.

Производная функции нескольких переменных $\tilde{s} = \tilde{s}(\tilde{u}, \rho_1, \dots, \rho_\gamma)$ по времени

$$\frac{d\tilde{s}}{dt} = \left(\frac{\partial \tilde{s}}{\partial \tilde{u}} \right)_{\rho_1, \dots, \rho_\gamma} \frac{\partial \tilde{u}}{\partial t} + \sum_{\gamma} \left(\frac{\partial \tilde{s}}{\partial \rho_{\gamma}} \right)_{\tilde{u}, \rho_j} \frac{\partial \rho_{\gamma}}{\partial t},$$

где $j \neq \gamma$ и ρ_{γ} – все независимые переменные, сумма которых $\sum_{\gamma} \rho_{\gamma}$ в отличие от закрытых систем может не быть постоянной.

Из уравнения Гиббса $T d\tilde{s} = d\tilde{u} - \sum_{\gamma} \mu_{\gamma} d\rho_{\gamma}$ определяем

$$\left(\frac{\partial \tilde{s}}{\partial \rho_{\gamma}} \right)_{\tilde{u}, \rho_j} = \frac{\mu_{\gamma}}{T}, \quad \left(\frac{\partial \tilde{s}}{\partial \tilde{u}} \right)_{\rho_1, \dots, \rho_\gamma} = \frac{1}{T}.$$

Далее, чтобы определить потоки воспользуемся гидродинамическими соотношениями, основанными на законе сохранения массы.

Закон сохранения массы требует, чтобы изменение во времени массы вещества в некоторой области системы (если взять единичный объем, то, фактически, это будет изменение плотности вещества) обуславливалось только потоками вещества через границу этой области. При этом, неоднородность системы как и прежде учитывается введением локальных переменных, использованием плотности, вместо массы, устремлением объема V , рассматриваемой области к нулю, то есть переходом от интегральных параметров к локальным (в данной точке системы).

В этом случае закон сохранения массы связывает производную парциальной плотности данного компонента γ по времени **в данной точке** пространства со скалярным потоком векторного поля \vec{J}_d^{γ} – диффузионным потоком вещества **наружу** через поверхность, окружающую данную точку. Для обеспечения локальности мы устремляем объем области под поверхностью к нулю, таким образом

$$\frac{\partial \rho_{\gamma}}{\partial t} = -\text{div} \vec{J}_d^{\gamma}$$

В декартовых координатах, вводя компоненты потока вдоль осей x, y, z , записывают

$$\frac{\partial \rho_{\gamma}}{\partial t} = - \left(\frac{\partial J_x^{\gamma}}{\partial x} + \frac{\partial J_y^{\gamma}}{\partial y} + \frac{\partial J_z^{\gamma}}{\partial z} \right)$$

Таким образом, это соотношение является **математической записью закона сохранения массы** – в данной точке плотность вещества может уменьшиться только за счет положительного потока вещества наружу через поверхность замыкающую бесконечно малый объем вокруг данной точки.

Кроме потока вещества изменение плотности вещества в данной точке может происходить **за счет химических реакций**, из которых образуется данный компонент (которые являются источниками данного компонента). В этом случае необходимо добавить соответствующее слагаемое в правую часть уравнения

$$\frac{\partial \rho_{\gamma}}{\partial t} = -\text{div} \vec{J}_d^{\gamma} + \sum_r \nu_{r\gamma} \nu_r,$$

где v_r – скорость, $v_{r\gamma}$ – стехиометрический коэффициент γ -го компонента в r -й реакции.

Совершенно аналогично, **закон сохранения энергии** требует, чтобы локальное изменение энергии в данной точке (в отсутствии процессов конвекции, механической работы или любых других внешних сил) происходило только **за счет потока энергии** \vec{J}_e через такую же поверхность, окружающую данную точку, поэтому запишем

$$\frac{\partial \tilde{u}}{\partial t} = -\text{div} \vec{J}_e.$$

Если теплота – единственная форма внутренней энергии, то локальное изменение внутренней энергии связано с потоком теплоты \vec{J}_q

$$\frac{\partial \tilde{u}}{\partial t} = -\text{div} \vec{J}_q.$$

Подставим теперь в уравнение

$$\frac{d\tilde{s}}{dt} = \left(\frac{\partial \tilde{s}}{\partial \tilde{u}} \right)_{\rho_1, \dots, \rho_\gamma} \frac{\partial \tilde{u}}{\partial t} + \sum_\gamma \left(\frac{\partial \tilde{s}}{\partial \rho_\gamma} \right)_{\tilde{u}, \rho_j} \frac{\partial \rho_\gamma}{\partial t},$$

значения из выражений

$$\left(\frac{\partial \tilde{s}}{\partial \rho_\gamma} \right)_{\tilde{u}, \rho_j} = \frac{\mu_\gamma}{T}, \quad \left(\frac{\partial \tilde{s}}{\partial \tilde{u}} \right)_{\rho_1, \dots, \rho_\gamma} = \frac{1}{T}, \quad \frac{\partial \rho_\gamma}{\partial t} = -\text{div} \vec{J}_d^\gamma, \quad \frac{\partial \tilde{u}}{\partial t} = -\text{div} \vec{J}_q$$

получим

$$\frac{d\tilde{s}}{dt} = -\frac{1}{T} \text{div} \vec{J}_q - \sum_\gamma \frac{\mu_\gamma}{T} \text{div} \vec{J}_d^\gamma = -\text{div} \left(\frac{\vec{J}_q}{T} + \frac{1}{T} \sum_\gamma \mu_\gamma \vec{J}_d^\gamma \right) = -\text{div} \vec{J}_s,$$

В действительности нужно еще учесть производство энтропии за счет необратимых процессов

$$\frac{d\tilde{s}}{dt} = -\text{div} \vec{J}_s + \sigma,$$

где **первое слагаемое** – потоковый член – дивергенция векторного поля потока энтропии \vec{J}_s , который обусловлен двумя процессами: (1) тепловым потоком $\frac{\vec{J}_q}{T}$ и (2) диффузионным потоком химических веществ $\frac{1}{T} \sum_\gamma \mu_\gamma \vec{J}_d^\gamma$.

Второе слагаемое σ описывает интенсивность локального производства энтропии (**источник энтропии**), вызванного различными необратимыми процессами под действием обобщенных сил X_i которые являются причиной появления соответствующих обобщенных потоков \vec{J}_i (таблица 4)

$$\sigma = \sum_i J_i X_i.$$

Векторные обозначения здесь опущены, поскольку обобщенные потоки и обобщенные силы могут быть и скалярными величинами. Например, в химической реакции роль обобщенной силы играет сродство, а роль обобщенного потока выполняет скорость химической реакции (таблица 4).

Таблица 4 – Примеры обобщенных сил, действующих в различных необратимых процессах, и порождаемых ими обобщенных потоков

Необратимые процессы	Силы	Потоки
Диффузия	$\text{grad} \left(-\frac{\mu}{T} \right)$	\vec{J}_d
Теплоперенос	$\text{grad} \frac{1}{T}$	\vec{J}_q
Химическая реакция	$\frac{A_i}{T}$	v_i

Общее изменение энтропии системы

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \int_V (-\text{div} \vec{J}_s + \sigma) dV = -\int_\Omega \vec{J}_s \cdot \overline{d\Omega} + \int_V \sigma dV = \frac{\partial_e S}{\partial t} + \frac{\partial_i S}{\partial t}$$

можно представить в виде двух слагаемых.

Энтропия системы может изменяться за счет

(1) потока энтропии через границу Ω системы

$$\frac{\partial_e S}{\partial t} = -\int_\Omega \vec{J}_s \cdot \overline{d\Omega},$$

(2) производства энтропии внутри системы

$$\frac{\partial_i S}{\partial t} = \int_V \sigma dV.$$

Если мы изолируем систему то внешних энтропийных потоков, то, *согласно второму началу* термодинамики, энтропия *изолированной* системы может только *увеличиваться*, следовательно

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \frac{\partial_i S}{\partial t} \geq 0$$

или

$$\frac{\partial_i S}{\partial t} = \int_V \sigma dV = \int_V \sum_i J_i X_i dV \geq 0,$$

откуда следует условие

$$\sum_i J_i X_i \geq 0.$$

Таким образом, *сумма всех значений* величин $J_i X_i$ не должна быть отрицательной, в то время как отдельные значения $J_i X_i$ могут быть отрицательными.

