

LIPID PORES: STABILITY AND PERMEABILITY OF MEMBRANE

V. F. ANTONOV

The biophysical model of lipid pore is considered. It shows that lipid pores could be responsible simultaneously for two important functions of biological membrane: mechanical stability and permeability. Lipid pores play a key role in electrical breakdown of a biological membrane as well as in structural changes caused by the temperature phase transition or osmotic lysis.

Рассмотрена биофизическая модель липидной поры. Анализ модели свидетельствует о возможности одновременного участия липидных пор в обеспечении двух важных функций биологических мембран: механической стабильности и проницаемости. Показано, что липидные поры играют ключевую роль в явлениях электрического пробоя мембран и их структурных перестройках при температурном фазовом переходе и осмотическом лизисе.

ЛИПИДНЫЕ ПОРЫ: СТАБИЛЬНОСТЬ И ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН

В. Ф. АНТОНОВ

Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

ВВЕДЕНИЕ

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 отдельно, 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 наиболее естественным для бислоя является дефект типа сквозной гидрофильной поры. Эти поры и будут предметом дальнейшего рассмотрения (рис. 1).



Рис. 1. Бислойная липидная мембрана с липидными порами [5]

ЛИПИДНЫЕ ПОРЫ И СТАБИЛЬНОСТЬ МЕМБРАН

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. Неудивительно поэтому, что чисто 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.

Известна нестабильность мыльного пузыря, причиной которой может стать любая пылинка. Началом дестабилизации является прокол стенки пузыря и образование поры. В липидной бимолекулярной пленке клеточной мембраны поры появляются, если исключить чисто механические повреждения в результате тепловых флуктуаций поверхности бислоя, электрического пробоя, замораживания пленки, действия поверхностно-активных веществ, осмотического давления, 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. При отсутствии 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.

МОДЕЛЬ КРИТИЧЕСКОЙ ПОРЫ

Рассмотрим модель липидной поры (рис. 2). Будем считать, что боковая поверхность поры имеет форму кругового цилиндра. Более того, предположим, что боковая поверхность цилиндра изогнута и имеет радиус кривизны $h/2$. Радиус поры равен r .

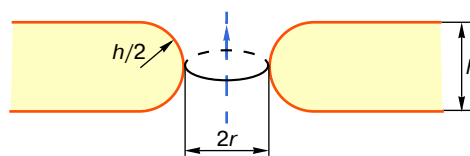


Рис. 2. Строение гидрофильной липидной поры. h — толщина липидного бислоя; $h/2$ — радиус кривизны стенки, r — радиус поры

Как видно на рис. 2, липидный бислой в целом является плоским, а пора имеет два радиуса кривизны $h/2$ и r . Из физики известно, что искривление поверхности на границе раздела липид-вода сопровождается появлением добавочного давления, называемого лапласовым и равного

$$\Delta P = \frac{2\sigma^1}{r},$$

где σ^1 — межфазное 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 $P(h/2) < P(r)$, то пора будет затекать.

Рассмотрим энергетику поры. Как установлено выше, на границы 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:

$$E(r) = 2\pi r\gamma - \pi r^2\sigma, \quad (1)$$

где первый член определяется энергией кромки поры с линейным натяжением γ , а второй — энергией поверхностного натяжения σ . Вид кривой на рис. 3 и 5 указывает на существование неустойчивого равновесия в точке максимума с критическими значениями энергии (E^*) и радиуса (r^*).

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^* :

$$r^* = \frac{\gamma}{\sigma}. \quad (2)$$

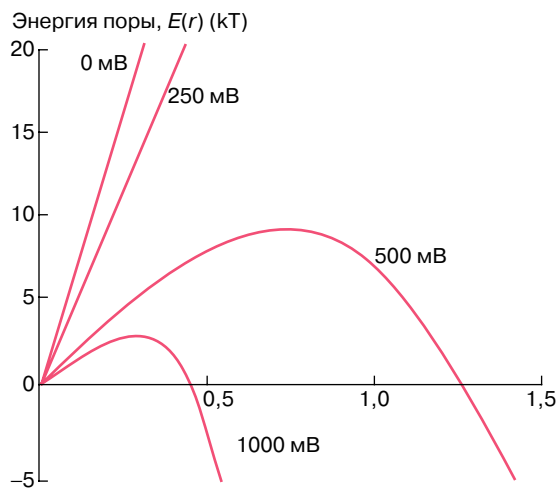


Рис. 3. Энергия поры как функция радиуса поры при различных значениях мембранного потенциала. Расчет кривых произведен по уравнению (5). Используются данные, приведенные в [5]

Высота энергетического барьера после подстановки r^* в уравнение (1) будет равна

$$E^* = \frac{\pi\gamma^2}{\sigma}. \quad (3)$$

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 бислоидной мембраны.

