

8. Структура биологических мембран

Если рассмотреть электронную микрофотографию ультратонкого среза живой ткани (после его фиксации и соответствующего прокрашивания), то первое, что обращает на себя внимание, это тонкие двойные линии, которые "вырисовывают" контуры клетки и внутриклеточных органелл (рис. 8.1). Это срезы через биологические мембраны – тончайшие плёнки, состоящие из двойного слоя молекул липидов и встроенных в этот слой белков. По сути дела, именно мембраны (наряду с *цитоскелетом*), формируют структуру живой клетки. *Клеточная* или *цитоплазматическая* мембрана окружает каждую клетку. Ядро окружено двумя *ядерными* мембранами: наружной и внутренней. Все внутриклеточные структуры: митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы, пероксисомы, фагосомы, синаптосомы и т.д. представляют собой замкнутые *мембранные везикулы* (пузырьки). Каждый тип мембран содержит специфический набор белков – рецепторов и ферментов; вместе с тем основа любой мембраны – бимолекулярный слой липидов (*липидный бислой*), который во всякой мембране выполняет две главные функции: *барьера* для ионов и молекул и структурной основы (*матрицы*) для функционирования рецепторов и ферментов.

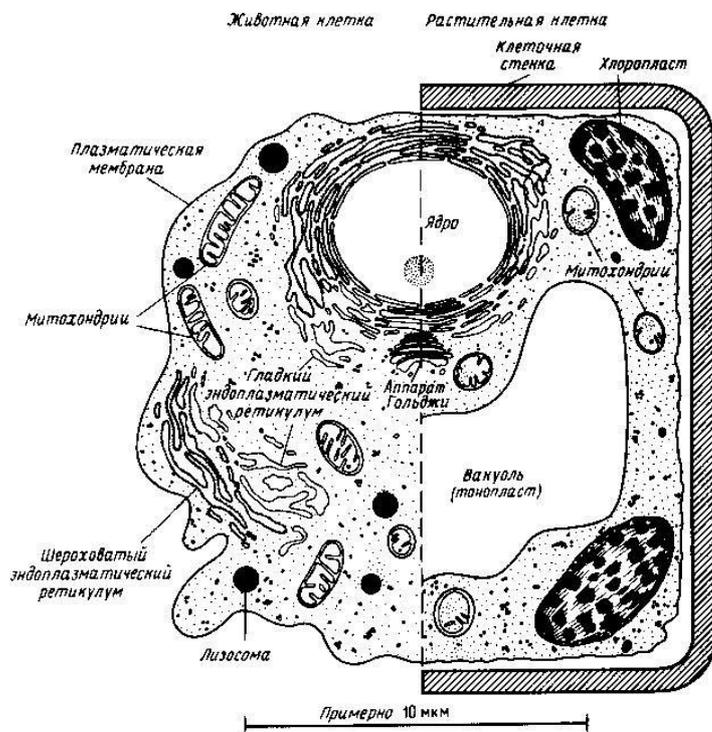


Рис. 8.1. Схематическое изображение оргanelл клеток на основании данных электронной микроскопии.

8.1. История изучения свойств и строения мембран

Термин "мембраны" как окружающей клетку невидимой плёнки, служащей барьером между содержимым клетки и внешней средой и одновременно полупроницаемой перегородкой, через которую могут проходить вода и некоторые растворенные в ней вещества, был впервые использован, по-видимому, ботаниками фон Модем и независимо К. фон Негели (1817–1891) в 1855 г. для объяснения явлений плазмолиза. В 1877 г. ботаник В. Пфедфер (1845–1920) опубликовал свой труд "Исследования осмоса", где постулировал существование клеточных мембран, основываясь на сходстве между клетками и осмометрами, имеющими искусственные полупроницаемые мембраны, которые были приготовлены незадолго до этого М. Траубе. Дальнейшее изучение осмотических явлений в растительных клетках датским ботаником Х. де Фризом (1848–1935) послужило фундаментом при создании физико-химических теорий осмотического давления и электролитической диссоциации датчанином Я. Вант-Гоффом (1852–1911) и шведским ученым С. Аррениусом (1859–1927). В 1888 году немецкий физико-химик В. Нернст (1864–1941) вывел уравнение диффузионного потенциала. В 1890 году немецкий физико-химик и философ В. Оствальд (1853–1932) обратил внимание на возможную роль мембран в биоэлектрических процессах. Между 1895 и 1902 годами Э. Овертон (1865–1933) измерил проницаемость клеточной мембраны для большого числа соединений и показал прямую зависимость между способностью этих соединений проникать через мембраны и их растворимостью в липидах. Это было чётким указанием на то, что именно липиды формируют плёнку, через которую проходят в клетку вещества из окружающего раствора. В 1902 году Ю. Бернштейн (1839–1917) привлек для объяснения электрических свойств живых клеток мембранную гипотезу.

В 1925 году Гортер и Грендел показали, что площадь монослоя липидов, экстрагированных из мембран эритроцитов, в два раза больше суммарной площади эритроцитов. Гортер и Грендел экстрагировали липиды из гемолизированных эритроцитов ацетоном, затем выпаривали раствор на поверхности воды и измеряли площадь образовавшейся мономолекулярной пленки липидов. На основе результатов этих исследований было сделано предположение, что липиды в мембране располагаются в виде бимолекулярного слоя. Это предположение подтвердили исследования электрических параметров биологических мембран (Коул и Кёртис, 1935): высокое электрическое сопротивление, порядка 10^7 Ом/м² и большая емкость 0,51 Ф/м².

Вместе с тем имелись экспериментальные данные, которые свидетельствовали о том, что биологическая мембрана содержит в своем составе и белковые молекулы. Эти

противоречия экспериментальных результатов были устранены Даниелли и Давсоном, предложившими в 1935 году «бутербродную» модель строения биологических мембран (рис. 8.2 вверху), которая с некоторыми несущественными изменениями продержалась в биологии в течении почти 40 лет. Согласно этой модели, на поверхности фосфолипидного бислоя в мембранах располагаются белки.

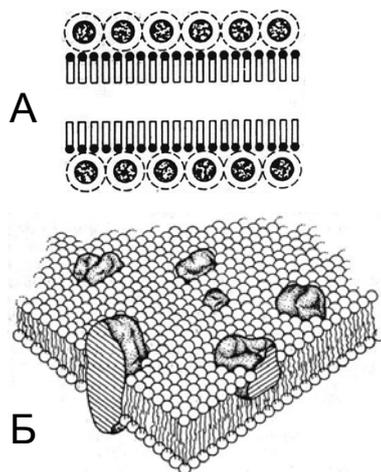


Рис. 8.2. Модели строения биологических мембран: *А* — «бутербродная модель» строения биологических мембран по Давсону и Даниели, *Б* — жидкостно-мозаичная модель Сингера и Николсона.

Эта модель успешно объясняла имевшиеся к тому времени данные о существовании липидного бислоя в мембране, а также тот факт, что поверхностное натяжение на границе мембраны–вода было заметно ниже, чем на поверхности раздела фосфолипидный слой–вода, что можно объяснить адсорбцией белков на поверхности липидного слоя. С моделью согласовывались также полученные примерно в то же время данные по дифракции рентгеновских лучей (с довольно низким разрешением).

В 1959 г. на основании обширного набора данных электронной микроскопии ультратонких срезов клеток, окрашенных четырехокисью осмия, Робертсон выдвинул гипотезу об «унитарном», т.е. стандартном строении всех клеточных и внутриклеточных мембранных структур. Все наблюдаемые на срезах мембраны имели толщину около 7,5 нм и в электронном микроскопе выглядели как две темные линии, разделенные светлой полоской. Было сделано заключение (не совсем верное), что такой трехслойный вид мембраны обусловлен расположением центрального липидного бислоя между двумя слоями белка.

Дальнейшие успехи в изучении строения мембран были достигнуты благодаря прогрессу в очистке и разборке на элементы мембранных структур методами биохимии и успехам

электронной микроскопии. В частности, электронно-микроскопические исследования с применением метода замораживания–скалывания показали, что в мембраны встроены глобулярные частицы. С другой стороны, развитие таких биофизических методов, как метод флуоресцентных и спиновых зондов позволило доказать жидкое состояние липидов в мембранах.. В 1972 г. Сингер и Николсон свели воедино все предложенные идеи, создав в 70-х годах жидкостно-мозаичную модель (рис. 8.2 внизу). В рамках этой модели мембрана представляется как текучий фосфолипидный бислой, в который погружены свободно диффундирующие белки, образующие в нем своего рода мозаику.

В последние годы жидкостно-мозаичная модель тоже подверглась изменениям. В частности, показано, что не все мембранные белки свободно диффундируют в жидком липидном бислое. Имеются данные о существовании латеральных доменов в самой мембране. Тщательно изучается роль цитоскелета. Становится очевидным, что некоторые участки мембран отличаются, по-видимому, по своей структуре от классического липидного бислоя. Тем не менее, эта модель легла в основу современных представлений о строении биологических мембран.

8.2. Биофизические методы изучения структуры мембранных белков и липидов

В становлении и уточнении современных представлений о структуре мембран большую роль сыграли не только методы морфологии и особенно биохимии, ранее зарекомендовавшие себя при изучении метаболизма и функции белков в водной среде, но и специфические биофизические методы, которые позволили изучать структуру этих сложных надмолекулярных гетерогенных образований.

8.2.1. Электронная микроскопия.

В настоящее время, когда электронная микроскопия пришла на вооружение широкого круга биологов и медиков, с трудом верится, что было время, когда разработка самого прибора и физической техники обработки экспериментального материала были главным объектом усилий исследователей, среди которых физику и инженеру принадлежала не меньшая роль, чем экспериментальному биологу и врачу.

Исторически первой была *просвечивающая* электронная микроскопия тонких срезов мембран, которой пользовался в том числе и Робертсон, и которая позволила при окраске препаратов четырехокисью осмия выявить характерную трехслойную структуру мембран: на снимках четко видны две темные полосы с промежутком между ними шириной около 8 нм. При такой подготовке мембраны подвергаются, однако,

неблагоприятным воздействиям (в частности, обработка четырехокисью осмия приводит к значительной потере белка), и начались поиски более щадящей техники обработки срезов. Удачным решением оказался метод *негативного* контраста, когда препарат окрашивали молибденовокислым аммонием, который вообще не связывался с мембранным материалом, но заполнял пустоты между структурами, и таким образом не только сама липидная мембрана, но и расположенные на ней белки давали более прозрачное изображение на темном фоне поглощения молибдата – тяжелый атом молибдена давал более сильное рассеяние электронов, чем легкие атомы органических молекул, входящих в состав мембран.

Следующим революционным шагом была разработка метода расщепления мембран при низкой температуре (*freeze-fracture*) и приготовления реплик со сколов (*freeze etching*). В российской литературе эти методы иногда называются методами «замораживание–скалывание» и «замораживание–травление». Препараты быстро замораживают жидким азотом, затем образец скалывают при помощи ножа при низкой температуре (–100°C) в глубоком вакууме. Мембрана скалывается преимущественно по липидной зоне (где нет льда, механически прочного при низких температурах). В результате на поверхностях скола обнажается внутренняя область мембраны. При необходимости образец подвергают травлению (возгонка льда в вакууме). После чего производят напыление металла (обычно платины) на образовавшуюся поверхность и тем самым получают реплику с этой поверхности. На платиновый слой для прочности наносят слой углерода. После этого препарат оттаивают, реплика всплывает и ее снимают при помощи специальной сетки. Подученную пленку и исследуют под электронным микроскопом.

Наиболее характерные структуры, наблюдаемые при использовании этого метода – многочисленные внутримембранные частицы размером от 8 до 10 нм, лежащие в плоскости сколов. Эти частицы, по-видимому, являются мембранными белками. Реплики, полученные от двух половинок расщепленной мембраны не всегда бывают комплементарными, т.е. некоторые частицы связаны только с одной из половин мембраны. Данные, полученные методом замораживания–скалывания, широко использовались Сингером и Николсоном при создании жидкостно-мозаичной модели.

8.2.2. Дифракция рентгеновских лучей (рентгеноструктурный анализ)

Некоторые специализированные мембранные системы имеют регулярную структуру, поэтому их можно изучать методами рентгеноструктурного анализа. Примером является миелиновая оболочка периферических нервных волокон. Она представляет собой

мембрану, которая, многократно оборачиваясь вокруг аксона, формирует регулярную систему из концентрических мембранных структур. Миелин исследовали еще в 30-х годах и получили данные по распределению электронной плотности в мембране, подтверждающие адекватность бислойной модели (рис. 8.3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что структура всех мембран сходна: они имеют внутреннюю область с низкой электронной плотностью и два слоя полярных группировок с высокой электронной плотностью. Таким образом, рентгеноструктурные данные позволяют получить некоторую информацию о том, как расположена в мембране основная масса мембранных белков, хотя в таком виде этот метод не дает детальной молекулярной картины.

Дифракцию рентгеновских лучей можно использовать и для изучения водных дисперсий мембран и фосфолипидов. При этом по рефлексам полярных областей на обеих сторонах бислоя можно оценить его толщину (около 3,6 нм для чистых фосфолипидов). По рефлексам упорядоченных углеводородных цепей можно также определить расстояние между этими цепями (около 0,42 нм).