Заметим, что в литературе используют также так называемую *диссипативную функцию* Φ (или *функцию диссипации*), которая равна интенсивности производства энтропии, умноженной на температуру

$$\Phi = T\sigma.$$

Обобщенные потоки зависят от обобщенных сил (поскольку ими вызываются) и наоборот – скорость химической реакции зависит от сродства, поток тепловой энергии – от разности температур. В общем виде

$$J_i = J_i(X_1, \dots, X_n), \quad X_i = X_i(J_1, \dots, J_n).$$

В состоянии равновесия обобщенные силы обращаются в нуль и не вызывают никаких потоков. *Вблизи равновесия* величина обобщенных сил мала и, соответственно, величина потоков тоже мала. Поэтому, разложив потоки *в ряд Тейлора*

$$J_i = J_i^{равн} + \sum_j \left(\frac{\partial J_i}{\partial X_j} \right)_{равн} X_j + \dots,$$

мы можем ограничиться только линейными членами (по определению $J_i^{равн} = 0$)

$$J_i = \sum_j \left(\frac{\partial J_i}{\partial X_j} \right)_{равн} X_j.$$

Область применимости такого линейного подхода называется *термодинамикой линейных необратимых процессов*.

Феноменологические коэффициенты пропорциональности между обобщенными потоками и обобщенными силами $L_{ij} = \left(\frac{\partial J_i}{\partial X_j} \right)_{равн}$

рассчитываются в равновесном состоянии.

В линейном приближении

$$J_i = \sum_j L_{ij} X_j.$$

Коэффициенты L_{ii} называются *прямыми (несопряженными)* коэффициентами, они отражают тот факт, что в данный поток вызывает своя же собственная сила.

Когда два индекса различны, L_{ij} , коэффициенты называются *сопряженными*, и в этом случае они означают, что сила j создает поток i .

Простые *примеры* линейных соотношений:

1) закон теплопроводности Фурье (обобщенная сила – разность обратных температур, обобщенный поток – поток теплоты)

$$\bar{J}_q = L_{qq} \text{grad} \frac{1}{T} = -L_{qq} \frac{\text{grad} T}{T^2} = -\lambda \text{grad} T,$$

где $\lambda = \frac{L_{qq}}{T^2}$ – коэффициент удельной теплопроводности;

2) закон Ома (обобщенная сила – разность потенциалов, обобщенный поток – сила тока) $I = L_{qq} U$, где L_{qq} – проводимость среды;

3) закон диффузии Фика (обобщенная сила – разность концентраций (химических потенциалов), обобщенный поток – поток вещества)

$$\bar{J}_d^\gamma = -L_{dd} \left(\text{grad} \frac{\mu_\gamma}{T} \right)_{T,p} = -D_\gamma \text{grad} \rho_\gamma,$$

где $D_\gamma = \frac{L_{dd}}{T} \left(\frac{\partial \mu_\gamma}{\partial \rho_\gamma} \right)_{T,p}$ – коэффициент диффузии компонента γ в разбавленном растворе.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Что такое обобщенные силы и обобщенные потоки?
2. Запишите закон сохранения массы через дивергенцию потока вещества.
3. Запишите, как выражается интенсивность локального производства энтропии в данной точке системы через обобщенные силы и обобщенные потоки.

32. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ТЕРМОДИНАМИКИ НЕРАВНОВЕСНЫХ ПРОЦЕССОВ

Если в системе действуют n сил, вызывающих n потоков, то для установления функциональной зависимости между ними нужно экспериментально определить $n \times n$ феноменологических коэффициентов.

В действительности число независимых феноменологических коэффициентов меньше – их число снижает:

1) симметрия системы – в случае симметричной изотропной среды каждый поток необязательно должен сопрягаться со всеми силами,

2) **соотношение взаимности Онзагера (теорема Онзагера)** – феноменологические коэффициенты образуют симметричную матрицу

$$L_{ij} = L_{ji}.$$

Далее, несопряженные коэффициенты всегда положительны $L_{ii} > 0$. Действительно, рассмотрим систему, в которой есть только два потока, например, температуры и вещества, тогда

$$J_q = L_{qq} X_q + L_{qd} X_d, \quad J_d = L_{dd} X_d + L_{dq} X_q$$

$$\sigma = \sum_i J_i X_i = J_q X_q + J_d X_d = L_{qq} X_q^2 + (L_{qd} + L_{dq}) X_q X_d + L_{dd} X_d^2 \geq 0$$

Пусть, далее, исчезает температурный градиент, а остается только концентрационный, т.е. $X_q = 0$, $X_d \neq 0$, тогда $\sigma = L_{dd} X_d^2 \geq 0$, следовательно

$L_{dd} > 0$. Аналогично, оставляя только температурный градиент, можно показать, что $L_{qq} > 0$. Кроме того, $(L_{qd} + L_{dq})^2 < 4L_{qq}L_{dd}$, откуда следует

$$L_{qq}L_{dd} \geq (L_{qd})^2$$

В общем случае для линейных систем и для произвольного числа сил и потоков можно показать, что

$$L_{ii} > 0, \quad L_{ii}L_{jj} \geq (L_{ij})^2.$$

Сформулируем (без доказательства) ещё **несколько принципов** термодинамики неравновесных процессов.

Как уже говорилось выше, второе начало термодинамики требует выполнения условия $\sum_i J_i X_i \geq 0$, которое относится к сумме **в целом**.

Отдельные члены этой суммы могут быть отрицательными. Это означает, что отдельный, индивидуальный поток J_i с $J_i X_i < 0$ невозможен, поскольку это противоречит второму началу. Однако, **благодаря сопряжению с другими потоками** J_j , для которых $J_j X_j > 0$, в открытой системе оказывается возможным поток, немислимый в системе изолированной. Должно лишь выполняться условие $\sum_{j \neq i} J_j X_j > |J_i X_i|$.

Сопряжение определяется **отличием от нуля** недиагональных **сопряженных** коэффициентов L_{ij} .

Например, смесь двух газов в сосуде, стенки у которого находятся при различных температурах, самопроизвольно разделяется так, что у горячей стенки больше содержание одного газа, у холодной – другого.

Это явление называется **термодиффузией**.

Поток вещества идет в направлении, **противоположном** направлению падения концентрации, так как он **сопряжен** с потоком теплоты, идущим от горячей стенки к холодной. Дефицит энтропии в одном процессе перекрывается её избыточным производством в другом.

Мы видим, что производство энтропии в открытой системе в принципе обеспечивает протекание процессов, невозможных в изолированных системах. Это принципиально важно для понимания энтергонических процессов в биосистемах.

Сопряжение химических реакций в открытой системе делает возможным протекание эндергонических реакций, запрещенных в изолированных системах, так как при этих реакциях возрастает свободная энергия.

Например, **образование** каждой **пептидной связи** при синтезе белка происходит с выделением одной молекулы воды. Так как в клетке вода содержится в избытке, должна преобладать обратная реакция – реакция гидролиза пептидных связей.

Синтез полипептидной цепи становится возможным благодаря **сопряжению с экзергонической** реакцией расщепления (гидролиза) АТФ и функция диссипации в целом положительна.

Сопряжение эндергонических процессов с гидролизом АТФ имеет общее значение в биологии. Посредством сопряжения реализуется универсальная роль АТФ как донора свободной энергии, необходимой для протекания эндергонических процессов. Если бы клетки и организмы были изолированными системами, АТФ не могла бы играть этой роли.

Неравновесная термодинамика **уже в линейном приближении** доказывает возможность протекания в открытых системах процессов, запрещенных в изолированных системах. Это имеет фундаментальное значение для биологии.