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ПРОБОЙ МЕМБРАН

Биологические мембраны находятся под действием электрического поля большой напряженности, создаваемого диффузией ионов через мембрану и электрогенными ионными насосами [1]. Поскольку разность потенциалов между цитоплазмой и внеклеточной средой достигает порядка 0,1 В, а толщина мембраны не превышает 10 нм, то напряженность поля равна 10^7 В/м. Интересно, что мембрана является более совершенным электрическим изолятором, чем многие жидкие изоляторы, применяемые в технике.

В некоторых случаях мембранный потенциал в живой клетке может быть выше и достигать 0,2 В (пресноводные водоросли, бактерии, энергизованные митохондрии). В возбудимых нервных и мышечных клетках происходит кратковременная реполяризация мембраны с ростом амплитуды потенциала. Однако пробой клеточной мембраны собственным мембранным потенциалом маловероятен. В то же время рост мембранного потенциала в результате воздействия внешним электрическим полем может

достигать величины, превышающей пороговую для электрического пробоя. При этом появляются структурные дефекты типа сквозных липидных пор. Разработанная методика электрического пробоя клеточных мембран получила название электропорации и широко применяется в биотехнологии.

В физике под электрическим пробоем понимают резкое увеличение силы электрического тока в первоначально слабопроводящей среде. В живой клетке такой средой служит бимолекулярный слой липида. Как было показано Ю. А. Чизмаджевым и сотрудниками [3], формула (1) должна быть в этом случае изменена путем введения дополнительного члена, отражающего вклад электрического поля:

$$E = 2\pi r\gamma - \pi r^2 \left(\sigma + \frac{C\phi^2}{2} \right), \quad (4)$$

где $C = \left(\frac{\epsilon_B}{\epsilon_M} - 1 \right) C_0$, ϵ_B — диэлектрическая проницаемость воды; ϵ_M — диэлектрическая проницаемость мембраны; ϕ — мембранный потенциал; C_0 — емкость единицы площади мембраны, не содержащей дефектов.

Зависимость энергии поры от ее радиуса для этого случая приведена на рис. 3. Показано семейство кривых, полученных по уравнению (4) для различных значений мембранного потенциала. Чем больше мембранный потенциал, тем меньше значение энергии поры и тем больше смещается максимум кривой к началу координат. Анализ кривых показывает, что с увеличением радиуса энергия поры должна расти, поскольку увеличивается периметр поры, и одновременно энергия должна уменьшаться пропорционально росту поверхностного натяжения мембраны и мембранного потенциала. В результате (см. рис. 3), появляется кривая с максимумом, что позволяет количественно оценить критические параметры мембраны: критический радиус поры и высоту энергетического барьера — по формулам, приведенным выше. Высота энергетического барьера с учетом поля равна:

$$E^* = \pi\gamma^2 / \left(\sigma + \frac{C\phi^2}{2} \right) \quad (\text{ср. с формулой (3)}). \quad (5)$$

Можно видеть, что с ростом мембранного потенциала и поверхностного натяжения высота барьера снижается.

Критический радиус поры может быть рассчитан по формуле

$$r^* = \gamma / \left(\sigma + \frac{C\phi^2}{2} \right) \quad (\text{ср. с формулой (2)}). \quad (6)$$

Его величина также уменьшается с ростом σ и ϕ . Из формулы следует, что зависимость критической поры от мембранного потенциала становится заметной лишь при значительном превышении электрической составляющей над величиной

поверхностного натяжения. Расчеты показывают, что для липидного бислоя в жидкокристаллическом состоянии величина мембранного потенциала не может быть меньше 0,23 В.

