

Лекция №8.

Тема: Мембранные потенциалы.

Биологические мембраны являются одними из первых и наиболее универсальных типов надмолекулярных структур в живой природе. Они не только отделяют клетку (или целый организм) от внешнего мира, но входят в состав внутриклеточных органелл – ядра, митохондрий, лизосом, аппарата Гольджи и т.п. – и в виде эндоплазматического ретикулума пронизывают практически все внутриклеточное пространство от ядра до плазматической мембраны.

Уникальность мембран как биологических структур с точки зрения физики определяется уже тем, что они являются микроскопическими объектами в поперечном направлении, но макроскопическими по размерам в плоскости. Этим в значительной мере затрудняется микроскопическое и макроскопическое описание их структуры и функционально важных перестроек.

Принципиально важен, но не решен вопрос о том, в какой мере и для каких случаев можно рассматривать структурные изменения в белково-липидных комплексах мембран как, например, равновесные фазовые переходы. Не ясно, следует ли говорить о спонтанной упорядоченности, свойственной равновесным системам типа жидких кристаллов, или о вынужденной упорядоченности, характерной для открытых систем. Линейная неравновесная термодинамика широко применяется для описания явлений переноса веществ через мембраны. Однако имеются основания считать, что биомембраны являются существенно нелинейными элементами.

Имеется точка зрения, согласно которой клеточные мембраны – пограничные структуры, с участием которых осуществляются необратимые процессы обмена энергией и веществом, - являются своего рода активной средой, удаленной во время функционирования от состояния термодинамического равновесия. Удаленные настолько, чтобы нарушались линейные соотношения между обобщенными термодинамическими силами и

потоками и чтобы в них стало возможно возникновение автоволновых процессов, формирование устойчивых диссипативных структур, определяющих разделение фаз, локальные механические свойства и кривизну мембран, латеральные распределения компонентов: агрегацию (кластеризацию) липидов и белков, образование олигомерных комплексов ферментов, каналов, щелевых контактов, рецепторов и пр. Здесь равновесной самосборке противопоставляется самоорганизация термодинамически неравновесных систем. В самом общем смысле речь идет о неравновесных фазовых переходах. Подобный подход в принципе позволяет объяснить интегративные свойства биомембран их макроскопическую кооперативность и специализированное явление возбудимости как частный случай перехода диссипативной структуры между двумя состояниями.

Неравновесность является также физической основой функционирования молекулярных машин: ферментов, ионных насосов, АТФ – синтетаз, АТФаз (релаксационная модель). В этом случае, как и в случае латеральной самоорганизации мембран, существенным не конечные состояния, а переходы, в процессе которых осуществляется сопряжение энергозависимых процессов - энергодонорных и энергоакцепторных. Локальные механохимические акты в ферментах, каналах и насосах могут обеспечить подкачку энергии в мембрану, а неравновесность латерального распределения компонентов мембран, фазовых изменений, механических напряжений, изменений кривизны может, в свою очередь, служить способом промежуточного запасаения энергии в процессах её преобразования. Это рассуждение, в принципе, можно распространить на процессы фотосинтеза и окислительного фосфорилирования, добавив к традиционным представлениям о депонировании энергии в форме трансмембранного неравновесного распределения ионов гипотезу о двумерном неравновесном распределении компонентов мембран. Напрашивается вывод о том, что неравновесная мембрана – это и есть промежуточный макроэрг

Практически все фундаментальные жизненные процессы – такие как биоэнергетические, включая фотосинтетическое и окислительное фосфорилирование, деление клеток, транспорт веществ, возбудимость и проведение нервного импульса, сенсорную рецепцию, эмбриогенез, индивидуальное развитие и контактное торможение, - осуществляется с прямым или косвенным участием биологических мембран. Существующая контактная связь между внутренней стороной цитоплазматической мембраны и цитоскелетом - системой микротрубочек и микрофиламентов – играет важную роль в обеспечении подвижности и других видов функциональной активности клеток. Мембрана как единое функциональное образование определяет топографию и внутреннее устройство олигомерных ферментов и полиферментных комплексов и через межмолекулярные взаимодействия регулирует уровень каталитической активности и специфичности ферментов. Благодаря этому существуют прямые связи между мембранными структурами и метаболизмом клетки.