Потоки и силы могут быть как скалярными, так и векторными. В **изотропной** системе (в системе, свойства которой одинаковы во всех направлениях) на сопряжение потоков накладывается ограничение, известное как **принцип Кюри**, смысл которого заключается в том, что **невозможно сопряжение между скалярными потоками** (например, химические реакции) **и векторными потоками** (например, тепловые потоки) – скаляр не может быть причиной вектора и вектор – скаляра (сила не может быть причиной потока, имеющего другую тензорную размерность).

Другая формулировка принципа Кюри: **внешние воздействия, вызывающие различные явления, не могут обладать более высокой симметрией, чем порождаемый ими эффект.**

Принцип Кюри справедлив и для случая анизотропной системы, имеющей в состоянии равновесия центр симметрии.

Во всех остальных случаях **анизотропии**, а также в **нелинейной** области (когда отклонения системы от состояния равновесия нельзя считать малыми и нельзя пренебрегать нелинейными членами ряда Тейлора), когда свойство изотропии исчезает независимо от структуры среды при равновесии, принцип Кюри **неприменим.**

Теорема Пригожина: в стационарном состоянии, близком к равновесию, продукция энтропии σ минимальна.

Открытая система может находиться в стационарном, хотя и неравновесном состоянии. В этом состоянии продукция энтропии внутри системы в точности компенсируется оттоком энтропии в окружающую среду, так что суммарная энтропия системы не меняется

$$dS = d_e S + d_i S = 0.$$

Такое стационарное состояние называется **состоянием проточного равновесия.**

Стационарное состояние открытой системы реализуется, если на систему наложены ограничения, фиксирующие постоянные значения части обобщенных сил, а остальные обобщенные силы могут меняться.

Например, пусть в системе действуют две обобщенные силы X_1 и X_2 , первая из которых фиксирована $X_1 = const$ (например, первая сила – это фиксированный градиент температур, который не меняется).

Как было показано выше, производство энтропии описывается соотношением

$$\sigma = \sum_i J_i X_i = J_1 X_1 + J_2 X_2 = L_{11} X_1^2 + (L_{12} + L_{21}) X_1 X_2 + L_{22} X_2^2.$$

Поскольку $L_{22} > 0$, то вторая производная по X_2 (при $X_1 = const$)

$$\frac{\partial^2 \sigma}{\partial X_2^2} = 2L_{22} > 0.$$

Следовательно, **в стационарном состоянии, близком к равновесию, продукция энтропии σ минимальна.**

Теорема Пригожина справедлива только в пределах применимости линейной термодинамики.

Организм, клетка – химические машины, функционирующие в результате химических реакций и переноса вещества между клеткой и

окружающей средой, а также внутри клетки. Перенос имеет определенное направление, перпендикулярное к внешней клеточной и внутриклеточным биомембранам.

Поток вещества есть вектор. В то же время скорость химической реакции – скаляр. Прямое сопряжение скалярного и векторного процессов в изотропной среде невозможно в силу принципа Кюри.

Однако биомембраны являются **принципиально анизотропными системами**, построенными из молекул, лишенных плоскости и центра симметрии. Именно анизотропность мембран позволяет сопрягать скалярные и векторные процессы – процессы переноса вещества с химическими реакциями.

Наличие мембран обеспечивает **преувеличенность** биосистем. Биомембрана является той перегородкой, которая позволяет поддерживать разность параметров среды по разные стороны мембраны, обеспечивая **скачок** какого либо параметра системы (например, концентрации какого-либо компонента или электрического потенциала) на мембране.

Биологические мембраны принципиально отличаются от искусственных небиологических полупроницаемых мембран (например, пористых резиновых перегородок, разделяющих две жидкие фазы) существованием процессов **облегченного** и **активного** транспорта, которые можно описать, только используя методы неравновесной термодинамики.

Например, K^+Na^+ -АТФаза обеспечивает одновременный перенос ионов натрия и калия через мембрану. Мы можем выделить **"обменную" силу**

$$X_{обм} = \Delta\mu_{Na^+} - \Delta\mu_{K^+},$$

которая описывает общий ионный обмен через мембрану. Суммарный обменный поток $J_{обм}$ обозначает, что K^+ -ионы обмениваются на Na^+ -ионы.

Остальные (*rest*) сопряженные силы X_r обеспечивают химические потоки J_r . Тогда производство локальной энтропии внутри мембраны

$$\sigma = X_{обм}J_{обм} + X_rJ_r$$

и соответственно в линейном приближении

$$J_{обм} = L_{11}X_{обм} + L_{12}X_r$$

$$J_r = L_{21}X_{обм} + L_{22}X_r$$

По определению в активном транспорте поток $J_{обм}$ направлен **против** действия сил $X_{обм}$. Это возможно только тогда, когда коэффициенты $L_{12} = L_{21}$ **не равны нулю**.

Действительно, согласно условию $L_{ii} > 0$ коэффициент L_{11} должен быть положительной величиной. Следовательно, если $L_{12} = 0$, то из $J_{обм} = L_{11}X_{обм} + L_{12}X_r$ следует, что $J_{обм}$ и $X_{обм}$ должны иметь одинаковый знак, и активный транспорт становится невозможным. Если же сопряженный член $L_{12}X_r$ принимает отрицательные значения, направление потока $J_{обм}$ обращается против силы $X_{обм}$.

Из уравнения $\sigma = X_{обм}J_{обм} + X_rJ_r$ видно, что **активный транспорт вносит отрицательный вклад в производство энтропии**, уменьшая ее значение. Без сопряжения потоков и сил различного рода процессы, приводящие к понижению значения энтропии, были бы невозможны.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Запишите соотношение взаимности Онзагера.
2. Сформулируйте принцип Кюри.
3. Сформулируйте теорему Пригожина.

33. МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ КОНТАКТЫ И СИГНАЛИЗАЦИЯ

У одноклеточных организмов единственная клетка осуществляет все функции, необходимые для жизнедеятельности: она передвигается, усваивает питательные вещества из окружающей среды, в процессе обмена веществ извлекает из них энергию и синтезирует молекулы.

Эволюция многоклеточных организмов основана на способности клеток **поддерживать связь друг с другом**. Эта способность необходима для регуляции развития клеток и для их организации в ткани, для контроля роста и деления клеток и для координации их разнообразной активности. Та или иная задача решается силами многих совершенно различных клеточных популяций, тканей и органов, часто находящихся на значительном расстоянии друг от друга. Для осуществления различных функций организма должны существовать

механизмы, посредством которых отдельные клетки или их группы могли бы **взаимодействовать** между собой. Роль биомембран в этих процессах является определяющей.

Между соседними клетками может поддерживаться **непосредственная связь** при помощи высокопроницаемых контактов, которые называют **щелевыми соединениями**.

Основная роль в координации функции клеток организма принадлежит нервной и эндокринной системе.

Чаще всего нервные клетки, также как и эндокринные, осуществляют **химическую сигнализацию**. Отличие между химической и эндокринной сигнализацией состоит в том, что нервные клетки передают сигналы значительно быстрее, чем эндокринные. В виде потенциала действия электрический сигнал быстро распространяется по нервному волокну. В нервном окончании он преобразуется в химический сигнал. Здесь происходит выделение **нейромедиатора**. Нейромедиатор достигает клетки-мишени путем диффузии на микроскопически малое расстояние, что обычно занимает менее одной миллисекунды.

Эндокринная система осуществляет секрецию многообразной группы веществ, называемых **гормонами**. Гормоны доставляются кровью к месту их действия. Они специфическим образом меняют активность определенных чувствительных к ним клеток-мишеней.

Гормоны, выделяемые эндокринными клетками, попадая в кровоток, очень сильно разбавляются. Они способны действовать в чрезвычайно низких концентрациях – ниже 10^{-8} М/л.

Медиаторы разбавляются незначительно. Их концентрация у определенного участка клетки-мишени может быть велика. Например, концентрация ацетилхолина в синаптической щели нервно-мышечного соединения достигает приблизительно $5 \cdot 10^{-4}$ М/л. В других отношениях механизмы химической сигнализации с помощью гормонов и медиаторов в общих чертах сходны, и многие сигнальные молекулы, используемые эндокринными клетками, являются также и медиаторами.

Способность клетки реагировать на определенные сигнальные молекулы зависит от наличия у нее специфических **белков-рецепторов**, которые связывают эти молекулы.