Стабильность бислоевых мембран определяется вероятностью появления пор критического радиуса. Очевидно, что любой фактор, снижающий высоту энергетического барьера, будет увеличивать эту вероятность. К таким факторам следует отнести снижение краевой энергии поры γ , рост поверхностного натяжения и рост мембранного потенциала. Как видно на рис. 2, рост пробойного напряжения до 1 В сопровождается смещением критического радиуса к значениям, меньшим 0,5 нм, что близко радиусам природных ионных каналов клеточной мембраны [1]. Отсюда следует, что электрический пробой сопровождается появлением широкого спектра липидных пор различного радиуса, включая радиусы ионселективных белковых каналов. В настоящее время метод воздействия внешним электрическим полем является одним из основных в современной биотехнологии. Известно его применение с целью увеличения пористости мембран (электропорация), введения ДНК (электротрансфекция), освобождения клеток от крупных молекул (электропермеаблизация), слияния клеток (электрослияние).

ТЕМПЕРАТУРНЫЙ ФАЗОВЫЙ ПЕРЕХОД МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ

Замораживание липидного бислоя в результате фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель сопровождается появлением липидных пор [2]. Очевидно, что, как и в случае с электрическим пробоем, судьбу мембраны будет определять соотношение радиусов образовавшихся пор и критических пор для данного состояния бислоя.

Необходимые для обсуждения экспериментальные данные были получены в лаборатории автора [2]. Опыты проводили на плоских бислоевых липидных мембранах (БЛМ) в условиях фиксации напряжения. БЛМ формировались из динасыщенных синтетических и природных фосфолипидов, имеющих температуру фазового перехода указанного типа в области 40–60°C. Регистрировались флуктуации тока, появление которых указывало на рождение пор (рис. 4). На рис. 4 видно, что исходно флуктуации тока отсутствуют и регистрируется только шум. Достигнув температуры, соответствующей температуре основного фазового перехода (ТФП) липида, сопровождается появлением отдельных флуктуаций тока с длительностью ~1 с. Слева на рисунке представлены реализации флуктуаций тока, справа – соответствующие гистограммы распределения по электрической проводимости. На рисунке показаны характерные записи флуктуаций тока для четырех индивидуальных фосфолипидов с различными температурами фазового перехода. Сопоставление реализаций тока и гистограмм показывает их одно-

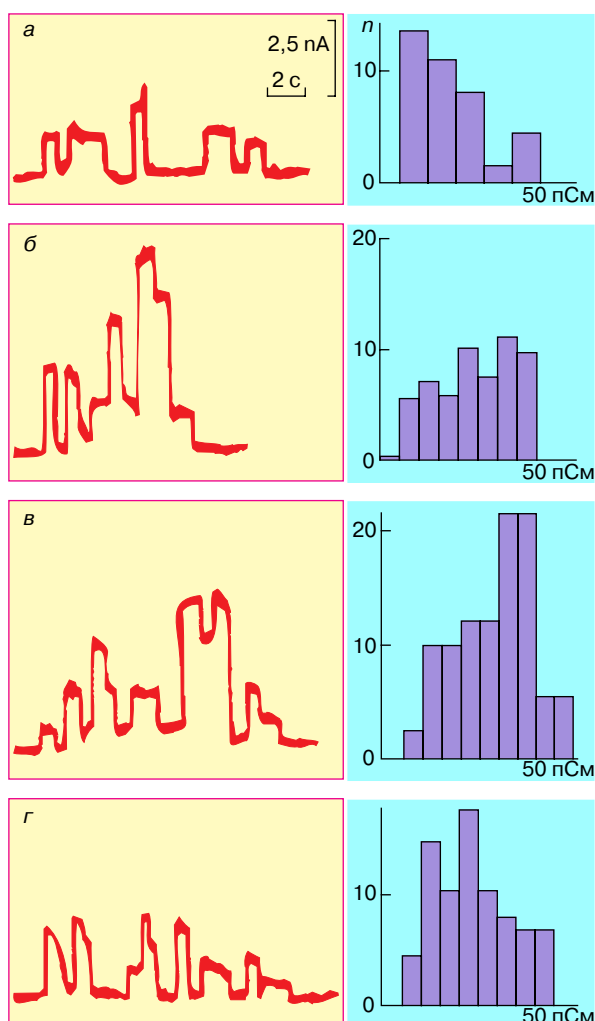


Рис. 4. Флуктуации трансмембранного тока и соответствующие гистограммы проводимости пор в плоской БЛМ при температурном фазовом переходе индивидуальных фосфолипидов. Слева – запись флуктуаций тока при замораживании БЛМ, справа – гистограммы проводимости. Липидный состав БЛМ: а – дипальмитоилфосфатидилхолин (температура основного фазового перехода (ТФП) = 315 К); б – дистеароилфосфатидилхолин (ТФП = 332 К); в – дипальмитоилфосфатидная кислота (ТФП = 340 К); г – гидрированный яичный лецитин (ТФП = 324 К). Величины ТФП были определены методом дифференциальной сканирующей калориметрии

типность для изученных фосфолипидов. Предполагая, что каждый скачок тока соответствует одиночной поре в открытом состоянии, можно по проводимости рассчитать радиус поры.