Исследование *атомной структуры* мембранных белков осложнено тем, что эти белки, будучи, как правило, амфифильными, склонны к агрегации при их выделении и очистке и плохо кристаллизуются, чтобы не сказать, что они не кристаллизуются вовсе. Выход можно найти в том случае, если удастся получить кристаллы водорастворимых аналогов мембранных белков либо путем удаления гидрофобного куска (путем ограниченного протеолиза), либо выделив близкие по структуре, но лучше растворимые в воде аналоги белка из других организмов, в основном, из бактерий, либо получив методами белковой инженерии слегка модифицированный белок. Благодаря этим приемам структура ряда мембранных белков расшифрована с достаточно высоким разрешением (обычно около 2 Å).

8.2.3. Ядерный магнитный резонанс

Метод ЯМР основан на наличии у многих ядер (^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O , и др.) собственного магнитного момента. Ядра ^1H , ^{13}C , ^{31}P представляют для биологов и медиков наибольший интерес, поскольку резонанс этих ядер наиболее важен для определения структуры органических молекул.

Метод ЯМР во многом основан на тех же принципах, что и ЭПР, но только обнаруживаются этим методом не электроны, а ядра атомов, обладающие механическим моментом P_N и магнитным моментом μ_N . В соответствии с классическим представлением,

предполагается, что атомные ядра, имеющие сферическую форму, вращаются вокруг оси. Величина механического момента вычисляется по уравнению.

$$P_N = I \frac{h}{2\pi} \quad (0.1)$$

где h — постоянная Планка, I — спиновое квантовое число, обычно просто называемое ядерным спином.

Магнитный момент μ_N связан с P_N соотношением:

$$\frac{\mu_N}{P_N} = \gamma = g \frac{e_p}{2m_p} \quad (0.2)$$

Где γ — гиромагнитное отношение ядер, g — ядерный фактор спектроскопического расщепления (т.н. множитель Ланде, или *g-фактор*), e_p и m_p — заряд и масса протона, соответственно. Комбинируя уравнения (0.1) и (0.2), получим выражение для величины магнитного момента:

$$\mu_N = gI \frac{e_p h}{4\pi m_p} \quad (0.3)$$

Ядра с $I = 0$, следовательно, не обладают магнитным моментом, и их нельзя наблюдать методом спектроскопии ЯМР. Особенно важен для нас тот факт, что к таким нуклидам относятся ядра ^{12}C и ^{16}O .

В таблице 8.1 даны характеристики ядер ряда атомов, включая величину ядерного спина.

Таблица 8.1.

Изотоп	Число протонов	Массовое число	Число нейтронов	Ядерный спин
^1H	1 (нечетное)	1 (нечетное)	0 (четное)	$I = \frac{1}{2}$
^2H	1 (нечетное)	2 (четное)	1 (нечетное)	$I = 1$
^{12}C	6 (четное)	12 (четное)	6 (четное)	$I = 0$
^{13}C	6 (четное)	13 (нечетное)	7 (нечетное)	$I = \frac{1}{2}$
^{14}N	7 (нечетное)	14 (четное)	7 (нечетное)	$I = 1$
^{17}O	8 (четное)	17 (нечетное)	9 (нечетное)	$I = \frac{1}{2}$
^{31}P	15 (нечетное)	31 (нечетное)	16 (четное)	$I = \frac{1}{2}$
^{32}S	16 (четное)	32 (четное)	16 (четное)	$I = 0$

Объединим в выражении постоянные сомножители и введем новую постоянную величину — ядерный магнетон:

$$\beta_N = \frac{e_p h}{4\pi m_p} \quad (0.4)$$

Заметим, что ядерный магнетон почти в две тысячи раз меньше по абсолютной величине магнетона Бора, поскольку вместо массы электрона в знаменателе стоит масса протона. Теперь выражение для магнитного момента можно записать как

$$\mu_N = \beta_N g I \quad (0.5)$$

Энергия магнитного диполя в магнитном поле H выражается уравнением:

$$E = \mu_N H \quad (0.6)$$

совместно с уравнением (0.5) получим:

$$E = H \beta_N g I \quad (0.7)$$

При проведении эксперимента в спектроскопии ЯМР образец помещают в постоянное магнитное поле и облучают поперечным радиочастотным полем соответствующей частоты ν . При наложении постоянного магнитного поля происходит расщепление уровней в соответствии с уравнением (0.7). Между этими уровнями происходит переход, связанный с обращением ориентации спина. Благодаря избыточной заселенности нижнего уровня, преобладает поглощение энергии над его излучением, что регистрируется в качестве сигнала. Из уравнения (0.7) и известного соотношения $h\nu = \Delta E$, получаем условие резонанса

$$h\nu = H \beta_N g I \quad (0.8)$$

Чрезвычайно высокие требования к напряженности и однородности магнитного поля и чувствительности регистрирующего блока в установках ЯМР связаны с очень слабым поглощением СВЧ колебаний. В свою очередь это обусловлено тем, что для протонов (а тем более для более тяжелых ядер) разность энергий ΔE даже в весьма сильных магнитных полях очень мала по сравнению со средней энергией теплового движения, и, в соответствии с уравнением Больцмана, заселенность энергетических уровней различается очень мало. (Избыточная заселенность низшего энергетического уровня по сравнению с высшим составляет всего лишь около одной миллионной доли).

Хотя во многих отношениях принципы метода ЭПР и ЯМР сходны, имеются существенные различия в аппаратуре и способах обработки сигналов. В конечном счете, это связано с тем, что масса протона больше массы электрона почти в две тысячи раз (точнее, в 1836,5 раз) и, следовательно, ядерный магнетон больше магнетона Бора в то же самое число раз по абсолютной величине. Отсюда происходят различия между методами ЭПР и ЯМР, на которых следует кратко остановиться.

Во-первых, методы ЯМР и ЭПР отличаются частотами используемого СВЧ излучения. Казалось бы, из уравнения (0.8) следует, что мы можем использовать любые магнитные поля и частоты, лишь бы было соответствие условию резонанса. Но это не так. Чем меньше величина магнитного поля, тем меньше разность энергий между уровнями, получившимися в результате расщепления и, следовательно, тем меньше разность заселенности уровней и слабее сигнал поглощения (см. ниже). Для уверенной регистрации сигнала поглощения разность между уровнями должна быть значительной, т.е. магнитное поле должно быть достаточно велико. С увеличением магнитного поля растет, однако, и частота СВЧ поля, в соответствии с уравнением (0.8). В методе ЭПР для достижения более или менее разумной чувствительности работают на высоких частотах (обычно около 10^{10} Гц (длина волны 3 см)), в ЯМР спектрометрах при том же магнитном поле рабочая частота меньше — около $8 \cdot 10^8$ Гц (40 см). Как уже говорилось, в методе ЭПР измерение поглощения сверхвысоких частот осуществляется при фиксированной частоте СВЧ и модулированном магнитном поле; при этом регистрируется не само поглощение, а его первая производная по полю (см. Гл. 3). В ЯМР дело обстоит иначе: СВЧ более низких частот можно передавать не по волноводам, а по электрическим проводникам, и к тому же существуют хорошо разработанные СВЧ источники, дающие плавное изменение частоты. Получается, что при используемых частотах технически удобнее изменять частоту при постоянной величине магнитного поля. По этой причине на спектрах ЯМР отложено поглощение как функция частоты, а не первая производная поглощения как функция напряженности магнитного поля, как в методе ЭПР.

Во-вторых, из уравнения Больцмана, которая в нашем случае имеет вид $\frac{N_1}{N_2} = e^{\frac{g\beta_N H I}{kT}}$ (где

N_1 и N_2 заселенности верхнего и нижнего уровня, соответственно) следует, что относительная заселенность уровней различна: она составляет около 10^{-3} для ЭПР и 10^{-6} для ЯМР. По этой причине метод ЯМР менее чувствителен по отношению к числу частиц, сигнал которых может быть зарегистрирован. Это, впрочем, компенсируется тем, что, количество протонов в образцах обычно бывает заметно выше, чем количество парамагнитных частиц.

Если бы методом ЯМР мы могли всего лишь определять общее количество ядер, например протонов, в исследуемом объекте, то вряд ли этот метод получил бы такое широкое распространение в химии и биологии. К счастью, это не так: спектры ЯМР обладают довольно сложной структурой, а именно они состоят из серии пиков с

определенным положением максимумов и определенной шириной полос, Оба этих параметра несут ценнейшую информацию. Рассмотрим этот вопрос подробнее.

До сих пор мы рассматривали резонансное поглощение свч поля изолированными ядрами таких элементов как водород, азот или фосфор. В таком случае в спектрах ЭПР можно ожидать единственного резонансного сигнала для каждого сорта ядер. В действительности на резонанс влияет определенным образом окружение рассматриваемого ядра, а сигналы от ядер, находящихся в разном окружении, различаются. В молекулах, ядра всегда окружены собственными электронами и электронными облаками других атомов. Иными словами, ядра в определенной степени экранированы, и эффективная напряженность поля H_{eff} на ядре всегда меньше, чем приложенное поле H_0 . Это явление учитывается выражением (8.9).

$$H_{eff} = H_0 - \sigma H_0 = (1 - \sigma)H_0 \quad (0.9)$$

где σ — константа экранирования, безразмерная величина порядка 10^{-5} для протонов. Ядра одного и того же атома имеют различное непосредственное окружение в молекуле, зависящее от химического строения той группы, к которой эти ядра принадлежат. По этой причине константа экранирования различна у одних и тех же атомов, в частности у протонов, входящих в состав разных химических групп. Это проявляется в том, что сигналы ЯМР сдвинуты для разных химических групп в разной степени по сравнению с «изолированным» ядром, например, «изолированным» протоном. Этот эффект называется *химическим сдвигом*. Химический сдвиг измеряется в относительных единицах, называемых «миллионными долями» (м.д.) и вычисляется следующим образом:

$$\delta = \frac{\Delta\nu}{\nu_0} \cdot 10^6 = \frac{\Delta H}{H_0} \cdot 10^6 \quad (0.10)$$

В этой формуле $\Delta\nu$ — величина сдвига максимума поглощения (по шкале частот свч), ν_0 — резонансная частота поглощения в отсутствии химического сдвига, $\Delta H = H - H_{эфф}$. Сопоставив уравнения (0.9) и (0.10), получаем выражение зависимости δ от σ :

$$\delta = \frac{\Delta H}{H_0} \cdot 10^6 = \frac{H_0 - H_{эфф}}{H_0} \cdot 10^6 = \sigma \cdot 10^6 \quad (0.11)$$

Таким образом, химический сдвиг в миллионных долях равен константе экранирования, умноженной на миллион.

Величина химического сдвига, как уже говорилось, характерна для определенных химических групп, и определение положения максимумов в спектрах ЭПР лежит, таким образом, в основе *качественного* анализа структуры органических молекул. На рисунке

8.3 приведен в качестве примера спектр ЯМР суспензии фосфолипидов, выделенных из эритроцитов. Хорошо виден основной максимум, принадлежащий протонам метиленовых мостиков фосфолипидных молекул, а также максимум конечных групп CH_3 фосфатидилхолина. Очевидно, что площадь под кривой для того или иного пика пропорциональна общему числу протонов данного вида, и это служит основой для *количественного* анализа химических групп того или иного сорта в исследуемом образце.

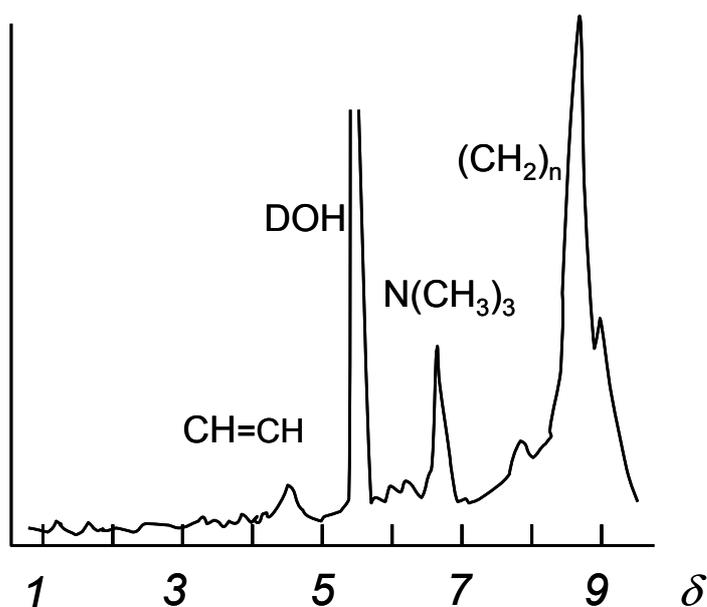


Рис. 8.3. Спектр ЯМР липидов в эритроцитах. Наиболее заметные полосы обозначены. Суспензия в тяжелой воде, полоса примеси обычной воды обозначена как DOH.

Как и в случае со спиновыми зондами (см. раздел), ширина пика сигнала ЭПР зависит от подвижности соответствующих групп. На рисунке 8.3 можно видеть, что подвижность атомов метиловых групп на фосфотидилхолиновой головке фосфолипидов несколько выше, чем подвижность метиленовых мостиков жирнокислотных цепей, но существенно меньше подвижности молекул свободных небольших молекул DOH («полутяжелой» воды). Различные воздействия на мембрану, ведущие к изменению подвижности определенных групп, сразу же приводят и к изменению ширины соответствующих пиков в спектрах ЯМР.