В плазматических мембранах и мембранах органелл локализованы ионные каналы пассивной проницаемости (натриевые, калиевые, кальциевые, хлорные, протонные), а также системы активного транспорта ионов против градиентов их электрохимических потенциалов (например, натриевые, протонные, кальциевые насосы), ответственные за поддержание такого важного фактора жизнедеятельности, как ионный гомеостаз. С этими же элементами мембран связано формирование мембранного потенциала и спайковой активности нервно – мышечной системы, определяющих разнообразные формы двигательной и нервно – психической активности организмов.

В мембранах локализованы также системы избирательного транспорта органических веществ и неорганических молекул, основанные на сопряженном переносе их с протонами и ионами натрия, распределёнными неравновесно (симпорт, антипорт).

Пространственно – временная организация мембран обусловлена рядом факторов. В мембране существуют два структурно обособленных, но функционально объединенных матрикса: липидный бислой с включенными интегральными и периферическими белками (двумерное образование) и трехмерный белковый каркас. Модель, предполагающая существование относительно жесткого каркаса белков мембраны и цитоскелета, пронизывающего жидкокристаллический белково – липидный слой, по-видимому, наиболее адекватно отражает надмолекулярную организацию, механические, барьерные и интегральные свойства биологических мембран.

Для липидных и белковых молекул мембран характерна высокая латеральная подвижность в плоскости мембран. Относительно редкими событиями являются переходы липидов между внутренним и внешним монослоями липидного бислоя. Эндоцитоз и экзоцитоз, с помощью которых осуществляются поглощение и выброс веществ клетками, обеспечивают циркуляцию и обновление молекул плазматических мембран. За каждые 50 минут в таком цикле, например, в эпителии, принимает участие количество мембранного материала, эквивалентное всей клеточной поверхности.

Для биологических мембран характерна латеральная гетерогенность и поперечная асимметрия в распределении белков, липидов, гликопротеинов. Этим обуславливаются пространственная индивидуализация функциональных белков, кооперация специализированных транспортных, рецепторных, механохимических комплексов, четкое разграничение внутреннего от внешнего как в отношении рецепции сигналов, так и в отношении векторных реакций транспорта и катализа в системах «клетка – среда» или «компарменты клетки – цитоплазма». Липиды нативных биомембран могут находиться в жидкокристаллическом или гелеобразном состоянии, определяющем функциональную зависимость мембраносвязанных белков. При этом наблюдается разделение фаз, для которого характерно также гетерогенное распределение липидных молекул разных типов.

Биомембраны представляют собой системы с выраженными проявлениями кооперативности и дальнего действия, что обеспечивает согласованное поведение их компонентов и способность эффективного управления через генерализованные перестройки при достижении пороговой интенсивности стимула.

Поверхностный заряд биомембран.

Вещества, несущие положительный или отрицательный заряд и расположенные близко к поверхности мембраны, определяют такое свойство биомембран, как **поверхностный заряд**. Он оказывает решающее влияние на процессы взаимодействия между клетками, связывания с мембранными рецепторами и другие явления. Поверхность многих биомембран в целом имеет отрицательный заряд, что определяется наличием на их поверхности силовых групп полисахаридов, фосфатных групп фосфолипидов, карбоксильных групп белков. Полярные аминогруппы в большинстве случаев расположены на поверхности мембран

Если пропустить электрический ток через раствор электролита, содержащий заряженные коллоидные частицы, то в результате движения частиц под действием электрического поля на их поверхности возникает дзета-потенциал:

$$\xi = 4\pi\eta U/VД, \quad \text{где}$$

η — вязкость растворителя,

U — скорость движения заряженных частиц (мкм/с),

$Д$ — диэлектрическая проницаемость растворителя,

V — напряженность поля (В/см).

Так как η и $Д$ постоянны при низких концентрациях солей в растворе, дзета-потенциал зависит только от U и V . В физиологическом растворе, ионная сила которого равна 0,125, скорость движения эритроцитов человека составляет 1,2 мкм/(с·В·см) .

Если поверхность коллоидных частиц заряжена отрицательно, то катионы в растворе концентрируются вблизи поверхности, образуя двойной электрический слой, в котором катионы диффундируют за счет теплового движения.