Щелевые соединения между клетками (*Gap Junctions*) позволяют небольшим водорастворимым молекулам **непосредственно переходить** из цитоплазмы одной клетки в цитоплазму другой и обеспечивают электрическое и **метаболическое сопряжение** клеток.

Щелевые соединения построены из белков, выступающих из плазматической мембраны и образующих структуры, называемые **коннексонами** (рисунок 60) [8]. Они соединяют цитозоль двух взаимодействующих клеток непрерывным **водным каналом**. Каждый коннексон состоит из шести белковых субъединиц – **коннексинов**. В результате соединения **двух** коннексонов образуется канал, связывающий одну клетку с другой. Эффективный диаметр водного канала составляет 1,5–2 нм.

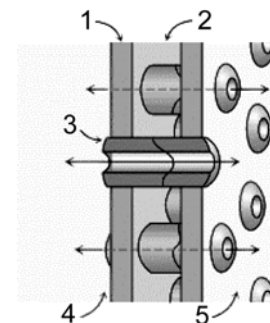


Рисунок 60 – Схема щелевого соединения: 1 – плазматическая мембрана; 2 – межклеточное пространство; 3 – коннексон (полуканал); 4 – цитозоль первой клетки; 5 – цитозоль второй клетки

Щелевые соединения, благодаря электрическому сопряжению, обеспечивают **синхронизацию** сокращения клеток сердечной мышцы и клеток гладкой мускулатуры. Электрические синапсы, формируемые щелевыми соединениями, позволяют потенциалам действия

распространяться с клетки на клетку без задержки, происходящей в химических синапсах.

Сопряжение клеток через щелевые соединения играет важную роль в *эмбриогенезе*. У раннего эмбриона большинство клеток электрически сопряжены друг с другом. Предполагают, что имеющееся в этом случае и метаболическое сопряжение может служить важным *способом распределения питательных веществ* до того как разовьется система кровообращения.

Проницаемость щелевых соединений регулируется *ионами кальция*. Уменьшение межклеточных связей происходит при погружении ткани в раствор с очень низкой концентрацией ионов Ca^{2+} . Что же касается внутриклеточной концентрации Ca^{2+} то межклеточные каналы полностью открыты при концентрации Ca^{2+} ниже 10^{-7} М/л и полностью закрыты при концентрации кальция, превышающей $5 \cdot 10^{-5}$ М/л.

При гибели или повреждена клетки необходимо, чтобы она быстро отсоединилась от своих соседей. Это происходит в результате сильного повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , который либо входит в клетку через поврежденную плазматическую мембрану либо накапливается из-за того, что поврежденная клетка не способна эффективно откачивать Ca^{2+} из цитозоля.

Нервные клетки (рисунок 61) [28] образуют со своими клетками-мишенями специализированные контакты, которые названы *синапсами*. Название "синапс" было дано английским нейрофизиологом Ч. Шеррингтоном в конце прошлого столетия.

У млекопитающих обычно встречаются *химические синапсы* (рисунок 62) [29]. В синапсах этого типа при поступлении потенциала действия к окончанию аксона происходит освобождение химического вещества, которое вызывает возбуждение или торможение в иннервируемой клетке.

Значительно реже встречаются *электрические синапсы*. Здесь потенциал действия в нервном окончании через щелевые соединения вызывает в иннервируемой клетке возбуждение или торможение без выделения химического вещества.

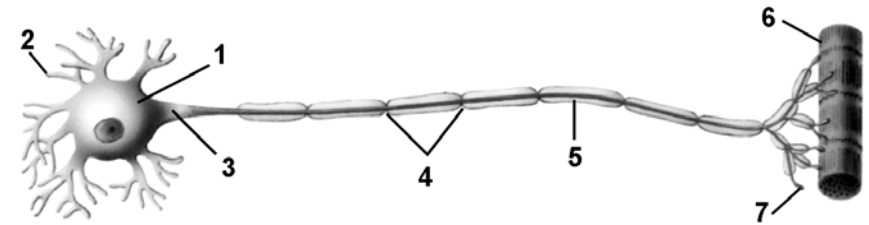


Рисунок 61 – Схема нейрона позвоночных: 1 – тело нервной клетки; 2 – дендриты рецепторов; 3 – аксон; 4 – перехваты Ранвье; 5 – миелиновая оболочка; 6 – мышца; 7 – пресинаптическое окончание нейрона

У некоторых организмов обнаружены *синапсы смешанного типа*, в которых передача осуществляется как электрическим, так и химическим путем.

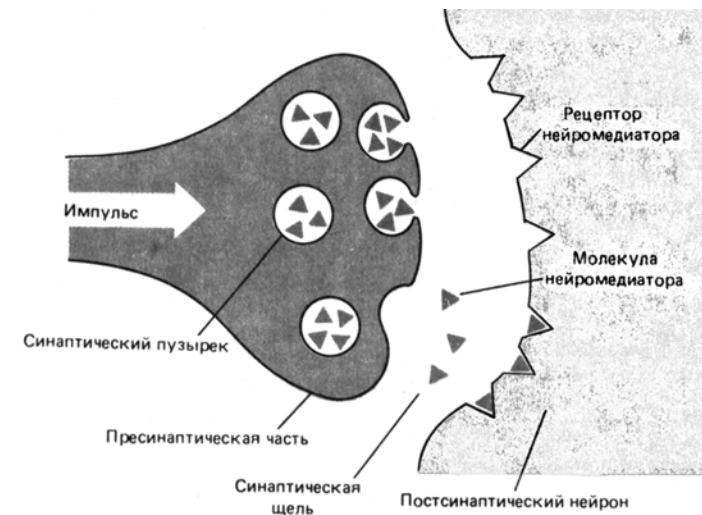


Рисунок 62 – Схема химического синапса

Характерной *особенностью химических синапсов* является присутствие в пресинаптической структуре (нервном окончании) внутриклеточных *синаптических пузырьков* диаметром 20–80 нм. Они содержат высокие концентрации *нейромедиаторов*.

В химических синапсах пресинаптическая и постсинаптическая области отделены друг от друга *синаптической щелью* шириной 10–50 нм. Расчеты показывают, что при такой ширине щели электрическая передача возбуждения практически невозможна из-за значительного шунтирующего эффекта.

В химических синапсах сигналы передаются только в одном направлении — от пресинаптического участка к постсинаптическому.

Для химических синапсов характерна *синаптическая задержка*. Она представляет собой интервал между возникновением потенциала действия в нервном окончании и синаптическим потенциалом в постсинаптической области синапса (постсинаптическим потенциалом).

Синаптическая задержка в синапсах млекопитающих составляет приблизительно 0,3 мс. В некоторых случаях она может быть значительно большей.

Часть задержки связана с (1) событиями, вызывающими *процесс секреции* нейромедиатора; (2) определенный компонент задержки обусловлен *диффузией нейромедиатора* через синаптическую щель и связыванием его с рецептором. В некоторых синапсах взаимодействие нейромедиатора с рецептором вызывает (3) *появление вторичного посредника*, который, в свою очередь, активирует ионные каналы, что вызывает появление постсинаптического потенциала. Эти события также вносят определенный вклад в синаптическую задержку.

При изучении химических синапсов нередко возникают большие трудности при *идентификации нейромедиаторов*.

Вещество можно рассматривать как медиатор, если оно удовлетворяет следующим *критериям*:

- а) синтезируется в нейроне;
- б) присутствует в пресинаптическом окончании и освобождается в достаточном количестве, чтобы оказать соответствующее воздействие на клетку-мишень;
- в) когда прикладывается к области синапса в соответствующих концентрациях, то имитирует действие освобожденного из окончания медиатора;

г) существует специальный механизм, удаляющий рассматриваемое вещество из синаптической щели.

В настоящее время в качестве медиаторов достоверно идентифицированы следующие вещества (рисунок 63) [30]: ацетилхолин; катехоламины – дофамин, адреналин и норадреналин; 5-гидрокситриптамин (серотонин); гистамин; возбуждающие дикарбоновые аминокислоты – глутаминовая и аспарагиновая; тормозящие аминокислоты – γ -аминомасляная кислота (ГАМК) и глицин. (Катехоламины и 5-гидрокситриптамин относят к группе веществ, носящих название *биогенные амины*.)