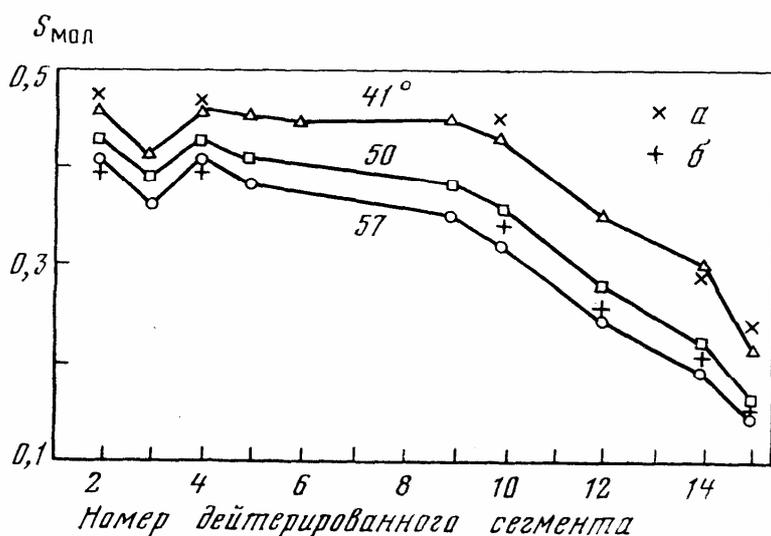


Рис. 8.4. Влияние расстояние углеродного атома от поверхности на его молекулярную подвижность в биологических мембранах по данным ядерного магнитного резонанса. S - параметр упорядоченности вращения сегмента. Кривые получены при разных температурах.

Интересное применение нашел метод изучения ЯМР в области поглощения дейтерия. Поскольку ядра дейтерия в два раза тяжелее ядер обычного водорода, поглощение этих атомов лежит при совершенно разных частотах при одном и том же поле. Были проведены опыты по избирательному дейтерированию метиленовых групп в определенных местах углеводородной цепи жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов мембран. Уширение полос поглощения оказалось разным, в зависимости от положения метиленовой группы в цепи. Это говорит о различии в подвижности соответствующих групп. Полученные данные приведены на рисунке 8.4. Хорошо видно, что подвижность жирнокислотной цепи возрастает по мере удаления от головы молекулы фосфолипида (т.е. от поверхности мембраны) к хвосту. В самом деле, параметр упорядоченности движения, рассчитанный из уширения полосы поглощения дейтерированной метильной группы, снижался от $S = 4-5$ на уровне 2-го углеродного атома до примерно $S = 2$ на уровне 15-го углеродного атома. В литературе имеются и другие данные подобного типа исследования липидных бислоев как в фосфолипидных везикулах (липосомах), так и в природных мембранах. Повышение разрешающей способности метода ЯМР позволило установить, что пики в спектрах ЯМР обладают характерной структурой, которая возникает в результате

сверхтонкого расщепления, аналогичного расщеплению в методе ЭПР. Расщепление на характерные мультиплеты вызвано взаимодействием между ядерными магнитными диполями, разделенными малым количеством химических связей. Этот эффект характеризуется *константой спин-спинового взаимодействия*. Эта константа содержит информацию, которая помогает оценить строение, конфигурацию и конформацию молекул.

Применение метода ЯМР в органическом анализе и, в частности, в медико-биологических исследованиях огромно. Многие дали и использование этого метода при изучении молекул, входящих в структуру биологических мембран. Это относится, прежде всего, к применению самого распространенного варианта ЯМР, основанного на ядерном магнитном резонансе протонов (протонный магнитный резонанс или ПМР). С помощью ПМР высокого разрешения с Фурье-преобразованием проводятся исследования структуры белков. При помощи варианта импульсного ПМР (переменная частота при постоянном магнитном поле) изучают свойства свободной и связанной воды.

ЯМР спектроскопия на ядрах ^{13}C применяется для изучения белков, нуклеиновых кислот и других биологически важных соединений, и характеризуется большей чувствительностью, чем ПМР.

Метод ^{31}P -ЯМР используется для исследования структуры гидратированных липидов. Например, при помощи этого метода исследовали фазовые переходы в липидах и липидных смесях. Как уже упоминалось, этот метод оказался весьма полезным при определении ориентации и динамического поведения полярных головок фосфолипидов, а также структурных возмущений, вносимых в бислои мембранными белками.

8.2.4. Другие методы

Применяются и другие методы изучения структуры белков и липидов в мембранах и ее изменений при функционировании мембран или под влиянием различных воздействий. К таким методам относится ИК-спектроскопия и метод комбинационного рассеяния, электронный парамагнитный и ядерный магнитный резонанс, флуоресцентные метки и зонды, измерения светорассеяния и другие. С методом спиновых и отчасти флуоресцентных зондов мы ознакомились в предыдущих разделах, равно как и с основами метода ядерного магнитного резонанса. На других методах мы будем кратко останавливаться на них по мере необходимости при дальнейшем изложении материала.

8.3. Белки мембран

Белки мембран принято делить на интегральные и периферические. Интегральные белки имеют обширные гидрофобные участки на поверхности и нерастворимы в воде. С

липидами мембран они связаны гидрофобными взаимодействиями и частично погружены в толщу липидного бислоя, а зачастую и пронизывают бислой, оставляя на поверхности сравнительно небольшие гидрофильные участки. Отделить эти белки от мембраны удается только с помощью детергентов, типа додецилсульфата или солей желчных кислот, которые разрушают липидный слой и переводят белок в растворимую форму (солюбилизуют его) образуя с ним ассоциаты. Все дальнейшие операции по очистке интегральных белков осуществляются также в присутствии детергентов. Периферические белки связаны с поверхностью липидного бислоя электростатическими силами и могут быть отмыты от мембраны солевыми растворами.

8.4. Распределение функций между белками и липидами

В клетках животных и растений цитоплазматические мембраны выполняют функции, зависящие от специализации данного типа клеток. Примеры этому даны в табл. 8.2. Мембраны нейронов генерируют электрические импульсы (потенциалы действия), а мембраны аксонов осуществляют их проведение по нервному волокну. Мембраны мышечных клеток отвечают за сокращение мышцы под действием пришедшего нервного импульса и т.д. Внутриклеточные структуры также обладают разнообразными функциями. Внутренняя мембрана митохондрий осуществляет преобразование энергии окисления субстратов в энергию АТФ. Мембраны саркоплазматического ретикулума мышечных клеток осуществляют удаление кальция из клеточного сока при расслаблении мышцы и его выброс при сокращении. Мембраны эндоплазматического ретикулума клеток печени осуществляют окисление чужеродных соединений (ксенобиотиков), включая лекарства и промышленные загрязнения и т.д. Все эти *специализированные функции* осуществляются благодаря функционированию специализированных мембранных *белков*, набор которых различен в разных мембранах.

Липидный слой, хотя и сложен по своему составу и также различается в различных мембранных структурах, повсюду выполняет одни и те же две основные функции: *барьера* для ионов и водорастворимых молекул и структурной основы («*матрицы*») для мембранных белков и гликолипидов. Именно благодаря наличию сплошного двойного слоя липидных молекул (называемого обычно *липидным бислоем*), практически непроницаемого для ионов и полярных молекул, растворимых в воде, во всех живых клетках биологические мембраны выполняют функцию *барьера*, отделяющего клетку от окружающей среды, и разделяющего внутренний объем клетки на сравнительно изолированные "отсеки" (компарменты, *compartments*).

В этот липидный бислой встроены многочисленные белковые молекулы и молекулярные комплексы, одни из которых обладают свойствами селективных (т. е. избирательных) *каналов* для ионов и молекул, а другие – *насосов*, способных активно перекачивать ионы через мембрану. Барьерные свойства мембран и работа мембранных насосов создают неравновесное распределение ионов между клеткой и внеклеточной средой, что лежит в основе процессов внутриклеточной регуляции и передачи сигналов между клетками (в том числе в форме электрического импульса).

Вторая функция, общая для всех мембран – это функция "монтажной платы" или *матрицы*, на которой располагаются в определенном порядке белки и белковые ансамбли, образующие системы переноса электронов, запасаения энергии в форме АТФ, регуляции внутриклеточных процессов гормонами, поступающими извне и внутриклеточными медиаторами, узнавания других клеток и чужеродных белков, рецепции света и механических воздействий и т. д.

Гибкая и эластичная пленка, которой по существу являются все мембраны, выполняет и определенную *механическую функцию*, сохраняя клетку целой при умеренных механических нагрузках и нарушениях осмотического равновесия между клеткой и окружающей средой.

Таблица 8.2

Некоторые функции биологических мембран

Клетки	Мембраны	Функция
Все клетки	Цитоплазматические	Активный транспорт ионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , поддержание осмотического равновесия
Большинство клеток	Цитоплазматические	Связывание гормонов и включение механизмов внутриклеточной сигнализации
Большинство клеток (кроме эритроцитов)	Внутренняя мембрана митохондрий	Перенос электронов на кислород и синтез АТФ (окислительное фосфорилирование)
Нервные и мышечные клетки	Цитоплазматические	Генерация потенциалов покоя и действия, распространение потенциала действия

Клетки печени	Эндоплазматический ретикулум	Окисление ксенобиотиков
Большинство клеток (кроме эритроцитов)	Эндоплазматический ретикулум	Перенос ионов кальция из клеточного сока внутрь везикул
Клетки зрительного эпителия	Мембраны зрительных дисков	Поглощение квантов света и генерация внутриклеточного сигнала

8.5. Химический состав мембран

В табл. 8.3 приведено относительное содержание белков и липидов в некоторых мембранах. Грубо говоря, по весу мембраны состоят наполовину из белков, наполовину из липидов, но во внутриклеточных мембранах, содержащих переносчики электронов (внутренние мембраны митохондрий, мембраны микросом), белков существенно больше, чем липидов.

Таблица 8.3

Относительное содержание белков и липидов (%) в некоторых мембранах (Котык А. и Яначек К. *Мембранный транспорт*, Москва: Мир, 1980, с. 33).

Мембраны	Белки	Липиды
Бычий миелин	22	78
Эритроциты человека	49	44
Плазматические мембраны клеток печени	60	40
Наружные митохондриальные мембраны	55	45
Внутренние митохондриальные мембраны	78	22
Микросомы из печени крыс	62	32

В состав липидов мембран входят в основном фосфолипиды, сфингомиелины и холестерин. Например, в мембранах эритроцитов человека их содержание, составляет, соответственно 36, 30 и 22 % по весу; еще 12% приходится на гликолипиды (Котык А. и Яначек К., *Мембранный транспорт*, Москва: Мир, 1980, с. 45). (табл. 8.4).

Таблица 8.4

Состав липидов в мембранах эритроцитов человека

Фосфолипиды	36,3
Сфингомиелины	29,6
Холестерин	22,2
Гликолипиды	11,9

Как видно из табл. 8.5, основные фосфолипиды мембран – это фосфатидилхолин (лецитин), фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и кардиолипин.

Таблица 8.5

Содержание фосфолипидов и сфингомиелина в мозгу и почках человека

(Котык А. и Яначек К. *Мембранный транспорт*, Москва: Мир, 1980, с. 44)

Фосфолипиды	Мозг	Почки
Фосфатидилхолин	29,2	37,9
Фосфатидилэтаноламин	35,0	30,8
Фосфатидилсерин	17,6	7,0
Фосфатидилинозитол	2,2	6,1
Кардиолипин	0,4	4,2
Фосфатидиловая кислота	0,5	0,6
Сфингомиелин	13,6	12,8

8.6. Липиды мембран

Липидные бислои образуются *амфифильными* молекулами фосфолипидов и сфингомиелина в водной фазе. Амфифильными эти молекулы называют потому, что они состоят из двух частей, различных по своей растворимости в воде: полярной “головки”, обладающей высоким сродством к воде, т. е. *гидрофильной*, и “хвоста” образуемого неполярными углеводородными цепями жирных кислот; эта часть молекулы обладает низким сродством к воде, т. е. *гидрофобна*.

С химической точки зрения фосфолипид состоит из четырёх частей: *глицерина*, двух *жирных кислот* с длинной углеводородной цепью, *фосфорной кислоты* и особой для каждого фосфолипида группы, которую мы будем называть *характеристической группой*.