В результате действия этих двух факторов частицы распределяются в растворе, образуя диффузный двойной слой, а электрический потенциал зависит от пространственной координаты, плавно изменяясь от поверхности мембраны до удаленной от неё части раствора. Современная теория возникновения потенциала на биологических мембранах не учитывает поправки, обусловленной конечными размерами ионов и специфической адсорбцией ионов на поверхности. Одновременное действие на ионы электрических сил и сил, обусловленных тепловым движением в растворе, можно описать математически, используя электростатическое уравнение Пуассона и статистический закон Больцмана.

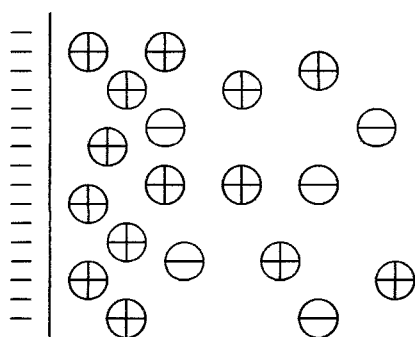
Уравнение Пуассона описывает кулоновские взаимодействия заряженных частиц и связывает изменение градиента электрического потенциала с плотностью заряда:

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = -\frac{\rho}{\epsilon}, \quad \text{где}$$

ρ – объемная плотность заряда,

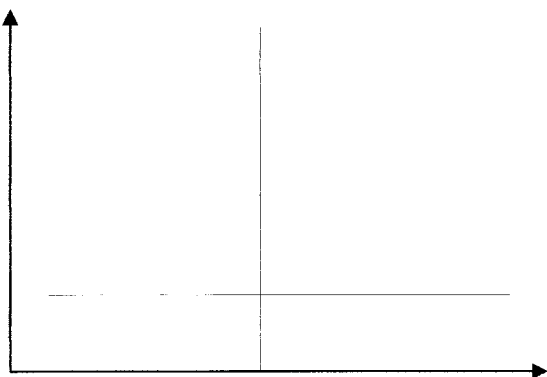
ϵ – абсолютная диэлектрическая проницаемость.

Распределение ионов в электролите вблизи заряженной поверхности.



Диффузный
электрический слой,
или ДЭС

Распределение электрического потенциала на границе раздела двух фаз.



Электрический заряд, ответственный за появление электрического потенциала в солевом растворе, обусловлен отклонением раствора от электронейтральности, т.е. равен разности между суммарным зарядом катионов и анионов на разделе фаз. В реальной ситуации на заряженные частицы действуют ^{из}только электростатические силы – но перемещению ионов к противоположно заряженной поверхности препятствует тепловое движение.

$$\epsilon = \epsilon_{\text{отн}} \cdot \epsilon_0, \quad \text{где}$$

ϵ_0 – постоянная диэлектрическая проницаемость.

Статистический закон Больцмана связывает концентрацию ионов с электрическим потенциалом ϕ и с концентрацией этих ионов в той части раствора, которая находится далеко от мембраны и потенциал которой приблизительно равен 0.

$$\text{Локальная концентрация ионов } C_j = C_{j\infty} \cdot e^{-ZF\phi/RT}, \text{ где}$$

Z – валентность ионов.

$$\text{Для } K^+ \text{ и } Na^+ - Z = 1$$

$$C_K^+ = C \cdot e^{-F\phi/RT} \quad \text{Локальная концентрация ионов.}$$

$$C_{Cl^-} = C \cdot e^{+F\phi/RT}$$

Локальная объёмная плотность заряда равна разности локальных концентраций катионов и анионов, умноженной на число Фарадея:

$$\rho = F(C_K^+ - C_{Cl^-})$$

Тогда уравнение Пуассона:

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = \frac{Fc}{\epsilon} \left(e^{-F\phi/RT} - e^{F\phi/RT} \right)$$

Решая это уравнение можно найти толщину двойного электрического слоя:

$$\sigma = \sqrt{RT\epsilon/2F^2C} = \sqrt{RT\epsilon_{отн} \cdot \epsilon_0/2F^2C}$$

Когда в растворе присутствуют разные ионы с концентрацией C_i и валентностью Z_i используют более общую формулу:

$$\sigma = \sqrt{RT\epsilon/F^2 \sum Z_j^2 C_j} \quad (\text{в нм})$$

На частицы в поле действует **пондермоторная сила**:

$$\vec{F} = (\epsilon_A - \epsilon_B) \vec{E}_A \cdot V \cdot \nabla \vec{E}_B, \text{ где}$$

ϵ_A, ϵ_B — диэлектрическая проницаемость дисперсионной фазы и среды соответственно,

\vec{E}_A, \vec{E}_B — напряженность поля внутри и вне частицы соответственно,

V — объём частицы.