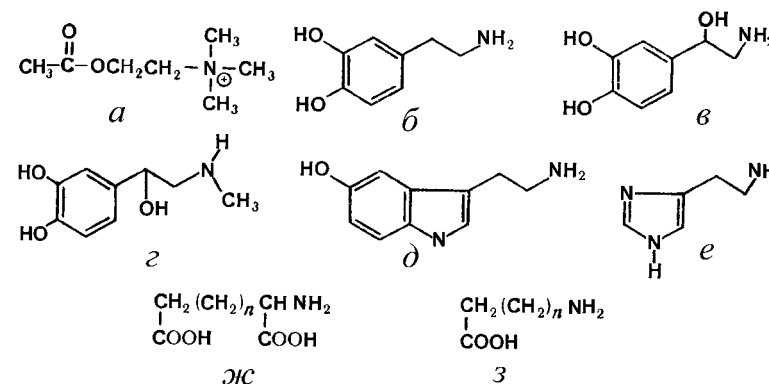


Рисунок 63 – Нейромедиаторы: а – ацетилхолин; б – дофамин; в – норадреналин; з – адреналин; д – 5-гидрокситриптамин (серотонин); е – гистамин; ж – возбуждающие дикарбоновые аминокислоты n = 0–1 (глутамат, аспартат); з – тормозящие аминокислоты n = 0–4 (γ -аминомасляная кислота, глицин)

Ферменты, катализирующие синтез перечисленных низкомолекулярных нейромедиаторов, синтезируются на полирибосомах в теле нейрона, а затем, благодаря системе аксонного транспорта, они могут распространяться в нервные окончания. Здесь, в цитозоле, могут синтезироваться нейромедиаторы.

Наиболее изученным химическим возбуждающим синапсом является *нервно-мышечное соединение позвоночных* (двигательная

концевая пластинка) на исчерченных скелетных мышечных волокнах амфибий. Медиатором здесь служит **ацетилхолин**.

Пришедший к синапсу нервный импульс вызывает высвобождение ацетилхолина в синаптическую щель. Далее молекулы ацетилхолина диффундируют через щель и достигают постсинаптической мембраны, где связываются со специфическими рецепторными молекулами. Это приводит к деполяризации постсинаптической мембраны, и далее к возникновению в мышечном волокне распространяющегося потенциала действия.

Схема ацетилхолинового рецептора представлена на рисунке 64 [26,28].

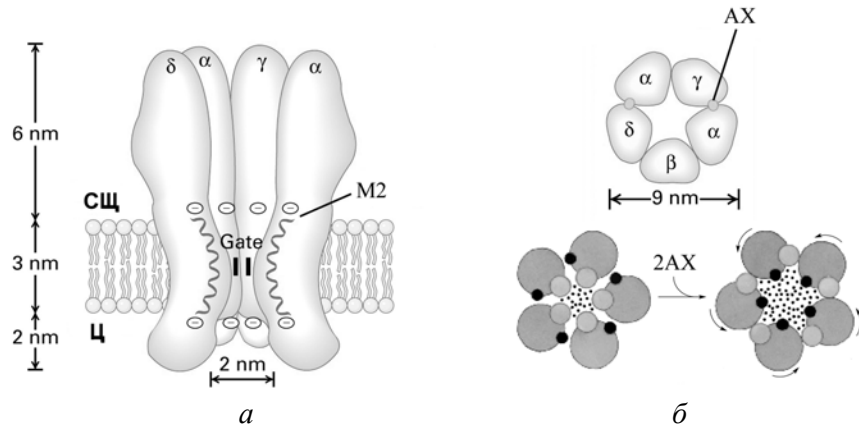


Рисунок 64 – Схема ацетилхолинового (АХ) рецептора: *а* – вид сбоку, *б* – сверху – вид сверху, показаны места присоединения молекул ацетилхолина; внизу – схема конформационных поворотов субъединиц, открывающих канал для ионов K^+ и Na^+

Рецептор состоит из пяти трансмембранных субъединиц, формирующих канал между синаптической щелью (СЩ) и цитоплазмой (Ц) постсинаптической клетки.

Каждая из пяти трансмембранных субъединиц АХ-рецептора состоит из четырех белковых α -спиралей, но только М2-спираль обладает ярко выраженной гидрофобностью. В отсутствие ацетилхолина М2-спирали

субъединиц перекрывают канал. Присоединение двух молекул ацетилхолина вызывает **конформационный поворот** субъединиц (рисунок 64(б)) так, что М2-спирали уходят из канала, канал заполняется водой и диффузия ионов K^+ и Na^+ через канал становится возможной.

За полупериод жизни открытого канала, равный всего лишь 1 мс, по нему проходит примерно 10^4 ионов. Продолжительное воздействие ацетилхолина на рецептор приводит к его **десенситизации**: канал закрывается и реакция на ацетилхолин исчезает на длительный промежуток времени.

Изучение передачи нервного импульса в участках нервномышечного соединения показало, что ацетилхолин высвобождается из пресинаптической мембраны порциями (**квантами**) по 10^4 молекул.

Доказательство квантового высвобождения ацетилхолина было получено при анализе мембранного потенциала двигательной концевой пластинки, которой свойственна спонтанная электрическая активность даже в отсутствие стимуляции нерва. Деполяризующие импульсы с амплитудой 0,5 мВ и длительность около 20 мс возникают залпами. Это так называемые миниатюрные потенциалы концевых пластинок; они возникают случайно с вероятностью, сохраняющейся постоянной на протяжении длительного времени. Миниатюрный потенциал концевой пластинки вызывается спонтанным высвобождением одиночного синаптического пузырька. Деполяризация концевой пластинки, создаваемая потенциалом действия, обусловлена синхронным высвобождением примерно 100 квантов ацетилхолина. Таким образом, высвобождение ацетилхолина представляет собой **электрически регулируемую форму секреции**.

Высвобождение ацетилхолина зависит от присутствия Ca^{2+} во внеклеточной жидкости. При деполяризации пресинаптической мембраны происходит вход Ca^{2+} , что способствует слиянию мембраны синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной.

В последние годы сделаны большие успехи в очистке никотиновых ацетилхолиновых рецепторов и реконструировании функционально

активных мембранных пузырьков. Наиболее подходящий исходный материал для таких исследований – электрический орган ската *Torpedo*, который очень богат ацетилхолиновыми рецепторами.

Для восстановления возбудимости постсинаптической мембраны необходимо выключение деполяризующего сигнала. Эту функцию выполняет *ацетилхолинэстераза*. Фермент гидролизует ацетилхолин до ацетата и холина. В результате проницаемость постсинаптической мембраны возвращается к исходному уровню и мембрана реполяризуется. Ацетилхолинэстераза локализована в синаптической щели. Молекулярная масса фермента — 260000, субъединичная структура – $\alpha_2\beta_2$. Фермент характеризуется поразительно высоким числом оборотов, а именно 25000 с^{-1} . Это означает, что одна молекула ацетилхолина расщепляется за 40 мкс. Такое высокое число оборотов фермента имеет очень важное значение для быстрого восстановления поляризованного состояния постсинаптической мембраны. Синапсы способны передавать тысячу импульсов в секунду только потому, что постсинаптическая мембрана восстанавливает свою поляризованность за доли миллисекунды.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Как устроены щелевые межклеточные соединения?
2. Каков механизм передачи сигнала через синапс?
3. Какова функция синаптических пузырьков?
4. Какие вы знаете нейромедиаторы?
5. В чем отличие нейромедиаторов и гормонов?

34. СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ БИОМЕМБРАН

В плазматической мембране клетки находятся механизмы, *преобразующие* внешние сигналы во внутриклеточные. Рецепторы распознают сигнальные молекулы и приводят в действие внутриклеточные пути передачи информации, которые, в конечном счете, ведут к регуляции клеточных процессов, например, секреции, сокращению, метаболизму или росту.

Внутриклеточные сигналы передаются *молекулами-посредниками* – *вторичными посредниками* (*second messengers*).