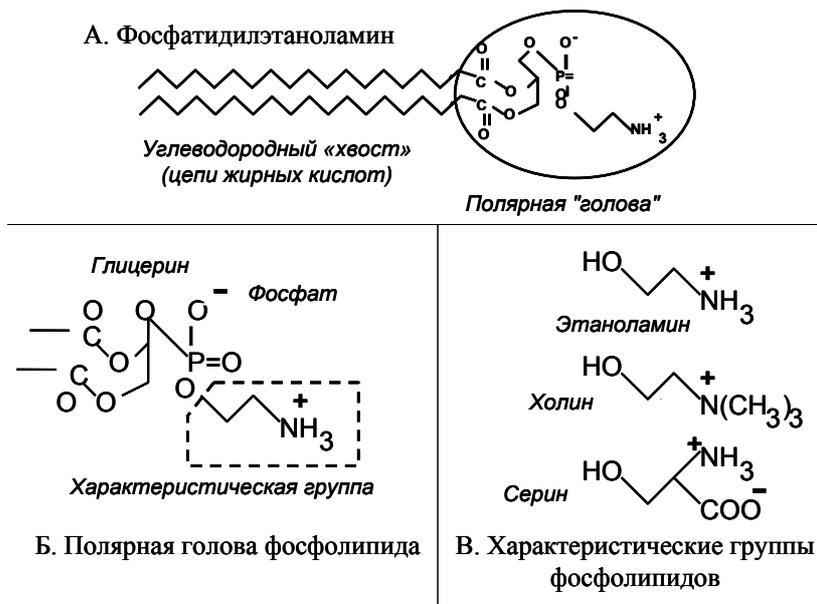


Рис. 8.5. Вверху - Амфифильная молекула фосфолипида фосфатидилэтанолamina. Внизу - Характеристические полярные группы некоторых фосфолипидов.

Примером амфифильной молекулы может служить молекула фосфатидилэтанолamina, пространственная структура которой показана на рис. 8.5, А. В фосфатидилэтанолamine характеристической группой является остаток этанолamina (рис. 8.5, Б). В других фосфолипидах такой группой может остаток холина, серина и другие полярные молекулы (см. рис. 8.5, В).

В состав липидного слоя мембран входят также холестерин и сфингомиелины; последние близки к фосфолипидам по химическому строению и физическим свойствам.

8.6.1. Липидные кристаллы

На рисунке 8.6 приведены результаты рентгеноструктурного анализа кристаллов дилауроилфосфатидилэтанолamina (ДЛФЭ). В таких кристаллах молекулы фосфолипида располагаются в виде чередующихся бимолекулярных слоев.

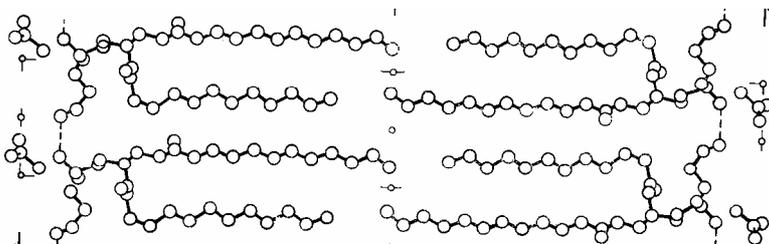


Рис. 8.6. Структура бислоев дилауроилфосфатидилэтанолamina (ДЛФЭ) (по результатам рентгеноструктурного анализа кристаллов ДЛФЭ).

Атомы кислорода (O11–O22) , фосфора (P) и азота (N) сгруппированы в районе "полярной головки", а основная масса атомов – углероды – образует две углеводородные цепи "жирного хвоста" фосфолипидной молекулы (рис. 8.7).

Если рассматривать пространственную структуру бислоя ДЛФЭ в плоскости слоев липидных молекул), то видно, что молекулы образуют в плане мембраны регулярную структуру. Однако при детальном воспроизведении положения каждого атома картина получается довольно сложной (рис. 8.7).

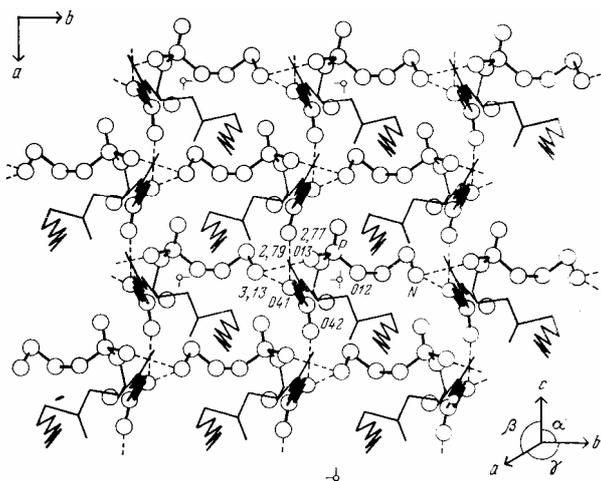


Рис. 8.7. Упаковка молекул в кристалле 1, 2-дилауроил-фосфатидил-этанолamina (по данным рентгеноструктурного анализа). Вид на плоскость монослоя.

Кружочки – атомы полярных групп, *черточки* – химические связи.

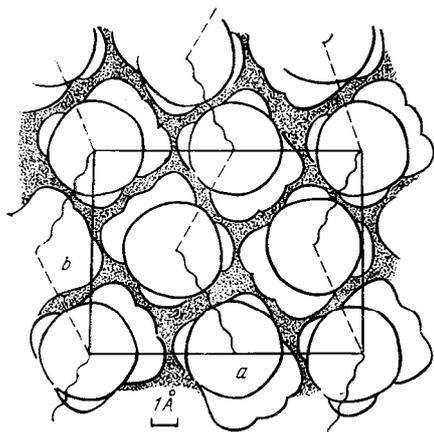


Рис. 8.8. Расположение фосфолипидов в мембране. Вид на плоскость мембраны.

Эту картину можно упростить при грубом разрешении (см. рис. 8.8). Хорошо видно, что жирнокислотные цепи имеют вид окружностей, упакованных с максимальной плотностью, т. е. образуя нечто наподобие гексагональной решетки. Такая плотная упаковка характерна, однако, только для фосфолипидных мембран, построенных из одинаковых молекул, которые при температуре ниже температуры плавления находятся в кристаллическом (твердом) состоянии. При нагревании прежде всего нарушается регулярность упаковки молекул в плане мембраны («предпереход»), а затем жирнокислотные цепи переходят из *все-транс* конфигурации в иные конфигурации и бислой делается жидким (фазовый переход – плавление). Данные рентгеноструктурных и других исследований показывают, что жирнокислотные цепи в молекулах фосфолипидов обычно вытянуты под некоторым углом к плоскости мембраны, как это видно на рис. 8.9. При этом угол наклона различается у разных фосфолипидов и может изменяться при структурных перестройках липидного бислоя.

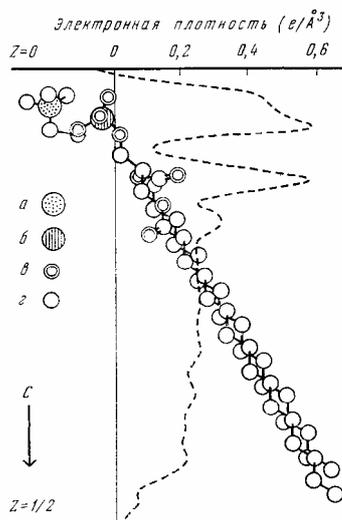


Рис. 8.9. Расположение молекулы фосфолипида в бислое по данным рентгеноструктурного анализа. Кружочки показывают расположение отдельных атомов: (а) — азот, (б) — фосфор, (в) — кислород, (г) — углерод. Пунктиром показан профиль электронной плотности одного монослоя в мембране по данным РСА.

8.6.2. Самосборка липидных мембран в водной среде

Данные рентгеноструктурного анализа и другие показывают, что молекулы фосфолипидов имеют форму цилиндра, сплюснутого с боков и разделенного по длине на две неравные части: небольшую "голову", состоящую из полярных групп, и гидрофобный "хвост". Такое строение приводит к тому, что в водных растворах фосфолипидные молекулы самособираются в бислойную мембрану. В мембране "жирные хвосты" упрятаны внутрь, а снаружи в контакте с водным окружением оказываются полярные "головы" этих молекул (рис. 8.10). В водном растворе происходит не только самосборка мембран (рис. 8.10, *справа*), но и замыкание мембран с образованием липидных пузырьков, называемых липосомами (рис. 8.10, *слева*).

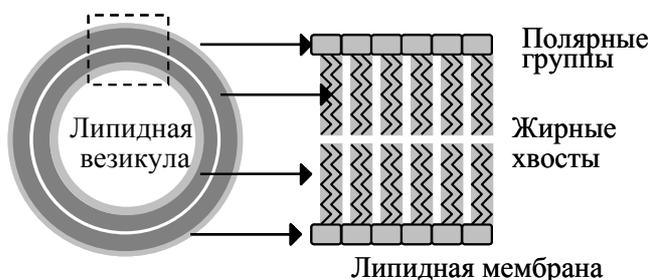


Рис. 8.11. Самосборка фосфолипидных молекул в липидных везикулы в водном растворе. Слева – фосфолипидная везикула (липосома) в водном растворе; справа – участок мембраны липосомы, выделенный пунктиром при большом увеличении.

8.6.3. *Монослой фосфолипидов на границе раздела фаз*

На поверхности водных растворов амфифильные молекулы, включая мембранные липиды, образуют мономолекулярную пленку (монослой), как это схематически изображено на рис. 8.11.

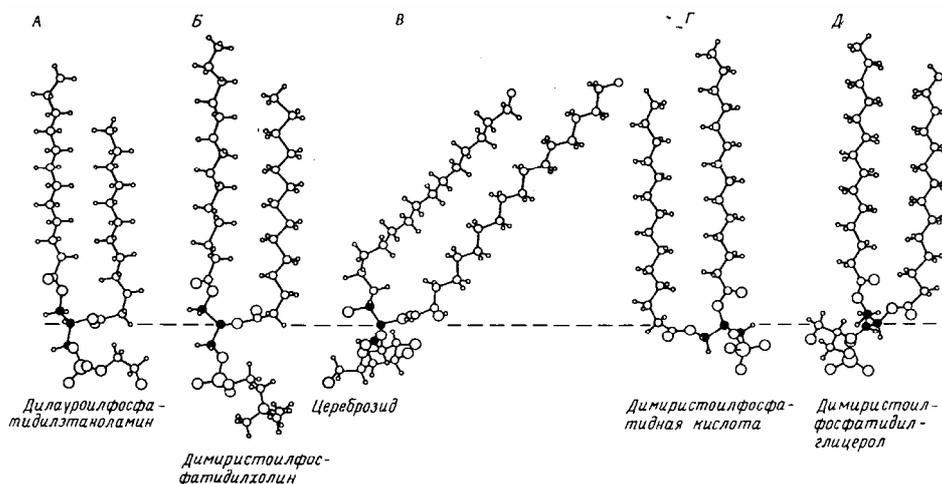


Рис. 8.11.
Расположение молекул липидов в монослой на водной поверхности.

Изучение свойств таких мономолекулярных пленок дало довольно много для понимания свойств бимолекулярного липидного слоя мембран. Прикладывая определенное боковое давление к пленке π , можно уменьшать площадь пленки S (и площадь, занимаемую каждой липидной молекулой на поверхности) (рис. 8.12).

При малых давлениях молекулы фосфолипида на поверхности воды не взаимодействуют друг с другом, образуя, так сказать, «двумерный газ» (область *a* на рис. 8.13). Затем происходит конденсации «газа» (область *b*), приводящая к образованию «жидкой» пленки на поверхности воды (область *c*). Молекулы в пленке соприкасаются друг с другом, и сжатие пленки требует преодоления упругих сил.

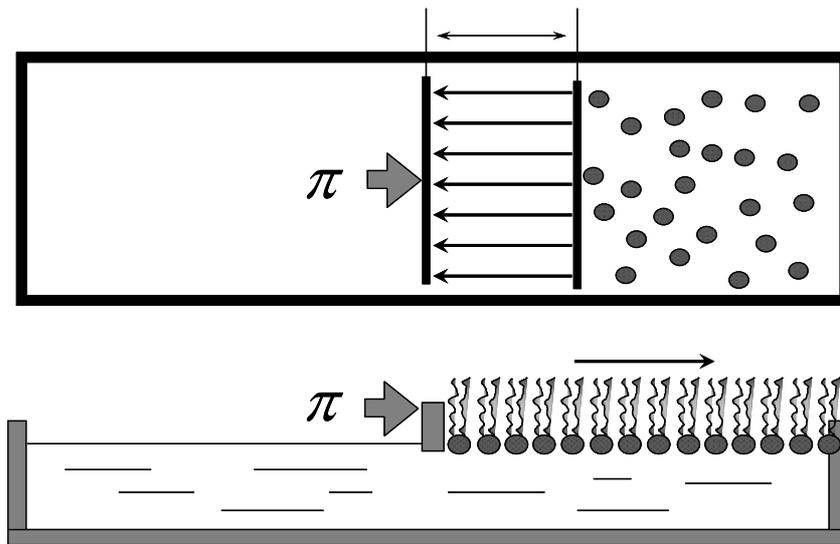


Рис. 8.12. Схема ванны Ленгмюра для изучения монослоев фосфолипидов (объяснение в тексте). Подвижная пластина на поверхности жидкости сжимает монослой с силой π [Н/м]. ΔS – изменение площади монослоя в ответ на прилагаемое воздействие.