Фазовый переход в БЛМ осуществлялся при малых мембранных потенциалах порядка 0,05 В. Как видно на рис. 3, при таких напряжениях вкладом электрического поля в дестабилизацию мембран

можно пренебречь. В соответствии с формулой (2) единственной причиной уменьшения критического радиуса поры могло стать либо уменьшение в результате фазового перехода γ , либо увеличение σ . Считается, что γ является величиной, мало зависящей от фазового перехода. Речь таким образом может идти только об определении величины поверхностного натяжения бислоя для двух фазовых состояний. Оказалось, что замораживание бислоя приводит к росту поверхностного натяжения для всех изученных липидов. Для гидрированного яичного лецитина σ возрастало от $1,1 \cdot 10^{-3}$ до $5,6 \cdot 10^{-3}$ Н/м. С учетом этого по формуле (1) была рассчитана зависимость энергии поры от ее радиуса в жидкой и твердой мембранах (рис. 5).

Как следует из рис. 5, критический радиус поры в гель-состоянии значительно меньше по сравнению с жидкокристаллическим состоянием и по абсолютной величине не превышает 2 нм. Сохранение длительной устойчивости липидного бислоя в гель-состоянии свидетельствует о том, что существующие поры и поры, возникающие при фазовом переходе, имеют размеры меньше 2 нм. Сравнение рис. 3 и 5 демонстрирует высокую эффективность метода температурной обработки бислоевых липидных мембран с целью получения популяции липидных пор сравнительно с электрическим пробоем. Действительно, замораживание мембранных липидов в ходе фазового перехода, что для многих динамических липидов происходит при комнатной температуре, эквивалентно электрическому пробоем мембраны внешним электрическим полем напряжением 0,5 В. В то же время очевидно, что элект-

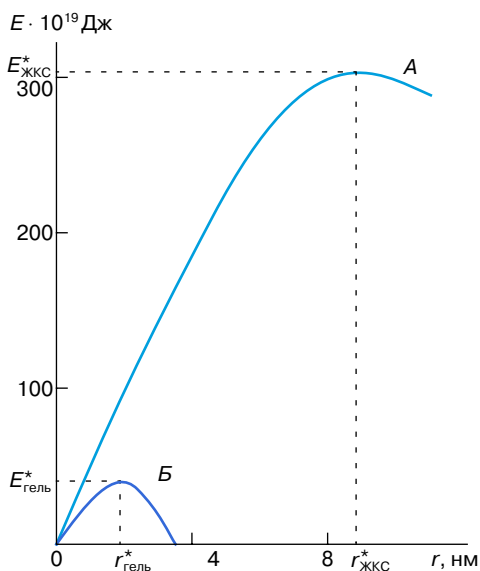


Рис. 5. Энергия поры как функция радиуса поры в жидкокристаллическом состоянии (А) и гель-состоянии (Б) мембранных липидов. Расчет произведен по формуле (3)

рические воздействия более удобны с точки зрения калибровки силы воздействия и его длительности.

Обобщая приведенные данные, можно утверждать, что любое воздействие механической, физической или химической природы, затрагивающее поверхностное натяжение липидного бислоя, является фактором риска в стабилизации поросодержащих мембран. Развитие такого подхода позволяет получить количественный ответ на важный для биологии вопрос о вероятности разрушения или заживления мембран при типичных стрессовых состояниях живой клетки.

На рис. 5 показано, что критический радиус пор в мембранах, находящихся в жидкокристаллическом состоянии при отсутствии внешних воздействий, достигает 9 нм. Эта величина настолько значительна, что вероятность механического разрыва клеточных мембран в физиологических условиях очень мала. Разрыв мембраны, находящейся в таком состоянии, возможен лишь тогда, когда пора приобретает размеры, соизмеримые с толщиной мембраны. Опыт показывает, что полное разрушение липидного бислоя возможно лишь при грубых механических манипуляциях или необратимом электрическом пробое.