На молекулярном уровне процесс передачи информации обеспечивается *цепочкой мембранных белков*, последовательно взаимодействующих друг с другом.

Каждый раз взаимодействие вызывает *конформационную перестройку* следующего в цепочке белка – изменение его структуры, а, следовательно, и функции. На определенной стадии дальнейшая передача информации поручается находящимся в цитоплазме малым молекулам или даже ионам. Они-то и являются вторичными посредниками. Их диффузия обеспечивает быстрое распространение сигнала по всей клетке.

Число различных вторичных посредников оказалось удивительно небольшим. Иными словами, пути передачи внутриклеточных сигналов *универсальны* и способны регулировать множество разнообразных физиологических и биохимических процессов.

Сейчас известны *два основных пути* передачи сигналов. В одном из них вторичным посредником служит циклический аденозинмонофосфат (цАМФ). В другом действует комбинация трех вторичных посредников: ионов кальция, инозитолтрифосфата и диацилглицерола. Последние два вещества образуются в самой плазматической мембране.

Два пути передачи сигналов имеют много общего. И в том, и в другом случае элементы, получающие информацию от первого звена – рецептора и передающие ее через мембрану внутрь клетки, представляют собой так называемые G-белки – мембранные белки, активирующиеся при связывании гуанозинтрифосфата (GTP) (рисунок 65).

G-белки активируют усилительный фермент, находящийся на внутренней стороне мембраны. *Фермент превращает* молекулы вещества-предшественника *в молекулы вторичного посредника*.

Работу мембранного конвейера можно представить в виде последовательных *четырёх этапов*.

Первый этап. Молекула гормона (1) (рисунок 65(а)) по кровотоку или лимфатической системе доставляется к рецепторному мембранному белку (2). Присоединение гормона к рецептору вызывает трансформацию

последнего, изменяющую конформацию внутриклеточной части рецепторного белка и **резко повышающую его сродство** к мембранному G-белку (3) с присоединенной молекулой гуанозиндифосфата (GDP) (рисунок 65(б)).

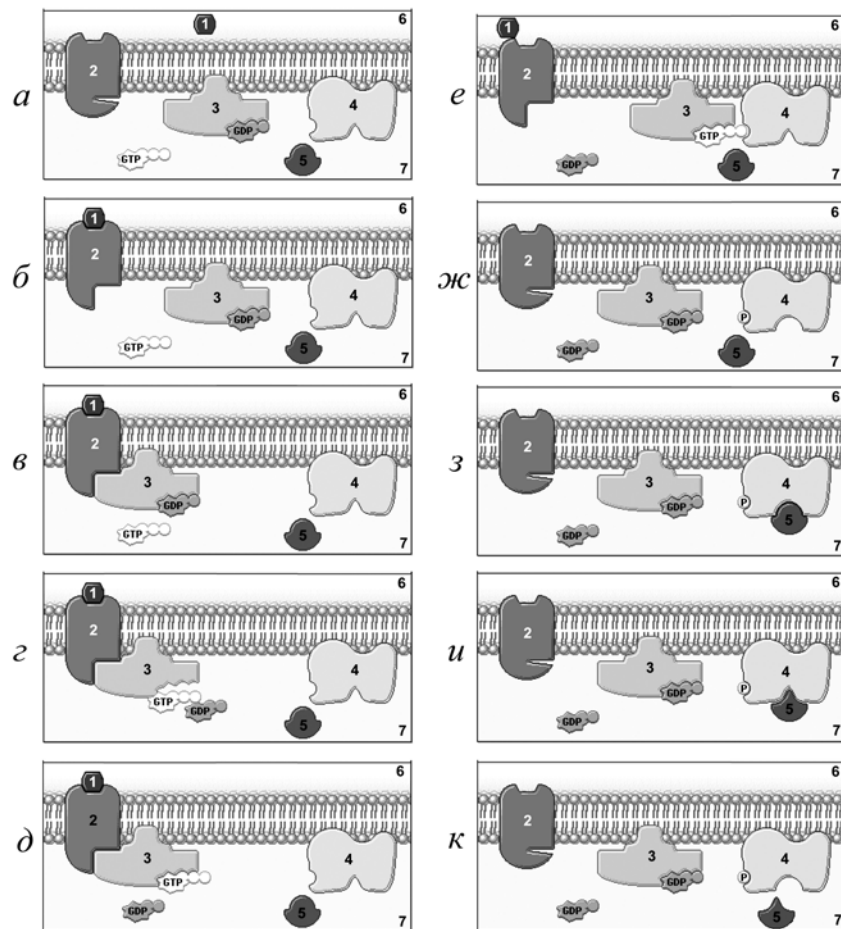


Рисунок 65 – Схема мембранной рецепции: 1 – гормон; 2 – рецепторный белок; 3 – G-белок; 4 – мембранный фермент; 5 – субстрат; 6 – межклеточное пространство; 7 – цитозоль клетки

http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/biomembrane2/transducers.html

Второй этап. Мембранный G-белок диффундирует латерально вдоль мембраны и связывается с активированным гормоном мембранным рецептором (рисунок 65(в)). Это событие стимулирует замену присоединенной к G-белку молекулы GDP на молекулу GTP (рисунок 65(г)), что в свою очередь вызывает резкое снижение сродства активированного гормоном мембранного рецептора (2) к комплексу G-белок+GTP (3) и к гормону (1) (рисунок 65(д)). G-белок, связанный с GTP, и гормон (1) уходят от рецептора (рисунок 65(е)).

Третий этап. G-белок диффундирует латерально и связывается с неактивным мембранным ферментом (4) (рисунок 65(е)). Крайняя фосфорильная группа GTP переносится на фермент. Фосфорилирование фермента вызывает изменение его конформации, формируется необходимая пространственная структура активного центра [17] и фермент становится каталитически активным (рисунок 65(ж)).

Четвертый этап. Активированный мембранный фермент (4) связывает субстрат (5) (рисунок 65(з)) и катализирует изменение последнего (рисунок 65(и)). Преобразованный субстрат покидает мембранный фермент (рисунок 65(к)) и запускает внутриклеточные процессы, которые и являются ответом на внешний сигнал. Если преобразованный субстрат активирует другие ферменты, то он и является вторичным посредником (*second messenger*).

Известны многие примеры стимулированной таким образом каталитической активности мембранных ферментов. Так, аденилатциклаза превращает аденозинтрифосфат (АТФ) в цАМФ, а фермент фосфолипаза С расщепляет мембранный липид фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на диацилглицерол и инозитолтрифосфат. В обоих путях передачи сигналов сходны конечные стадии: они состоят в том, что вторичные посредники вызывают изменения структуры клеточных белков. (В одной конформации белок неактивен, в другой же он участвует в каком-либо клеточном процессе, например, в секреции или в сокращении).

Известны **два основных способа действия вторичных посредников**. Один из них – прямой – состоит в том, что посредник

связывается с белком, а точнее с регуляторным компонентом белка, и вызывает конформационную перестройку.

Классическим примером такого механизма является регуляция сокращения скелетных мышц. В этом случае вторичный посредник — кальций — связывается с белком тропонином С, что вызывает конформационное изменение, ведущее к сокращению мышцы.

Более распространен *непрямой механизм действия вторичного посредника*. В этом случае он активирует фермент, называемый протеинкиназой, который затем *фосфорилирует белок* (т. е. присоединяет к нему фосфатную группу). Фосфорилирование приводит к конформационной перестройке белка и активированию его функции.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Что такое вторичные посредники?
2. Какие мембранные белки называются G-белками?
3. Охарактеризуйте основные этапы белкового механизма мембранной рецепции.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ КОНТРОЛЬНОЙ РАБОТЫ

В соответствии с учебным планом студенты заочной формы обучения обязаны выполнить письменную контрольную работу по курсу "Биологические мембраны". Контрольная работа выполняется в форме рукописи на стандартных листах формата А4. Текст размещается на одной стороне листа с полями: левое – 30 мм, остальные – 20 мм. Расстояние между строками должно быть не меньше 5 мм, высота букв – не меньше 2,5 мм. В одной строке должно быть не более 80 знаков, на странице должно быть не более 35 строк. При использовании компьютера текст должен быть напечатан шрифтом Times New Roman 12 pt через два интервала (или 14 pt через 1,5 интервала) с использованием абзацного отступа 1,27 мм и выравнивания текста "По ширине". Рукописный текст должен быть выполнен чертежным шрифтом.