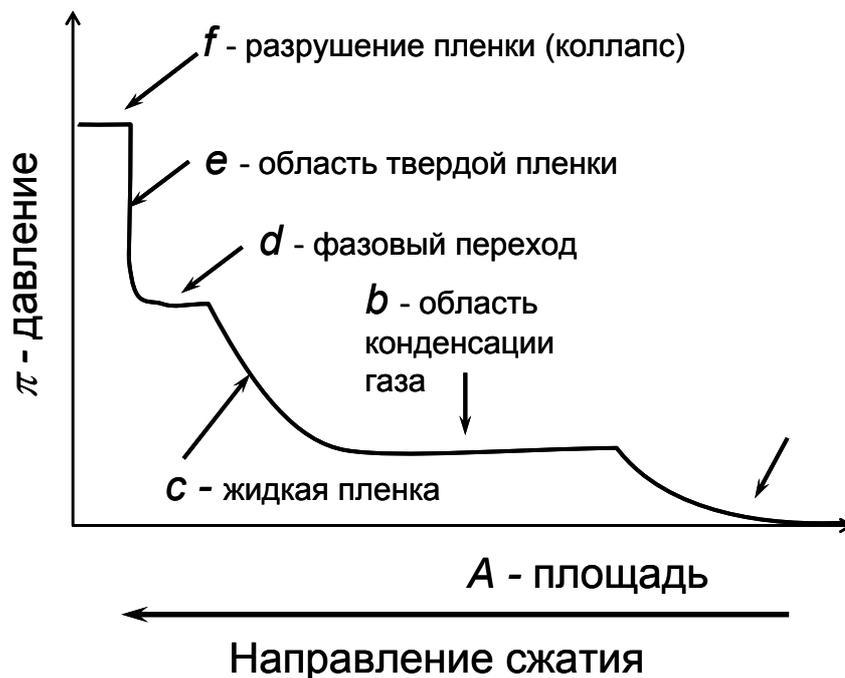


Рис. 8.13. Схематическое изображение кривых *площадь — давление* в монослоях липидов. (объяснение в тексте)

По мере сжатия жирнокислотные цепи принимают все более вытянутую форму, переходя в конце концов в полностью-транс конфигурацию. Пленка становится «твердой», т.е. почти несжимаемой (область *e*). Переход между жидким и твердым состоянием происходит «скачком», эта область сосуществования твердой и жидкой фаз соответствует плавлению монослоя (область фазового перехода *d*). Наконец, при попытке еще больше

сжать пленку, монослой разрушается, превращаясь в многослойную структуру (область коллапса, т. е. разрушения пленки – f на рис. 8.13).

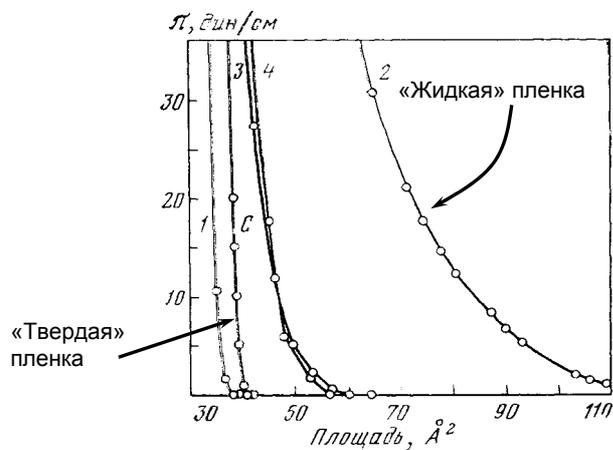


Рис. 8.14. Влияние химического состава на поведение монослоев липидов (С – холестерин, 1 – 19-норхолестерин, 2 – 16:0/18:1c-лецитин, 3 – 2+53,9 мол.% С, 4 – 2+53,9 мол.% 1).

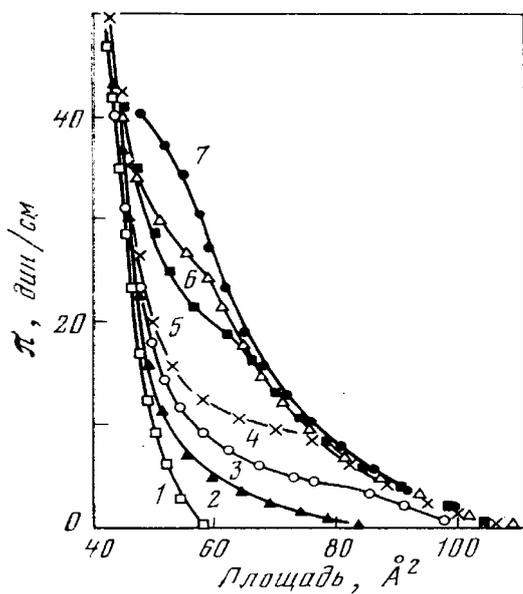


Рис. 8.15. Кривые давление – площадь при разных температурах (°C) (1 – 6,2; 2 – 12,4; 3 – 16,8; 4 – 21,1; 5 – 26,0; 6 – 29,5; 7 – 34,6).

Кривые зависимости давления от площади зависят от химического состава липидов и температуры, но в общем варьируют между двумя крайними случаями (см. рис. 8.14, 8.15). В первом случае пленка проявляет большую жесткость: начиная с некоторой

пороговой величины, площадь ее (около 50 \AA на молекулу) мало меняется даже при высоких давлениях. Молекулы липидов в этом случае с самого начала занимали малую поверхность, но зато уменьшить ее еще больше очень трудно. Такое поведение характерно для твердых тел, и монослой в этом состоянии можно назвать *твердым*. Твердое состояние в монослоях характерно для фосфолипидов, содержащих только насыщенные жирные кислоты с достаточно длинной цепочкой и при том при сравнительно низких температурах. В случае фосфолипидов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, а также насыщенные жирные кислоты с относительно короткой цепью, монослой проявляет значительную эластичность: при малых давлениях молекулы занимают большую поверхность (около $100\text{--}120 \text{ \AA}$), а с ростом давления сжимается лишь постепенно (рис. 8.14, 8.15). Такое состояние липидного слоя принято называть *жидким*.

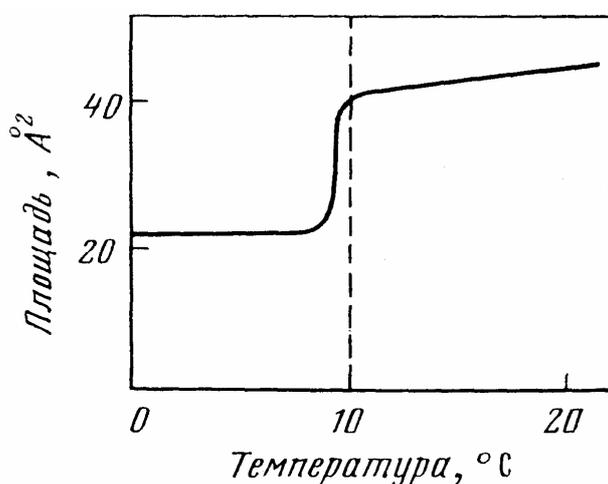


Рис. 8.16. Плавление монослоя при заданном давлении.

В некоторых случаях удастся наблюдать фазовые переходы в монослое при измерении давления при определенной температуре или при изменении температуры при заданном давлении. При этом происходит как бы переход кривых давление- площадь из одной формы в другую (средняя кривая на рис. 8.15). Особенно четко фазовые переходы в монослое можно наблюдать, если фиксировать поверхностное давление измерять площадь монослоя (в расчете на одну молекулу) при разных температурах. Как видно на рис. 8.16, при определенной температуре происходит скачкообразное изменение (при нагревании — увеличение) площади, занимаемой молекулами в монослое. Это изменение площади вызвано фазовым переходом (при нагревании — плавлением) липидов в монослое. Температура фазового перехода (T_c) зависит от химического состава липидов.

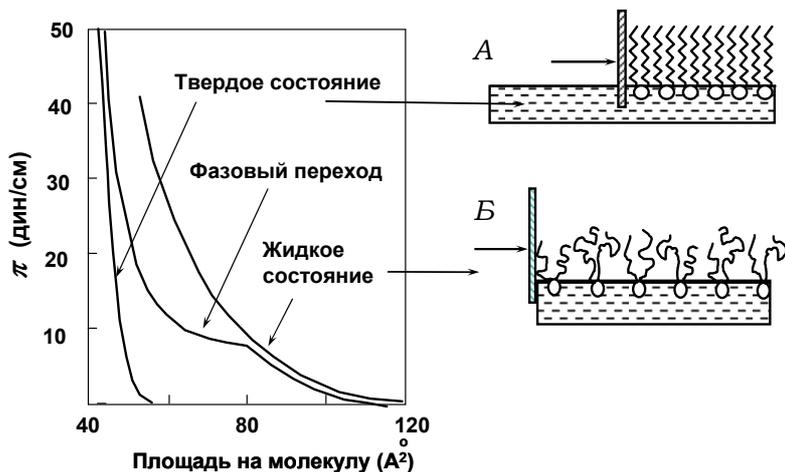


Рис. 8.17. Кривые давление – площадь при разных температурах (слева). 1 – 6,2 °С; 2 – 21,1 °С; 3 – 34,6 °С. Справа – форма молекул липидов в твердом (А) и жидком (Б) монослое.

Очевидно, что при фазовом переходе происходит изменение формы молекул в монослое (рис. 8.17). В твердом монослое углеводородные цепи жирных кислот вытянуты и находятся в полностью-транс конфигурации (А). В жидком монослое углеводородные цепи жирных кислот пребывают в различных конфигурациях и образуют относительно рыхлые клубки (Б). Такие молекулы занимают большую поверхность. Сжимая пленку, можно преодолеть стремление молекул к хаосу и заставить их «вытянуться в струнку» (фазовый переход Б → А).

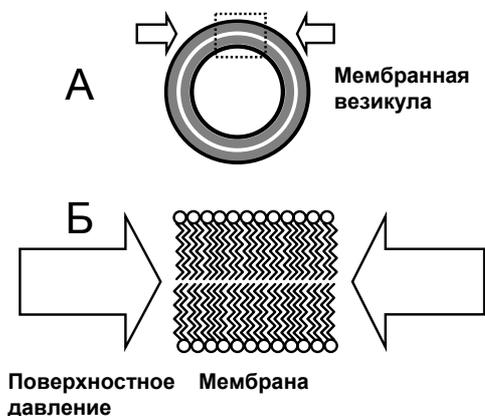


Рис. 8.18. Роль поверхностного натяжения в формировании структуры липидного бислоя.

А – замкнутая мембранная структура (везикула); Б – поверхностное давление на липидный бислой вызвано силами поверхностного натяжения.

Может показаться, что ситуация, когда липидная пленка образуется при боковом давлении, а ее свойства зависят от величины этого давления, – это ситуация искусственная, а потому монослои не могут быть моделью липидного слоя биологических мембран. Но это не так. В замкнутых фосфолипидных везикулах боковое давление в липидном бислое создается *поверхностным натяжением* на границе между водным раствором и липидной (гидрофобной) фазой, как это проиллюстрировано на рис. 8.18. Эта величина зависит от липидного и белкового состава мембран и варьирует в

фосфолипидных везикулах от 0,2 до 6,0 мН·м⁻¹, а в биологических мембранах – от 0,03 до 3,0 мН·м⁻¹ (Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. – М.: Мир, 1980. С. 94).

8.7. Модельные мембраны

Изучение физических свойств липидного слоя мембран осуществляется преимущественно на двух видах искусственных мембранных структур, образованных синтетическими фосфолипидами или липидами, выделенными из биологических источников: липосомах и бислойных липидных мембранах (БЛМ).

8.7.1. Липосомы

Липосомы – это липидные везикулы (пузырьки), образующиеся из фосфолипидов в водных растворах. Чтобы получить липосомы, спиртовой раствор фосфолипидов впрыскивают в большой объем водного раствора фосфолипиды, нерастворимые в воде, образуют мелкие пузырьки, стенки которых состоят из одного липидного бислоя (однослойные липосомы).

Можно сначала высушить раствор фосфолипидов в органическом растворителе (например, хлороформе) в пробирке, добавить в пробирку водный раствор и хорошенько потрясти пробирку. Липиды переходят в водный раствор, теперь уже в виде многослойных липосом. Суспензию липосом обычно используют для изучения физических свойств липидного бислоя как вязкость, поверхностный заряд или диэлектрическая проницаемость, а также для изучения проницаемости для незаряженных молекул.

8.7.2. Бислойные липидные мембраны (БЛМ)

Для изучения ионной проницаемости липидного слоя мембран используют БЛМ.

Для приготовления БЛМ (см. рис. 8. 19) в стаканчик с раствором электролита помещают второй, тефлоновый стаканчик, в стенке которого сделано отверстие, диаметром около 1 мм.

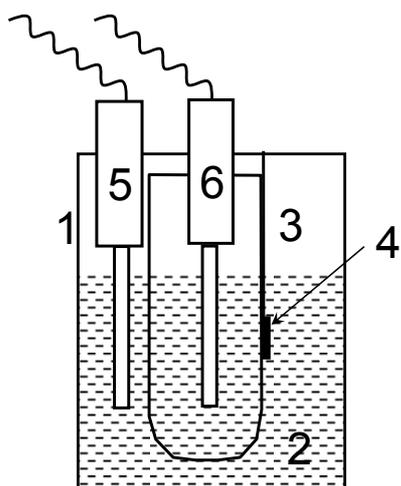


Рис. 8.20. Установка для изучения электрических свойств бислоидной липидной мембраны (БЛМ): 1 — стакан с раствором электролита (2); 3 — тefлоновый стаканчик с отверстием (4); 4 — БЛМ; 5, 6 — неполяризующиеся электроды.