Важный практический вывод состоит в том, что, опираясь на данные о критических радиусах пор (рис. 3 и 5), можно предсказать судьбу клеточных мембран в различных стрессовых состояниях (табл. 1).

Первый вывод, который можно сделать, заключается в том, что реальные поры во всех случаях меньше критического размера пор, характерного для жидкокристаллического состояния мембранных липидов. Действительно, размеры критических пор для липидного бислоя в жидкокристаллическом состоянии (9 нм) значительно превышают размеры реальных пор, указанные в левом столбце. Таким образом, мембраны в различных стрессовых состояниях обладают значительным запасом прочности. Второй вывод: действие электрического пробоя и замораживания бислоя, как видно в последней строке, аддитивно. Такого результата можно ожидать, следовательно, и при других сочетаниях физических и химических воздействий. Стрессовое воздействие таким образом независимо от его физико-химической природы может быть количественно оценено, и его результат предсказан в рамках рассматриваемой модели. Третий вывод касается частного случая гемолиза эритроцитов. Ранее было показано, что критический радиус поры в липидном бислое при температурном фазовом переходе (см. рис. 5) достигает 2 нм, что совпадает с радиусом пор эритроцита при осмотическом гемолизе. Этот результат может объяснить известный в криобиологии факт гемолиза эритроцитов при оттаивании замороженных клеток в изотонических условиях. Из табл. 1, кроме того, следует, что простое замораживание мембранных липидов может приве-

Таблица 1. Размеры липидных пор в модельных и клеточных мембранах сравнительно с критическими порами, рассчитанными по уравнениям (2) и (6)

Радиус поры (r), нм	Объект	Соотношение радиусов пор	Стрессовое состояние
3,0–4,0	Эритроцит	$r_{\text{жкс}}^* > r_{\text{эп}}^* \geq r$	Электрический пробой
2,0	То же	$r_{\text{жкс}}^* > r$	Осмотический гемолиз
1,2	L-клетки	$r_{\text{жкс}}^* > r_{\text{эп}}^* > r$	Электрический пробой
0,2–2,0	Липосомы	$r_{\text{жкс}}^* > r$	Осмотический лизис
0,6–0,8	То же	$r_{\text{жкс}}^* > r_{\text{гель}}^* > r$	Фазовый переход
0,5–2,0	"	$r_{\text{жкс}}^* > r_{\text{гель}}^* > r$	То же
1,2–1,8	БЛМ	$r_{\text{жкс}}^* > r_{\text{гель}}^* > r > r_{\text{гель+эп}}^*$	Фазовый переход

r^* – критический радиус поры в жидкокристаллическом состоянии мембранных липидов (жкс), гель-состоянии (гель), при электрическом пробое (эп), при сочетании гель-состояния с электрическим пробоем (гель+эп). Рассчитан по (2) и (6).

сти к гемолизу. Помимо криобиологии фазовый переход мембранных липидов играет важную роль в холодоустойчивости растений [2].

ЛИПИДНЫЕ ПОРЫ И ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН

С точки зрения проницаемости липидные поры принципиально отличаются от белковых каналов своим происхождением и исключительной динамичностью. В то время как белковые каналы имеют строго определенные размеры, сохраняющиеся в течение всей жизни клетки, размеры липидных пор в процессе затекания варьируют в широких пределах. Однако эта изменчивость имеет предел. Если радиус поры меньше критического, то пора в процессе затекания должна пройти все промежуточные радиусы и достигнуть минимального размера. Вопрос о возможности полного затекания липидных пор остается открытым. Предполагается, что полностью затягиванию поры препятствуют мощные силы гидратации, проявляющиеся при сближении стенок гидрофильных пор [5].

Липидные поры в отличие от белковых ионных каналов не обладают выраженной избирательностью, что коррелирует с их сравнительно большими исходными размерами (см. табл. 1). Ясно, однако, что в процессе затекания липидные поры могут достигать сколь угодно малых размеров, в том числе сравнимых с размерами белковых ионных каналов, что может приводить к перераспределению ионных токов в мембране, например при возбуждении. Известно далее, что после выключения стрессового воздействия бислойная липидная мембрана может вернуться в состояние с низкой проводимостью, что подразумевает достижение порами размера, недостаточного для прохождения гидратированных ионов. Таким образом, гидрофильные липидные поры универсальны в том отношении, что могут быть использованы клеткой для транспорта высокомолекулярных веществ, ионов и молекул воды.