Контрольная работа должна содержать следующие структурные части: титульный лист, содержание, вступление, два раздела, в которых

излагаются задания контрольной работы, список использованных источников и, в случае необходимости, приложения.

Каждая структурная часть должна начинаться с новой страницы.

Титульный лист работы должен содержать название университета, название кафедры, название работы, фамилию, имя и отчество студента, город и год выполнения работы. Пример оформления титульного листа представлен в приложении А.

В содержании приводятся список структурных элементов работы с указанием номеров страниц, с которых начинается данный структурный элемент. Пример оформления содержания курсовой работы представлен в приложении Б.

Во вступлении (1–2 страницы) кратко характеризуется значение биологических мембран в современной биотехнологии, раскрывается актуальность и значимость рассматриваемых в работе вопросов для промышленной биотехнологии.

Текст основной части подразделяют на разделы и подразделы. Номер подраздела состоит из номера раздела и порядкового номера подраздела в этом разделе, разделенных точкой (например, 2.3). Разделы и подразделы должны иметь заголовки. В конце заголовков точка не ставится. Заголовки разделов центрируют на странице, а заголовки подразделов начинают с абзаца. Заголовки разделов печатают большими буквами. Пример оформления заголовка раздела и подраздела курсовой работы представлен в приложении В.

Заголовки следующих структурных элементов работы: СОДЕРЖАНИЕ, ВСТУПЛЕНИЕ, СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ – центрируются в начале новой страницы, печатаются большими буквами и не нумеруются.

Формулы центрируются на отдельной строке, оставляя выше и ниже по одной пустой строке. Рисунки (схемы, графики) располагают симметрично к тексту, подпись к рисунку располагается под рисунком, начинается с абзаца словом "Рисунок", затем идет номер рисунка. Таблицы располагают симметрично к тексту, название таблицы располагается над таблицей, начинается с абзаца словом "Таблица", затем идет номер таблицы.

Рисунки и таблицы отделяют от текста пустыми строчками и располагают, как правило, после первой ссылки на них в тексте.

Список использованных источников включает все источники, которые располагаются в порядке их цитирования в тексте. При упоминании источника в тексте ставится его номер из списка, заключенный в квадратные скобки, например, "... в работе [14] было показано ...". Описание источников информации (книга, часть книги, статья в научном журнале, диссертация, стандарт, Интернет-ресурс) приводится на языке оригинала и оформляется по образцу, представленному в приложении В.

В приложения рекомендуется включать вспомогательный материал: вывод формул, дополнительные таблицы и схемы, алгоритмы и программы расчетов, ксерокопии документов. Приложения обозначают большими буквами азбуки, например, Приложение А. Эта надпись центрируется сверху страницы над заголовком приложения. Приложения должны иметь содержательные заголовки, которые печатаются симметрично к тексту.

Все страницы работы нумеруются арабскими цифрами. Номера страниц проставляются в правом верхнем углу страницы без точки. На титульном листе номер не ставят, но включают его в общую нумерацию. Номер "2" ставят на странице с содержанием и далее по порядку.

Контрольная работа брошюруется в папку со скоросшивателем.

Контрольную работу студент выполняет на протяжении девятого семестра.

Контрольная работа должна быть сдана до начала экзаменационной сессии в деканат заочного факультета в сроки, установленные деканатом.

ТИПОВЫЕ ВОПРОСЫ ТЕСТОВЫХ КОНТРОЛЬНЫХ РАБОТ

- Удельная электрическая емкость мембраны аксона равна:
(А) $0,5 \cdot 10^{-4} \text{ Ф/м}^2$ (Б) $0,5 \cdot 10^{-2} \text{ Ф/м}^2$ (В) $0,5 \cdot 10^{-2} \text{ Ф/см}^2$ (Г) $0,5 \cdot 10^{-12} \text{ Ф/м}^2$
- Жидкостно-мозаичная модель биологической мембраны включает в себя:
(А) белковый слой, полисахариды и поверхностные липиды
(Б) липидный монослой и холестерин
(В) липидный бислой, белки, микрофиламенты
(Г) липидный бислой

- Липидная часть биологической мембраны находится в следующем физическом состоянии:

- (А) жидком аморфном (Б) твердом кристаллическом
(В) твердом аморфном (Г) жидкокристаллическом

- Характерное время переноса молекулы фосфолипидов из одного положения равновесия в другое при их диффузии:

	Латеральная	Флип-флоп
(А)	$10^{-7} - 10^{-8} \text{ с}$	~1 час
(Б)	$10^{-10} - 10^{-12} \text{ с}$	$10^{-7} - 10^{-8} \text{ с}$
(В)	1–2 часа	10–50 с

- Толщина биологической мембраны равна:

- (А) 10 \AA (Б) 10 нм (В) 0,1 мкм (Г) 10 мкм

- Фазовый переход липидного бислоя мембран из жидкокристаллического состояния в гель сопровождается:

- (А) утоньшением мембраны
(Б) толщиной мембраны не меняется
(В) утолщением мембраны
(Г) толщиной мембраны изменяется мозаично

- Уравнение диффузии неэлектролитов (Фика) записывается:

- (А) $j_m = D \frac{dc}{dx}$ (Б) $j_m = D \frac{dc}{dt}$
(В) $j_m = -D \frac{dc}{dx}$ (Г) $j_m = -D \frac{dc}{dt}$

- Перенос ионов происходит в направлении:

	Пассивный транспорт	Активный транспорт
(А)	$\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$ $\xrightarrow{j_m}$	$\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$ $\xrightarrow{j_m}$
(Б)	$\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$ $\xrightarrow{j_m}$	$\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$ $\xleftarrow{j_m}$
(В)	$\tilde{\mu}_1 < \tilde{\mu}_2$ $\xrightarrow{j_m}$	$\tilde{\mu}_1 < \tilde{\mu}_2$ $\xrightarrow{j_m}$

9. Молекула валиномицина переносит через мембрану:
- K^+ и Na^+
 - Ca^{2+}
 - Cl^- и OH^-
 - K^+
10. Перенос вещества при облегченной диффузии идет по сравнению с простой диффузией:
- в противоположную сторону
 - быстрее
 - медленнее
 - с такой же скоростью
11. Мембранным потенциалом φ_M называется:
- $\varphi_M = \varphi_{нар} - \varphi_{вн}$
 - $\varphi_M = \varphi_{вн} - \varphi_{нар}$
 - $\varphi_M = \varphi_{вн} + \varphi_{нар}$
 - $\varphi_M = \varphi_{нар} \cdot \varphi_{вн}$
12. Диаметр кончика внутриклеточного электрода, используемого для измерения мембранного потенциала:
- соизмерим с размером клетки
 - много меньше размеров клетки
 - много больше размеров клетки
 - должен быть точно равен размеру клетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Маршелл Э. Биофизическая химия. – М.: Мир, 1981. – 806 с.
- Кольман Я., Рем К.Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
- Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах. – М.: Мир, 1984. – 215 с.
- Генис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. – М.: Мир, 1997. – 624 с.