С помощью капилляра в отверстие вводят маленькую каплю раствора фосфолипида в жидком углеводороде, гептане или гексане (рис. 8.20, А). Молекулы фосфолипидов собираются на поверхности капли таким образом, что полярные головки молекул обращены в водную среду, а гидрофобные хвосты — внутрь капли (рис. 8.21, Б).

Постепенно растворитель уходит из капли и улетучивается, а капля превращается в липидную пленку (БЛМ), рис. рис. 8.20, В, Г).

В БЛМ полярные головки фосфолипидов обращены в водную фазу, а неполярные углеводородные цепи жирных кислот сливаются в сплошную вязкую фазу во внутренней части липидной мембраны. По многим свойствам эта пленка сходна с липидным слоем биологических мембран.

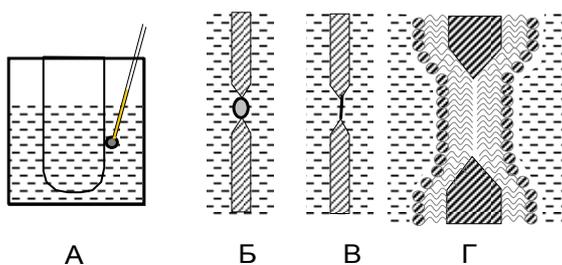


Рис. 8.20. Стадии приготовления БЛМ. Объяснения в тексте.

8.8. Фазовые переходы липидов в мембранах

8.8.1. Подвижность углеводородных цепей фосфолипидных молекул

Атомы углеводородной цепи жирных кислот соединены между собой одинарными связями, вокруг которых, как на оси, разные участки цепи могут вращаться. Это вращение приводит к тому, что жирнокислотные цепи в молекулах фосфолипидов могут находиться в самых различных конфигурациях, как это показано на рис. 8.21.

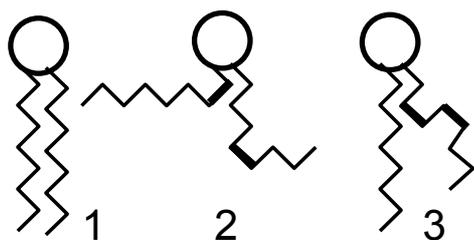


Рис. 8.21. Различные конфигурации жирнокислотных цепей фосфолипидов.

1 – все-транс-; 2 – две гош-конфигурации; 3 – одна дубль-гош-конфигурация. Жирным шрифтом выделена связь, вокруг которой произошел поворот цепи на 180° .

В результате такого вращения жирнокислотные цепи приобретают как бы гибкость, хотя на самом деле они не изгибаются в полном смысле этого слова, а лишь могут поворачиваться вокруг связей между атомами, что и приводит к изгибу молекулы в целом. За счёт изгиба цепей и постоянного теплового движения молекула фосфолипида частично утрачивает свою цилиндрическую форму и становится более сферической. На плоскости возможные конфигурации фосфолипидной молекулы изобразить трудно, но некоторые из них для иллюстрации приведены на рис. 8.21. Полностью вытянутая конфигурация (1) соответствует совершенно одинаковому расположению всех углеродных атомов друг относительно друга. Такая конфигурация называется **полностью-транс** конфигурацией. Альтернатива транс-конфигурации – это так называемая гош-конфигурация (рис. 8.21, 2). В мембранах жирнокислотные цепи стиснуты соседними молекулами, и свободная форма клубка для фосфолипидной молекулы не реализуется. Распространена поэтому двойная гош-конфигурация (рис.8.21, 3), при которой углеводородная цепь остаётся вытянутой вдоль оси.

8.8.2. Фазовые состояния липидного бислоя

В биологических мембранах липидный слой по всем имеющимся данным представляет собой жидкое тело с вязкостью, близкой к вязкости подсолнечного масла. Строго говоря, текучесть мембраны ограничена внутренней гидрофобной фазой, которая состоит из углеводородных цепей жирных кислот. Вместе с тем в расположении молекул в мембране имеется дальний порядок. Фосфолипидные хвосты расположены приблизительно параллельно друг другу. Есть порядок и в ориентации гидрофильных голов. Для простоты такое состояние липидов мы будем называть *жидким*. Липидная фаза, однако, не всегда бывает жидкой. Состояние липидов в липидном бислое очень чувствительно к изменению параметров среды (температуры, давления, ионной силы, pH и т.д.). Так, при охлаждении до температур ниже 10°C липидный слой затвердевает, приобретая свойства двумерного кристалла. Такое состояние часто называют состоянием геля, но, во избежание неопределенности мы будем в дальнейшем называть его просто *твердым*.

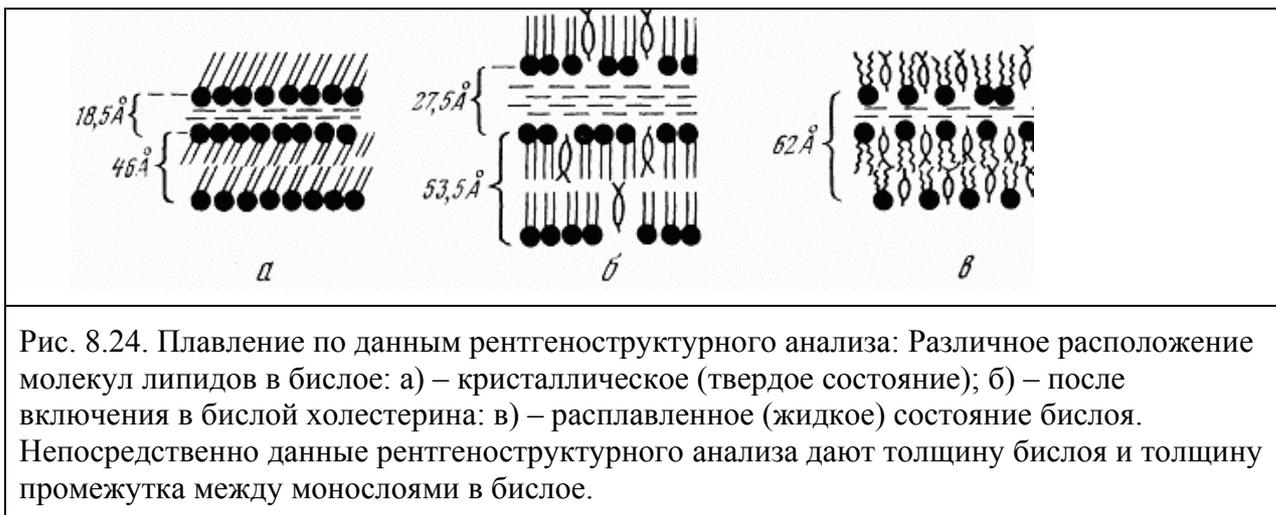


Рис. 8.24. Плавление по данным рентгеноструктурного анализа: Различное расположение молекул липидов в бислое: а) – кристаллическое (твердое состояние); б) – после включения в бислой холестерина; в) – расплавленное (жидкое) состояние бислоя. Непосредственно данные рентгеноструктурного анализа дают толщину бислоя и толщину промежутка между монослоями в бислое.

В твердом состоянии молекулы липидов в мембране расположены строго упорядоченно. Все гидрофобные углеводородные хвосты фосфолипидных молекул полностью вытянуты параллельно друг другу и имеют *полностью транс*-конформацию) (рис. 8.22, а). В жидком кристалле за счет теплового движения возможны структурные переходы: молекулы изгибаются, их параллельность в отдельных местах нарушается, поэтому толщина мембраны в гель-фазе больше, чем в жидком кристалле (рис. 8.24, в). При переходе в жидкое состояние значительно увеличиваются площадь мембраны (от 0,48 нм² до 0,58 нм²) и следовательно, несколько увеличивается объем мембраны.

8.8.3. Плавление липидов при нагревании

На примере сливочного масла мы знаем, что при низкой температуре липиды по свойствам напоминают твердое тело, а при нагревании становятся жидкими. Резкого перехода, подобно плавлению льда, не происходит ни в сливочном масле, ни тем более в липидном слое биологических мембран из-за сложного химического состава липидов в этих объектах. Но если приготовить мембранные структуры (липосомы) из синтетического фосфолипида, такого, как например, дипальмитоилфосфатидилхолин, то фазовый переход из твердого состояния в жидкое происходит в очень узком интервале температур, вплоть до всего одного градуса по шкале Цельсия.

Температура фазового перехода чистых фосфолипидов в сильной степени зависит от длины и степени ненасыщенности цепей жирных кислот. Чем длиннее цепь, тем выше температура фазового перехода, поскольку увеличивается сила вандерваальсового взаимодействия. Наличие двойных связей в цепи снижает T_c , поскольку они нарушают оптимальный взаимодействия цепей в твердом состоянии. Природные липиды обычно содержат ненасыщенные связи, благодаря чему температура фазового перехода большинства природных липидов отрицательна, т.е. в естественных условиях природные

мембраны находятся в жидком состоянии. В мембранах, образованных синтетическими липидами (как правило, насыщенными), фазовый переход из жидкого в твёрдое состояние может происходить при более высоких температурах, в зависимости от химического состава фосфолипида.

В табл. 8.6 приведены температуры фазовых переходов некоторых синтетических фосфатидилхолинов (лецитинов).

Таблица 8.5

Температуры плавления некоторых синтетических фосфолипидов

Жирные кислоты	Название остатка жирной кислоты	Сокращённое название фосфолипида ¹⁾	Температура плавления, T_c , оС
14:0	Миристоил	ДМЛ	23
16:0	Пальмитоил	ДПЛ	41
18:0	Стеароил	ДСЛ	58
18:1	Олеил	ДОЛ	-21(<i>цис</i> -форма)

1) Полное название фосфолипидов: ДМЛ – 1,2-димиристоилфосфатидилхолин (ещё одно возможное сокращение – ДМФХ) и так далее.

Фазовые переходы в липидах зависят также от давления. При повышении давления увеличивается вероятность перехода бислоя в твердую фазу, поскольку эта фаза является более плотной, чем жидкая. Заряженные липиды очень чувствительны к ионной силе и рН среды (если липид имеет pK в исследуемом диапазоне рН).

На температуру фазового перехода оказывают влияние вещества, содержащиеся в мембране, в частности, холестерин. Молекулы холестерина располагаются между фосфолипидными молекулами; они упорядочивают бислой в жидком состоянии и разупорядочивают его в твердом состоянии, уменьшая таким образом различия между жидкокристаллической и твердокристаллической структурами (рис. 8.22, б).

8.8.4. Метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии

Для изучения фазовых переходов чаще всего работают с температурными переходами, потому что их относительно легко исследовать и с высокой точностью измерять соответствующие параметры. Для проведения таких измерений обычно используют метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК). Метод называется дифференциальным, потому что измеряется только теплоёмкость суспендированного материала на фоне гораздо большей теплоёмкости раствора сравнения. Не останавливаясь на конструкции прибора, отметим только, что в конечном счёте с его помощью записывается кривая теплоёмкости, т.е. зависимость теплоёмкости липидов или мембран в

суспензии от температуры. Пример такой записи дан на рис. 8.23. По оси ординат отложена теплоёмкость, по оси абсцисс – температура.

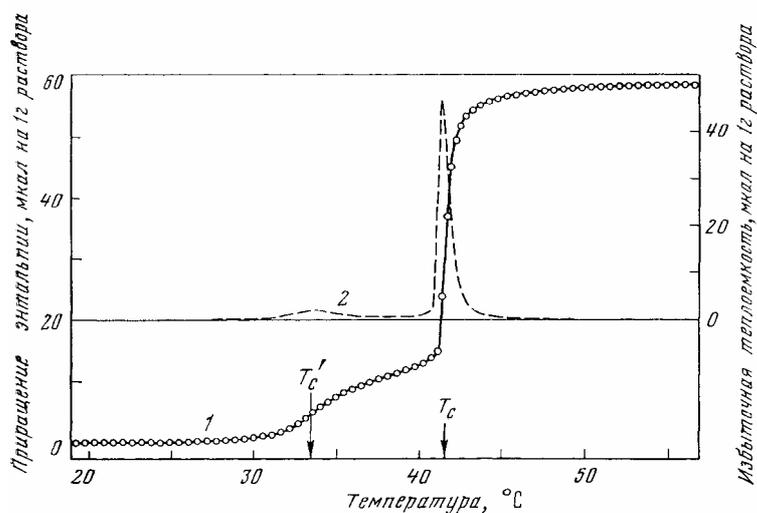


Рис. 8.23. Кривые теплоемкости и плавления ДПЛ (ДПЛ — дипальмитоиллецитин (дипальмитоилфосфатид илхолин)); 1 – кривая плавления (рассчитана путем интегрирования кривой 2), 2 – кривая изменения теплоемкости с температурой.

На рис. 8.24 обозначены параметры кривой ДСК. На первом этапе нас будут интересовать три из них:

1. Температура фазового перехода ("плавления") T_c , соответствующая середине перехода.
2. Температурный интервал ("ширина") фазового перехода (ΔT).
3. Общее количество тепла Q , поглощённого при плавлении, представляющее собой площадь под кривой ДСК, т.е. функции $C = f(T)$.