Исследования проницаемости липидных пор развиваются в настоящее время в двух направлени-

ях: в первом исследуются максимально большие поры, во втором, наоборот, – липидные поры минимального радиуса. В первом случае речь идет об электротрансфекции – способе введения в живые клетки или липосомы молекул ДНК с целью переноса и внутриклеточного введения чужеродного генетического материала. Оказалось, что внешнее электрическое поле высокой напряженности способствует проникновению гигантской молекулы ДНК внутрь мембранной частицы [4]. Как видно из табл. 1, максимальный размер критической поры соответствует жидкокристаллическому состоянию бислоя липидов при отсутствии внешнего электрического поля и равен 9 нм. Наложение внешнего электрического поля напряженностью 100 кВ/м понижает критический радиус поры до 1 нм за время 0,2 с. Поскольку при этом мембраны сохраняются, то размер липидных пор в них не превышает, очевидно, этого нижнего предела. Парадокс состоит в том, что эффективный диаметр статистического клубка ДНК, которая должна попасть внутрь частицы, достигает 2000 нм. Поистине задача про верблюда, проникающего сквозь игольное ушко. Поэтому очевидно, что молекула ДНК должна проникать через мембрану в виде расплетенной одиночной нити. Известно, что конец нити имеет диаметр 2 нм и таким образом только-только может войти в пору. Однако свободная диффузия нити ДНК в пору при этом вряд ли возможна. К сожалению, механизм этого явления до конца неясен. Предполагается, в частности, что молекула ДНК способна расширить пору и таким образом проскользнуть через мембрану. Проникновению ДНК могут способствовать дополнительные силы электрофореза и электроосмоса с учетом суммарного отрицательного заряда молекулы ДНК. Не исключено, что поры с фиксированными в них концами молекулы ДНК играют роль якоря, удерживающего молекулу в определенном месте у поверхности мембраны везикулы, а сам процесс переноса является разновидностью пиноцитоза. Исследование этого интересного с точки зрения проницаемости явления продолжается.

Второе направление исследования проницаемости мембран с участием липидных пор связано с трансмембранным переносом молекул и ионов воды. Известное в биологии явление высокой водной проницаемости клеточных мембран полностью воспроизводится на искусственных липидных бислоях, что подразумевает участие в этом процессе гидрофильных липидных пор. Большой интерес в этой связи представляют результаты опытов Эламрани и Блума [6] с суспензией липосом из фосфатидной кислоты в температурной области фазового перехода липида из жидкокристаллического состояния в гель. Проницаемость бислоя для молекул воды измеряли в опытах с тяжелой водой, проницаемость для ионов воды – методом рН-скачка. Основные результаты представлены в табл. 2.

Первое, что можно отметить, – это огромное различие между коэффициентом проницаемости липидного бислоя для гидратированных ионов (ион натрия) и молекул (ионов) воды. Это различие достигает девяти порядков. Столь значительное различие свидетельствует в пользу предположения о том, что в процессе затекания липидные поры могут достигать размера, недостаточного для прохождения гидратированных ионов, но доступного для прохождения более мелких частиц – молекул и ионов воды. Кроме того, фазовый переход мембранных липидов в гель-состояние сопровождается скачкообразным уменьшением коэффициента проницаемости для ионов и молекул воды. Отсюда следует, что в ходе фазового перехода из множества липидных пор отбираются те, радиус которых не превышает 2 нм. И наконец, обращают внимание количественное совпадение коэффициентов проницаемости бислоевой мембраны для молекул и ионов воды, а также их одинаковая динамика при фазовом переходе. Естественно предположить, что молекулы и ионы воды пересекают мембрану одним и тем же путем. Этот результат позволяет некоторым ученым [5, 6] вернуться к известной гипотезе о том, что липидный бислой насыщен дефектами типа трансмембранных цепочек молекул структурированной воды. С точки зрения молекулярной организации структура молекул воды в этом случае идентична структуре льда. Молекулы воды связаны

между собой водородными связями. Предполагается, что протоны могут передвигаться по системе межмолекулярных водородных связей. Можно думать, что такие льдоподобные цепочки воды возникают в липидном бислое в момент рождения или затекания липидных пор.