Под действием таких полей все поляризованные боковые цепи макромолекул ориентируются в направлении электрических силовых линий и это может приводить к разрыву водородных и других связей и может вызвать денатурацию и коагуляцию белка.

$$K = \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}.$$

Тогда изменение свободной энергии:

$$\Delta G = -RT \ln K/\alpha = -RT \ln K + RT \ln \alpha, \text{ где}$$

$$\alpha = \frac{C_C \cdot C_D}{C_A \cdot C_B}, \text{ где}$$

C_A, C_B, C_C, C_D - исходные концентрации, участвующих в реакции веществ А, В, С, Д.

Чем больше соотношение K/α , тем больше получается ΔG ; при $\alpha = K, \Delta G = 0$. При стандартных условиях $\Delta G^0 = -RT \ln K$ (Дж/моль).

Что говорит ΔG о химической реакции, которую характеризует?

1. В организме (даже в присутствии ферментов) реакция может идти до тех пор, пока уменьшается свободная энергия.
2. Энергия G процесса – мера отличия исходной системы от равновесия. Другими словами, G реакции – это то изменение энергии Гиббса (в расчете на 1 моль вещества), которое способствует переходу системы реагентов (А, В, С, Д) в результате реакции от исходных концентраций к равновесным.
3. Критерием самопроизвольного протекания реакции является $\Delta G < 0$. Но есть реакции, для которых $\Delta G \sim 0$ (квазиравновесие) и $\Delta G > 0$.

Итак, классическая термодинамика в состоянии описать химические процессы, протекающие с уменьшением G или $\Delta G \sim 0$. Другими словами, реакции, для которых характерен переход от неравновесных концентраций к равновесию, или, протекающих вблизи равновесия.

Как, за счет чего протекают реакции с $\Delta G > 0$ рассмотрим ниже.

Рассмотрим слагаемое 2 ($RT \ln C_2/C_1$).

Пусть имеется некоторая биологическая мембрана (полупроницаемая). Обычно мембрана хорошо проницаема для K^+ , иногда для Cl^- . В результате на мембране устанавливается равновесный (нернстовский) потенциал φ_m , определяемый как разность

$$\varphi_m = \varphi_2 - \varphi_1 = RT/ZF \cdot \ln C_1/C_2, \text{ где}$$

$C_1(\varphi_1)$ и $C_2(\varphi_2)$ – концентрации K^+ снаружи и внутри клетки соответственно. При 310 К (37°C) получаем приблизительно $\varphi_m = 60 \cdot \lg(C_1/C_2)$ мВ. Назовем его безразмерным потенциалом:

$$\Psi_m = \varphi_m ZF / RT = \varphi_m Ze/kT.$$

Теперь уравнение Нернста перепишем:

$$\Psi_m = \psi_2 - \psi_1 = \ln C_1/C_2.$$

Любой самопроизвольный процесс в изолированной системе приводит к уменьшению свободной энергии, если процесс необратим. Если же процесс обратим, то свободная энергия системы не изменяется. Свободная энергия системы может увеличиваться за счет поступления энергии извне. Если бы свободная энергия только уменьшалась, система пришла бы в состояние равновесия и не смогла бы совершать работу.

Таким образом мы приходим к 3 проблемам:

1. Каким образом систему, в которой произошел самопроизвольный процесс и $\Delta G \sim 0$, вернуть в исходное состояние, т.е. сделать работоспособной?
2. Каким образом могут протекать химические реакции, для которых $\Delta G > 0$?
3. Каким образом энергия химических связей может быть преобразована в осмотические, концентрационные и электрические градиенты?

Решение этих проблем помогает механизм сопряжения. Фактором сопряжения в живой клетке является молекула АТФ.