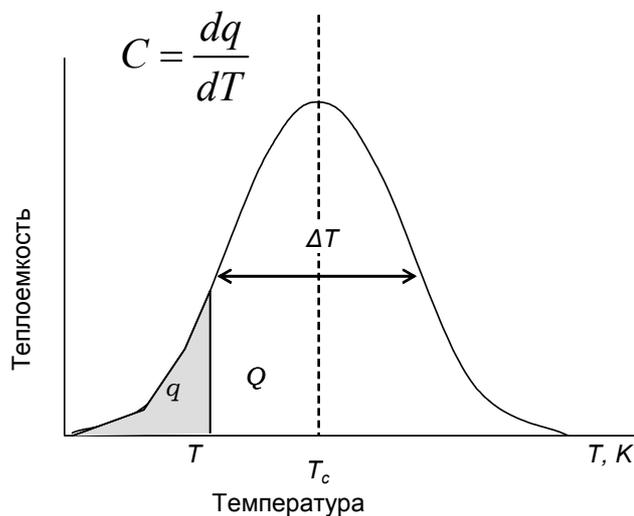


Рис. 8.24. Параметры кривой теплоемкости при плавлении, полученной методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии; C — теплоёмкость, ΔT — ширина фазового перехода, T_c — температура плавления. Заштрихованная область соответствует количеству тепла q , поглощённого при нагревании до температуры T .

8.9. Кривые плавления

Кривой плавления называется зависимость доли жидкой фазы в общем количестве изучаемого вещества, в данном случае – липидов мембран (рис. 8.25).

Обозначим количество липидов в жидкой фазе через m_l , а количество липидов в твёрдой фазе через m_s . Тогда доля жидких липидов будет равна

$$\alpha = \frac{m_l}{m_l + m_s} \quad (0.12)$$

Для определения доли жидкой фазы в общем объеме изучаемого материала, в нашем случае, в липидном слое мембран, можно использовать разные методы.

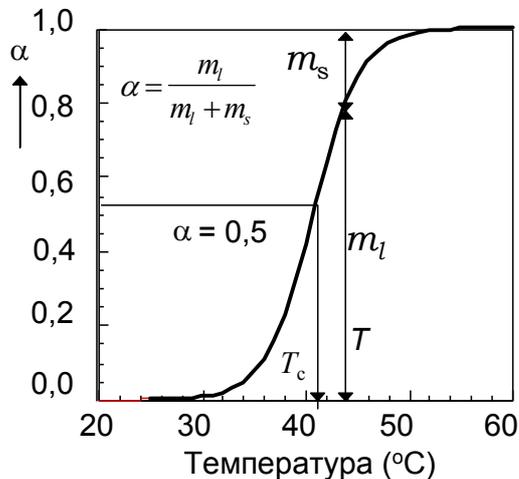


Рис. 8.28. Кривая плавления липидов в липосомах, приготовленных из ДПЛ; α — доля жидкой фазы; T — температура, T_c — температура плавления ($\alpha = 0,5$), m_l — количество липида в жидкой фазе, m_s — количество липида в твердой фазе.

8.9.1. Анализ кривых ДСК

Один из методов основан на анализе кривых, полученных методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Обратимся снова к рис. 8.24. Пусть удельная теплота плавления липида равна Q_m , а количество липидов в образце составляет m кмоль. Общее количество энергии, поглощённой образцом во всем интервале температур плавления T_1 – T_2 равно очевидно площади под кривой $C = f(T)$, т.е.

$$Q = Q_m \cdot m = \int_{T_1}^{T_2} CdT \quad (0.13)$$

В интервале температур от T_1 до текущей температуры T расплавится количество молей липида m_l , и при этом поглотится количество тепла, равное

$$q = Q_m \cdot m_l = \int_{T_1}^T CdT \quad (0.14)$$

(заштрихованная площадь на рис. 8.24).

При температуре T мольная доля липидов, находящихся в жидкой фазе равна

$$\alpha = \frac{m_l}{m} = \frac{m_l}{m_l + m_s} = \frac{q}{Q} \quad (0.15)$$

Измеряя отношение площадей под кривой $C=f(T)$ при разных температурах, мы, таким образом, строим кривую плавления $\alpha = f(T)$ (рис. 8.25).

8.9.2. Измерение флуоресценции зондов

Многие флуоресцирующие соединения обладают тем свойством, что спектры и (или) квантовые выходы их флуоресценции сильно зависят от окружающей среды: её полярности, вязкости и других характеристик. Растворяясь в липидной фазе мембран, эти соединения могут информировать о физических свойствах их окружения. Эти вещества получили названия флуоресцентных зондов, формулы некоторых зондов были приведены ранее (рис. 2.13). Один из них, 1-анилино-2-нафталенсульфонат (АНС), применяется особенно часто.

Этот зонд хорошо флуоресцирует в органических растворителях и в связанном с мембранами состоянии, но очень слабо флуоресцирует в водном растворе. При добавлении АНС к суспензии мембран он распределяется между водной и липидной фазами, но флуоресцирует практически только АНС, растворённый в липидной фазе. Поэтому интенсивность флуоресценции возрастает при плавлении липидов мембран и снижается при замерзании.

На рис. 8.26 показаны кривые плавления, измеренные с помощью другого флуоресцентного зонда – МБА. Это гидрофобный зонд, который флуоресцирует в липидной фазе мембран.

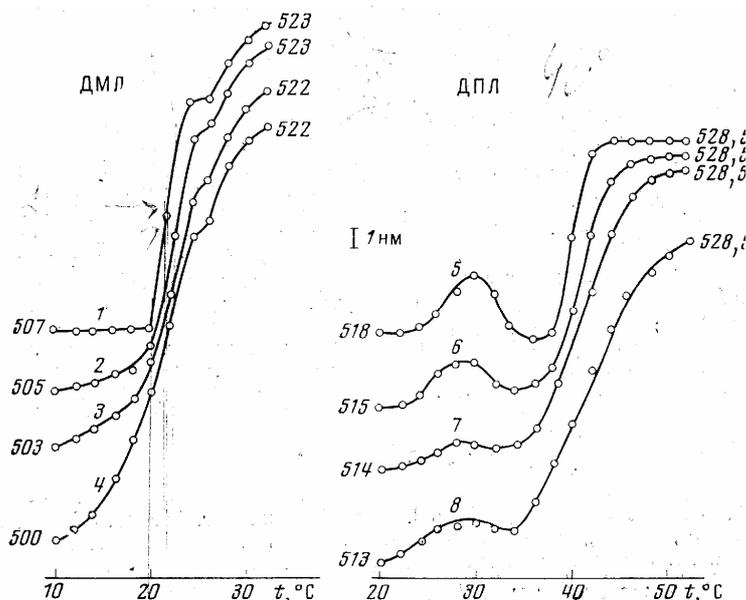


Рис. 8.26. Кривые плавления, измеренные с помощью флуоресцентного зонда МБА.

Цифры слева от кривых обозначают исходное положение максимума флуоресценции, справа — конечное. В этом опыте липосомы были сформированы из ДМЛ (слева) и ДПЛ (справа).

При плавлении липидного слоя мембран происходит длинноволновый сдвиг флуоресценции МБА; измеряя этот показатель, можно рассчитать кривую плавления способом, изображенным на рис. 8.27. При температуре ниже фазового перехода (в

данном случае $\leq 34^\circ\text{C}$) все липиды в мембране находятся в жидком состоянии, а при температуре выше фазового перехода (в нашем случае $\geq 50^\circ\text{C}$) – в твердом. Будем считать, что измеряемый параметр (в нашем случае – положение максимума флуоресценции) линейно изменяется с увеличением доли жидкой фазы (что, вообще говоря, не всегда верно). Тогда отношение величин l/s на рисунке 8.27 покажет соотношение жидкой и твердой фаз в системе, а величина $l/(s + l)$ – долю жидкой фазы в общем количестве липида. Зависимость последней величины от температуры и есть кривая плавления.

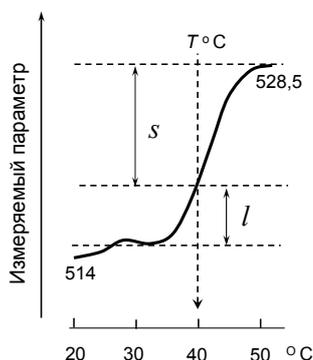


Рис. 8.30. Способ расчета кривых плавления по экспериментальным данным. Для расчета взята одна из кривых на рисунке 8.26). Отношение величин l/s показывает соотношение жидкой и твердой фаз в системе.

8.9.3. Использование спиновых зондов

Спиновыми зондами называют стабильные радикалы (в которых неспаренный электрон принадлежит практически во всех случаях группе иминоксила $>\text{N}\cdot=\text{O}$), которые встраиваются в биомолекулы или в липидный слой мембран без образования ковалентных связей и в этом отношении отличаются от *спиновых меток*. Примером спинового зонда может служить молекула 5-доксилстеарата, химическая формула и спектр ЭПР которой показаны на рис. 3.11. В сущности, этот зонд является спин-меченной молекулой стеариновой кислоты.

Метод ЭПР оказался весьма ценным для изучения свойств липидного слоя мембран. Применение спиновых зондов основано на зависимости спектров ЭПР этих соединений от условий микроокружения в мембране: вязкости, полярности среды и других. Поскольку при фазовом переходе происходит изменение этих свойств (например, микровязкость возрастает при плавлении твердого бислоя), зонды могут применяться также и для изучения кривых плавления. Принцип обработки данных тот же, что и в случае использования других методов.

В качестве характеристики свойств микроокружения используют либо интегральную характеристику вращательной подвижности зонда, так называемое время корреляции (обозначаемое обычно как τ), либо характеристику асимметрии вращательного движения, параметр упорядоченности (обозначаемый как S). Величина τ близка к среднему времени поворота молекулы зонда вокруг любой из осей на угол один радиан. Для исследований микровязкости в мембранах часто используют небольшую и компактную молекулу соединения, получившего аббревиатуру TEMPO (2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил), формула и ЭПР спектр которого приведены на рис. 3.9. Положение спектра нитроксидного радикала (g -фактор) и сверхтонкое расщепление зависят от ориентации молекулы относительно внешнего поля. При быстром вращении эти различия не проявляются и спектр характеризуется узкими линиями сверхтонкого расщепления. В вязкой среде молекулы вращаются медленно и сигнал ЭПР представляет собой суперпозицию сигналов отдельных молекул, как бы застывших в разных положениях. Поэтому измеряемый сигнал характеризуется сглаженными и раздвинутыми максимумами сверхтонкой структуры. На рис. 3.10 приведены спектры для самых разных случаев – от свободного вращения TEMPO до полной неподвижности, что соответствует очень жидкому и очень вязкому окружению. Если нитроксильный радикал находится в водном растворе, то его вращение является изотропным и достаточно быстрым, что приводит к усреднению анизотропии спектра ЭПР (верхний спектр). При уменьшении скорости вращения проявляются анизотропные взаимодействия, которые приводят к уширению линий и соответственно изменению амплитуд компонент спектра, а затем и к сдвигу крайних компонент. Немаловажно, что этот метод очень чувствителен, обычно спектр регистрируется при концентрации спиновых меток около 10^{-6} М в 50 мкл образца. В случае таких вытянутых молекул, как 5-доксилстеарат характеристика времени корреляции (τ) не подходит, т.к. поворот зонда вокруг разных осей происходит за совершенно разное время, тем более в такой асимметричной среде как липидный бислой. В этом случае правильнее использовать параметр упорядоченности S . Дело в том, что если спиновый зонд присоединен где-то к середине жирнокислотной цепи в молекуле жирной кислоты, встроенной в мембрану, его вращение будет происходить преимущественно вокруг длинной оси молекулы жирной кислоты, т.е. появится анизотропия вращения. Это отразится на спектре ЭПР. Параметр упорядоченности S равен 1, если вращение зонда происходит только вокруг нормали к мембране. При разжижении мембраны конус вращения будет расширяться, и значение параметра S будет приближаться к нулю. Таким образом, параметр упорядоченности растет с увеличением вязкости и

структурированности мембраны, в том числе при фазовом переходе липидного бислоя из жидкого состояния в твердое.

Интересным следствием использования спиновых зондов, содержащих жирную кислоту, является возможность измерения параметра упорядоченности на разных расстояниях от поверхности мембраны, так называемый *профиль упорядоченности* или *профиль вязкости*. Подобные измерения представляются возможными при использовании набора однородных спиновых зондов, которые содержат нитроксильный фрагмент на разном расстоянии от карбоксильной группы. Например, используются спиновые зонды с нитроксильным радикалом у 5, 7, 12 и 16 атома углерода стеариновой кислоты. Набор этих соединений позволяет измерять S параметр на расстояниях 3,5, 5, 8,5 и 10,5 Å от поверхности мембраны (см. рис. 3.12).