В пользу возможности протонной проводимости на границе раздела водной фазы с полярной частью фосфолипидного бислоя свидетельствуют данные о латеральной протонной проводимости на границе липидного бислоя с водой [7]. Вдоль монослоя из фосфатидилэтаноламина создавался градиент рН и измерялась продольная скорость переноса протона путем регистрации флуоресценции меченого в полярной головке фосфолипида. Одновременно производили измерения поверхностного потенциала и поверхностного давления. Показано, что протон движется вдоль монослоя липида в том случае, если этот монослой организован и упорядочен. Скорость переноса значительно превышала скорость диффузии протонов в воде. Эффект был обнаружен в монослоях из большинства природных фосфолипидов. Полная дегидратация фосфолипидов в полярной области приводила к потере протонной проводимости. Авторы предполагают, что молекулы воды на границе раздела липид – раствор образуют четыре слоя: объемный слой раствора; слой гидратной воды, молекулы воды в котором непосредственно взаимодействуют с полярными группами молекулы липида; слой молекул, воды связанный водородной связью с молекулами липида на уровне карбонильной группы, и, наконец, трансмембранные водные мостики. В целом на поверхности липидного бислоя образуется сеть водородных связей, обеспечивающих быстрый перенос протонов. Предполагается при этом, что протоны, передвигающиеся в системе водородных связей на поверхности бислоя, не смешиваются с протонами объемного слоя воды. Таким образом, возможен мембранный обмен протонами между протонными каналами и протонными насосами минуя раствор электролита, омывающего мембрану. Кроме того, молекулы липида в кромке липидной поры способны, как показано в последнее время, участвовать в быстром флип-флоп обмене [1]. В сочетании

Таблица 2. Проницаемость липидного бислоя для молекул и ионов воды

Частица	Липид	Коэффициент проницаемости, см/с	Температура
Протон/гидроксил*	Димиристоилфосфатидная кислота	10^{-5}	$T < T_{ФП}^{**}$
Протон/гидроксил	Димиристоилфосфатидная кислота	10^{-3}	$T > T_{ФП}$
Молекула воды	Дипальмитоилфосфатидная кислота	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$T < T_{ФП}$
Молекула воды	Дипальмитоилфосфатидная кислота	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$T > T_{ФП}$
Ионы натрия	Яичный лецитин	$\sim 10^{-12}$	$T > T_{ФП}$

* Сочетание протон/гидроксил используется потому, что примененный метод не позволяет разделить потоки протонов и гидроксиллов.

** ТФП – температура фазового перехода жидкокристаллическое состояние – гель.

с латеральной миграцией протонов этот механизм также способствует эффективному трансмембранному переносу протонов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной вывод состоит в том, что стабильность липидного бислоя и клеточной мембраны, лишенной белкового каркаса, определяется липидными порами. Эти поры образуются в местах дефектов жидкокристаллической структуры липидного бислоя. Липидные поры возникают в результате тепловых флуктуаций поверхности бислоя, а также могут рождаться при мембранном стрессе, сопровождающем фазовый переход мембранных липидов, при электрическом пробое и осмотическом лизисе. Судьба мембраны в этих случаях будет зависеть вероятностным образом от того, будет ли липидная пора превышать некоторый критический размер или нет. В первом случае мембрана порвется, во втором случае ее структура сохранится. При сохранении стабильности мембран поры заживают, пробегая при этом все промежуточные значения радиусов. Минимальные радиусы липидных пор могут стать сравнимыми с размерами избирательных белковых каналов, регулирующих в норме ионную проницаемость клеточных мембран. На последних этапах затекания липидные поры могут превращаться в водные поры, доступные только для молекул и ионов воды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.Ф. Мембранный транспорт // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 6. С. 6–14.
2. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. Липидные мембраны при фазовых превращениях. М.: Наука, 1992. С. 125.
3. Чизмаджев Ю.А., Аракелян В.Б., Пастушенко В.Ф. Биофизика мембран. М.: Наука, 1981. С. 207–229.
4. Кленчин В.А. // Биол. мембраны. 1993. Т. 10. С. 5–19.
5. Powell K.T., Weaver J.C. // Bioelectrochemistry and Bioenergetics. 1986. Vol. 15. P. 211–227.
6. Elamrani K., Blume A. // Biochim. et biophys. acta. 1983. Vol. 727. P. 22–30.
7. Prats M., Tocanne J.F., Teissie J. // Biochimie, 1989. Vol. 71. P. 33–36.

* * *

Валерий Федорович Антонов, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой медицинской и биологической физики Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова. Область научных интересов – биофизика мембран. Автор более 200 научных статей, двух монографий, а также учебных программ и учебных пособий по биофизике для студентов медицинских специальностей.