- Волькенштейн М.В. Биофизика. – М.: Наука, 1988. – 592 с.
- Введение в биомембранологию / Под ред. А.А.Болдырева. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 208 с.
- Владимиров Ю.А., Рошупкин Д.И., Потапенко А.Я., Деев А.И. Биофизика. – М.: Медицина, 1983. – 272 с.
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., Clarke N.D. Biochemistry. – Freeman and C°, 2002. – 572 p.
- Антонов В.Ф., Черныш А.М., Пасечник В.И., Вознесенский С.А., Козлова Е.К. Биофизика. – М.: Гуманит. изд. центр Владос, 1999. – 288 с.
- Рубин А.Б. Биофизика. – М.: Высшая школа, 1999.– Т.1, 440 с.– Т.2, 464с.
- Антонов В.Ф. Биофизика мембран // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – №6. – С.2–12.
- Антонов В.Ф. Липидные поры: Стабильность и проницаемость мембран // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №10. – С.10–17.
- Suchyna T.M., Tape S.E., Koeppe R.E., Andersen O.S., Sachs F., Gottlieb P.A. Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers // Nature. – 2004. – V.430. – P.235–240.
- Калоус В., Павличек З. Биофизическая химия. – М.: Мир, 1985. – 446 с.
- Кагава Ясуо. Биомембраны. – М.: Высшая школа, 1985. – 303 с.
- Степанов В.М. Молекулярная биология. – М.: Высшая школа, 1996. – 335 с.
- Огурцов А.Н. Механизмы ферментативных реакций. Конспект лекций по курсу "Ферментативный катализ" для студентов специальности 7.092901 "Промышленная биотехнология" – Харьков: НТУ "ХПИ", 2004. – 75 с.
- Bayley H., Cremer P.S. Stochastic sensors inspired by biology // Nature. – 2001. – V. 413. – P. 226–230.
- Sansom M.S.P., Shrivastava I.H., Bridht J.N., Tate J., Carpenter C.E., Biggin P.C. Potassium channels: structures, models, simulations // Biochimica et Biophysica Acta. – 2002. – V.1565. – P.294–307.

20. Woolley G.A., Loughheed T. Modelling ion channel regulation // Current Opinion in Chemical Biology. – 2003. – V.7. – P.710–714.
21. Garcia M.L. Gate expectations // Nature. – 2004. – V.430. – P.153–155.
22. Огурцов А.Н. Методические указания к выполнению самостоятельной работы по курсу "Ферментативный катализ" для студентов специальности 7.092901 "Промышленная биотехнология" – Харьков: НТУ "ХПИ", 2004. – 22 с.
23. Lee S.Y., MacKinnon. A membrane-access mechanism of ion inhibition by voltage sensor toxins from spider venom // Nature. – 2004. – V.430. – P.232–235.
24. Биохимия мембран / Под ред. А.А.Болдырева. Кн. 6. В.П.Скулачев. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. – М.: Высшая школа, 1989. – 271 с.
25. Jones S.W. Calcium Channels: Unanswered Questions // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 2003. – V.35, No.6. – P.461–475.
26. Lehninger A. Principles of Biochemistry. – New York: W.H.Freeman & C°, 2004. – 1119 p.
27. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки в 3-х томах, Т.1. – М.: Мир, 1994. – 521с.
28. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E. Molecular Cell Biology. – New York: W.H.Freeman & C°, 2004. – 1999 p.
29. Эткинс П. Молекулы. – М.: Мир, 1991. – 216 с.
30. Биофизика / Под ред. акад. АН СССР П.Г. Костюка. – К.: Выща школа, 1988. – 504 с.

Приложение А

Образец оформления титульного листа контрольной работы

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
"Харьковский политехнический институт"

Кафедра биотехнологии и аналитической химии

Контрольная работа
по курсу "Биологические мембраны"

Выполнил студент группы БХТЗ-10

Фамилия Имя Отчество

Проверил
проф. А.Н.Огурцов

Харьков 2005

Приложение Б
Образец оформления содержания контрольной работы

СОДЕРЖАНИЕ

Вступление	3
Раздел 1. Пептиды – модели мембранных белков	4
1.1. Природные пептиды	4
1.2. Модельные синтетические пептиды	7
Раздел 2. Мембраносвязанные электротранспортные цепи	10
2.1. Системы синтеза стероидов в митохондриях	10
2.2. Микросомные электротранспортные цепи	12
2.3. Дыхательная система митохондрий	14
2.4. Фотосинтетическая электротранспортная система тилакоидов	17
Список использованных источников	20
Приложение А. Таблица пептидов	21
Приложение Б. Вывод уравнения Нернста	22
Приложение В. Статья: Bauley H., Cremer P.S. Stochastic sensors inspired by biology // Nature. – 2001. – V. 413. – P. 226–230.	23

Приложение В
Образец оформления заголовка раздела, подраздела и списка использованных источников

РАЗДЕЛ 1

ПЕПТИДЫ – МОДЕЛИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

1.1. Природные пептиды

Пептиды стали использоваться для изучения белково-липидных взаимодействий много лет назад. В большинстве случаев это были природные мембраноактивные ферменты ...

...

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Калоус В., Павличек З. Биофизическая химия. – М.: Мир, 1985. – 446 с.
2. Булгарина Т.В., Вульфсон П.Л. Иммуноферментный анализ // В. кн.: Практикум по биохимии. – М.: Высшая школа, 1985. – 508 с.
3. Salditt T., Schubert U.S. Layer-by-layer self-assembly of supramolecular and biomolecular films // Reviews in Molecular Biotechnology. – 2002. – V.90, №1. – P.55–70.
4. Огородников И.Н. Электронные возбуждения, люминесценция и радиационные дефекты в широкозонных нелинейно-оптических кристаллах: Дисс. докт. физ.-мат. наук: 01.04.07. – Екатеринбург: ГОУ ВПО "Уральский государственный технический университет", 2004. – 446 с.
5. СТВУЗ-ХПИ-3.01-2000. Текстовые документы в сфере учебного процесса. Общие требования к выполнению.
6. Информационный интернет-центр "Российские биотехнологии и биоинформатика" <http://www.rusbiotech.ru>

СОДЕРЖАНИЕ

Вступление	3		
1. Классификация и функции биологических мембран	3		
2. Структура биологических мембран	7		
3. Мембранные липиды	11		
4. Физические методы исследования мембран	14		
5. Подвижность и диффузия липидов в мембранах	19		
6. Плазматические мембраны	24		
7. Фазовые переходы липидов в биомембранах	26		
8. Модельные липидные мембраны	30		
9. Эндоплазматический ретикулум	33		
10. Транспорт веществ через биомембраны	33		
11. Пассивный транспорт веществ через мембрану	37		
12. Диффузия полярных молекул через мембрану	41		
13. Диффузия гидратированных ионов	45		
14. Облегченная диффузия	47		
15. Фильтрация и осмос. Порины	49		
16. Активный транспорт веществ	52		
17. Электрогенные ионные насосы	52		
18. Вторичный активный транспорт ионов	59		
19. Поры в липидном бислое	61		
20. Модель критической поры	64		
21. Мембранные потенциалы	66		
22. Потенциал покоя в клетках	68		
23. Уравнение Гольдмана	71		
24. Потенциал действия	73		
25. Токи через мембрану с фиксированным потенциалом	78		
26. Распространение импульса вдоль нервного волокна	83		
27. Ионные каналы	87		
28. Структура ионных каналов	89		
29. Пэтч-метод исследования ионных каналов	95		
		30. Ионные каналы как ферменты	98
		31. Неравновесность биосистем	102
		32. Основные принципы термодинамики неравновесных процессов	110
		33. Межклеточные контакты и сигнализация	115
		34. Сигнальная функция биомембран	124
		Правила оформления письменной контрольной работы	128
		Типовые вопросы тестовых контрольных работ	130
		Список литературы	132
		Приложение А. Образец оформления титульного листа контрольной работы	135
		Приложение Б. Образец оформления содержания контрольной работы	136
		Приложение В. Образец оформления заголовка раздела, подраздела и списка использованных источников	137

Навчальне видання

Огурцов Олександр Миколайович

МЕХАНІЗМИ МЕМБРАННИХ ПРОЦЕСІВ

Навчально-методичний посібник по курсу

"Біологічні мембрани"

для студентів спеціальності 7.092901

"Промислова біотехнологія"

заочного навчання

Російською мовою

Відповідальний за випуск М.Ф.Клещев

Роботу до видання рекомендувала М.Г.Зінченко

В авторській редакції

План 2005 р., поз. 36/174-05

Підписано до друку 27.12.2005 р. Формат 60 x 84 1/16.

RISO-друк. Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 4,5.

Наклад 100 прим. Зам. № Ціна договірна

Папір офсетний.

Обл.-вид. арк. 5,6.

Видавничий центр НТУ "ХП".

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 116 від 10.07.2000 р.

61002, Харків, вул. Фрунзе, 21

Друкарня НТУ "ХП". 61002, Харків, вул. Фрунзе, 21