8.9.4. Светорассеяние

Метод светорассеяния дает немного для понимания физических свойств липидного бислоя, но вполне достаточен, чтобы проследить за фазовыми переходами в суспензии липосом при изменении температуры или при иных воздействиях. Чтобы понять принцип применения метода, обратимся к рис. 8.28. Рассеяние света везикулой связано с тем, что показатели преломления липидного слоя и окружающей водной среды различаются, а сам липидный слой имеет кривизну. Наибольшее отклонение от первоначального направления имеют лучи, попавшие на край везикулы (рис. 8.28, А, нижняя стрелка). Другие лучи отклоняются тем меньше, чем ближе они к центру сферы. В совокупности происходит рассеяние падающего света. Рассеяние это тем выше, чем больше различие в показателях преломления стенок сфер, т.е. липидных слоев мембран и водного раствора. Твердые мембраны плотнее и имеют более высокий показатель преломления, чем жидкие. Поэтому рассеяние света сильнее везикулами, липиды которых находятся в твердом состоянии. Измеряя светорассеяние (или светопропускание) суспензии при разных температурах, можно построить кривые плавления, используя тот же общий подход, как и в других случаях.

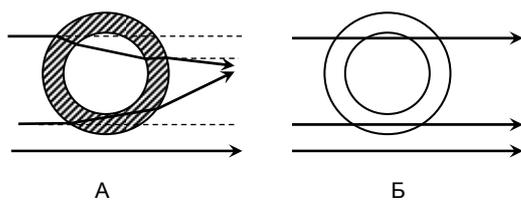


Рис. 8.31. Рассеяние света везикулой.

А – твердое состояние липидной мембраны (высокий показатель преломления), Б – жидкое состояние липидной мембраны (низкий показатель преломления).

8.10. Кооперативность фазовых переходов

8.10.1. Фазовое равновесие

В области температур фазового перехода при достаточно медленном плавлении устанавливается равновесие:

Твёрдое состояние \leftrightarrow Жидкое состояние

Можно считать, что вся мембрана состоит из участков жидких липидов и участков твёрдых липидов. Тогда обратимый процесс фазового перехода можно рассматривать как процесс превращения таких участков (доменов) друг в друга со скоростями, пропорциональными концентрации доменов, иначе говоря, фазовое равновесие можно рассматривать как обратимую химическую реакцию:



Константа равновесия этой реакции равна

$$K = \frac{[l]}{[s]} = \frac{m_l}{m_s} \quad (0.16)$$

где $[l]$ и $[s]$ – концентрации липидов в жидкой и твёрдой фазах, m_l и m_s – количество липида в жидкой и твёрдой фазах, соответственно. Изменение свободной энергии ΔG при плавлении моля липида равно изменению энтальпии ΔH минус изменение тепловой энергии $T\Delta S$:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (0.17)$$

Учитывая, что

$$\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln \frac{m_s}{m_l}, \quad (0.18)$$

находим

$$-\ln K = \frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} - \frac{\Delta S}{R}, \quad (0.19)$$

при том, что

$$K = \frac{m_l}{m_s} = \frac{q}{Q - q} \quad (0.20)$$

Таким образом, зависимость $-\ln K$ от $1/T$ представляет собой прямую линию с угловым коэффициентом $\frac{\Delta H}{R}$ и отрезком, отсекаемым на оси ординат, равной $\frac{\Delta S}{R}$. Примеры такого рода прямых даны на рис. 8.29. Объяснение величины n на этом рисунке будет дано ниже.

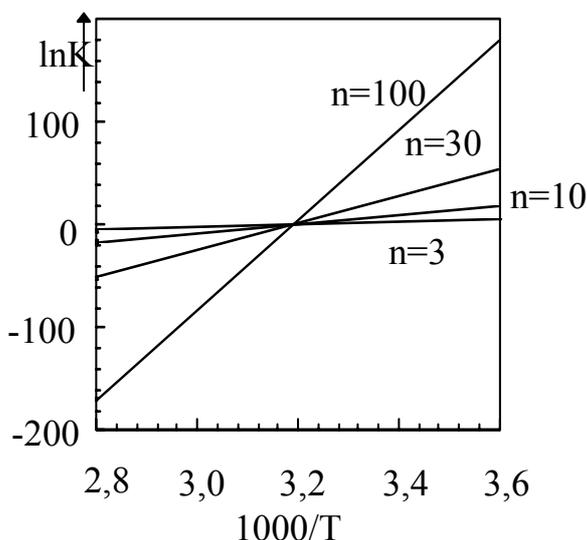


Рис. 8.29. Зависимость $\ln K$ от обратной абсолютной температуры; отрезок, отсекаемый на оси ординат позволяет найти энтропию плавления, угловой коэффициент — энтальпию плавления; n — размеры кооперативной единицы плавления.

Из кривых плавления, полученных экспериментально, можно найти термодинамические характеристики процесса ΔH и ΔS . Для этого:

1. Находим отношение $K = \frac{m_s}{m_l}$ при разных температурах T , °С.
2. Строим зависимость $\ln K$ от обратной абсолютной температуры ($1/(T^\circ\text{C}+273)$).
3. Рассчитываем ΔH , исходя из того, что тангенс угла наклона прямой равен $\frac{\Delta H}{R}$;
4. Рассчитываем ΔS , зная, что отрезок, отсекаемый по оси ординат, равен $\frac{\Delta S}{R}$.

8.10.2. Понятие кооперативной единицы

Из кривых теплоёмкости можно найти теплоту плавления образца Q (см. рис. 8.24) и молярную теплоту плавления $Q_m = Q/m$, где m — количество молей липида в образце (рассчитано как масса липида, делённая на его молекулярную массу). С другой стороны, анализ кривых плавления позволяет определить энтальпию плавления ΔH . На первый взгляд величины Q_m и ΔH должны быть примерно равны, поскольку система не совершает механической работы. Однако оказалось, что при плавлении синтетических липидов ΔH превышает Q_m в десятки, а иногда и в сотни раз.

В чём же тут дело?

Вернёмся к основному уравнению (0.19). Его применение основано на том, что "...фазовое равновесие можно рассматривать как обратимую химическую реакцию $s \leftrightarrow l$ с константой равновесия $K = \frac{m_l}{m_s}$ ". Спрашивается, какие "молекулы" s переходят в этой реакции в

"молекулы" l . Очевидно, что это не отдельные молекулы фосфолипида, поскольку одна молекула не может находиться в жидкой или в твёрдой фазе. Переходит из одного состояния в другое одновременно несколько молекул, объединенных в *группу*, а лучше сказать *кооперативную единицу*. В пределах кооперативной единицы все молекулы находятся в одинаковом состоянии, образуя либо кристаллическую (твёрдую) фазу либо жидкую фазу. Каждая *группа* может изменять своё фазовое состояние по закону "всё или ничего" и притом совершенно независимо от других групп. В этом смысле кооперативные единицы представляют собой как бы «сверхмолекулы», которые могут переходить из состояния l в состояние s . Изменение свободной энергии ΔG , энтальпии ΔH и энтропии ΔS в уравнении (0.19) относится к молю таких "сверхмолекул". Довольно очевидно, что если кооперативная единица образована n молекулами фосфолипида, то

$$\Delta H = n \cdot Q_m \quad (0.21)$$

где n – размер кооперативной единицы, т.е. число молекул фосфолипида, входящих в одну кооперативную единицу.

Таким образом, из кривых плавления мы находим теплоту плавления в расчёте на n молей фосфолипида, тогда как из данных калориметрии мы определяем теплоту плавления в расчёте на один моль фосфолипида. Если одновременно получены данные калориметрии, позволяющие определить теплоту плавления Q и рассчитать молярную теплоту плавления Q_m , и величины ΔH по кривым плавления, то разделив ΔH на Q_m , мы получим размер кооперативной единицы n . После этого можно из данных по кривым плавления найти ΔS в расчёте не на моль кооперативных единиц, а на один моль фосфолипида. В табл. 8.6 приведены полученные таким образом термодинамические параметры плавления синтетических фосфолипидов (в расчёте на один моль фосфолипида).

Таблица 8.6

Термодинамические параметры переходов гель–жидкий кристалл для 1,2-диацил-L-фосфатидилхолинов (по Phillips, 1972)

Фосфолипид	T_c , °C	ΔH , ккал/моль	ΔS , кал/моль
ДОЛ (18:1)	-21	7,6	30,3
ДМЛ (14:0)	23	6,64	22,4

ДПЛ (16:0)	41	8,66	27,6
ДСЛ (18:0)	58	10,67	32,4
ДБЛ (22:0)	75	14,88	42,8

8.10.3. Влияние размера кооперативной единицы на форму кривых плавления

Чтобы проанализировать влияние кооперативности фазовых переходов на форму кривых плавления и калориметрических кривых, нам придётся произвести некоторые расчеты. Главной характеристикой формы кривой плавления служит, как нетрудно догадаться, температурный интервал фазового перехода. Хотя это не принципиально, давайте примем за этот интервал разницу температур $T_2 - T_1$, при которых в системе соотношение жидкой фазы к твердой составляет соответственно 10:1 и 1:10. При этом

$$\ln K_2 = 1 \text{ и } \ln K_1 = -1$$

Из уравнений (0.19) и (0.21) находим

$$\begin{aligned} \ln K_1 - \ln K_2 &= \frac{nQ}{R} \cdot \frac{1}{T_2} - \frac{nQ}{R} \cdot \frac{1}{T_1} = -2; \\ -\frac{2R(T_1 T_2)}{nQ} &= T_1 - T_2; \\ \Delta T &= \frac{2R(T_1 T_2)}{Q} \cdot \frac{1}{n} \end{aligned} \quad (0.22)$$

Из этого уравнения видно, что при равных прочих условиях ширина температурного интервала фазового перехода обратно пропорциональна размеру кооперативной единицы. Как видно на рис. 8.30, включение холестерина в липидный слой уменьшает размер кооперативной единицы плавления, поскольку при росте содержания холестерина в мембране ширина температурного интервала перехода увеличивается, а амплитуда кривой поглощения тепла, соответственно, уменьшается (площадь под кривой, равная теплоте плавления при этом остается прежней).

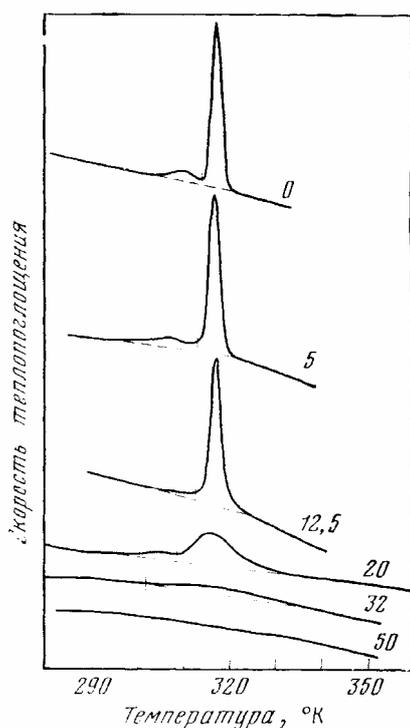


Рис. 8.30. Влияние холестерина на кривые теплоемкости по данным ДСК.

Цифры у кривых показывают содержание холестерина в молярных процентах.

8.11. Физическое состояние липидного бислоя и активность ферментов в биомембранах

На рисунке 8.31 приведены данные о влиянии холестерина на микровязкость мембраны (оцененную по параметру упорядоченности S вращения спинового зонда) и на активность фермента Na-K-АТФазы в мембранах эритроцитов. Хорошо видно, что холестерин увеличивает микровязкость липидного бислоя и, как и следовало ожидать, тормозит работу фермента, осуществляющего транспорт ионов натрия и калия и поддерживающего тем самым водно-солевой баланс в клетке и электрический потенциал на мембране. Имеется обширная литература, в которой наблюдали изменение микровязкости мембран при самых различных воздействиях, как в норме так и при различных заболеваниях. Неизменным было всегда только одно: обратная зависимость между вязкостью липидного бислоя и активностью мембранных ферментов и белковых рецепторов. Это легко понять, если учесть, что белковые молекулы, как и люди, должны “пошевеливаться”, чтобы хорошо выполнять свою работу.

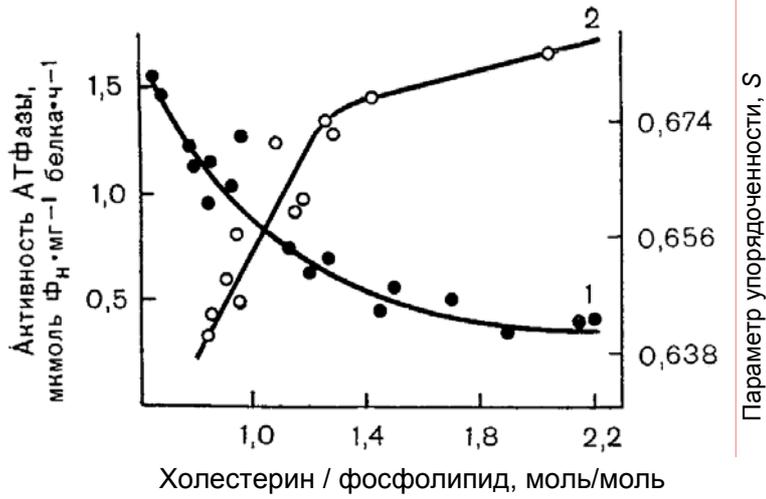


Рис. 8.34. Зависимость активности Na⁺, K⁺-АТФазы (1) и микровязкости (2 – параметр упорядоченности S) от содержания холестерина в мембране эритроцита.