



Болдырев А.А., Кяйвяряйнен Е.И., Илюха В.А.

## **БИОМЕМБРАНОЛОГИЯ**

*Учебное пособие  
для студентов высших учебных заведений,  
специализирующихся в области биологии, медицины и психологии*

Петрозаводск  
2006

УДК 571.1

**Болдырев А.А., Кяйвярйнен Е.И., Илюха В.А.** Биомембранология: Учебное пособие.– Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006.– 226 с., 78 рис., 12 табл.

Учебное пособие «Биомембранология» описывает основные закономерности строения и функционирования клеточных мембран. Книга написана на основании анализа современных достижений клеточной биологии, нейрохимии и иммунологии, во многом отражает экспериментальный опыт самих авторов, много лет работающих в этой области естествознания. Книга подводит итог чтения курса по этой специальности в МГУ им. М.В. Ломоносова, Петрозаводском и Тюменском государственных университетах, а также в Университете штата Нью-Йорк (США). Рекомендуются для студентов и аспирантов естественно-научных вузов и институтов, специализирующихся в области биохимии, органической химии, биотехнологии, физиологии и психологии, а также для специалистов, изучающих широкий круг биологических явлений.

#### **Рецензенты**

**Член.-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор З.А. СУСЛИНА**  
**Доктор биол. наук, профессор Н.Н. НЕМОВА**

**Научный редактор – профессор С.А. ЧЕПУРНОВ**

*Издание осуществлено при финансовой поддержке Программы  
Президиума РАН «Поддержка молодых ученых» (ЭБ НОЦ ИБ КарНЦ  
РАН) и грантов Президента РФ «Ведущие научные школы»  
НШ.894.2003.4 и НШ.1760.2003.4*

ISBN 5-9274-206-2

© А.А. Болдырев, Е.И. Кяйвярйнен, В.А. Илюха, 2006  
© Институт биологии КарНЦ РАН, 2006

## К ЧИТАТЕЛЮ

Когда Эрла Сазерлэнда, первого Нобелевского лауреата в области механизмов клеточной сигнализации, спросили, что больше всего помешало его открытию механизмов передачи сигнала через клеточную мембрану, он ответил:

– Незнание того, как она устроена.

Сегодня для клеточного биолога (нейрохимика, физиолога, биотехнолога, психолога) – незнание законов, по которым функционирует клетка, незнание того, как устроена клеточная мембрана, – нонсенс, несовместимый с выбором перспектив современных исследований в области биологии клетки.

Вот почему мы надеемся, что при всей ограниченности объема этой книги, недостаточной глубине, несовершенстве изложения материала, эта книга найдет своего читателя, как нашел своего слушателя курс «Биомембранология», читаемый в ведущих вузах нашей страны, что, кстати, отличает нашу отечественную систему естественно-научного образования от стран Болонской системы, где этот курс подменяется отрывочными сведениями, излагаемыми «по ходу дела» в лекциях по биохимии, физиологии, биотехнологии или биологии клетки.

Старый спор между преподавателями, что важнее для студента – систематичность и глубина знаний или открытие широких перспектив в их накоплении, мы отважно и безоговорочно решаем в пользу второго фактора: чтобы пытаться найти свое место в науке, надо видеть горизонты ее развития. А когда Вы найдете это место – углубление научных знаний будет Вашей собственной профессией. Мы от души надеемся, что какое бы направление науки Вы не избрали, биомембранология будет одной из основ Вашего естественнонаучного мировоззрения.

*Авторы*

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Основные сокращения, принятые в тексте, соответствуют рекомендациям комиссии по биохимической номенклатуре IUPAC.

Другие используемые сокращения приведены ниже:

АФК – активные формы кислорода  
АЦ – аденилатциклаза  
ДАГ – диацилглицерол  
ДЦКД – дициклогексилкарбодиимида  
ДЭС – диэтилстильбестрол  
ИФ<sub>3</sub> – инозитол-1,4,5-трисфосфат  
ККМ – критическая концентрация мицеллообразования  
ЛНП – липопротеины низкой плотности  
ЛОНП – липопротеины очень низкой плотности  
ЛПП – липопротеины промежуточной плотности  
МДА – малоновый диальдегид  
мХР – мускариновый холинергический рецептор  
ПК – протеинкиназа  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
СМ – сфингомиелин  
СОД – супероксиддисмутаза  
СР – саркоплазматический ретикулум  
ТК – тирозинкиназа  
ФДЭ – фосфодиэстераза  
ФИФ<sub>2</sub> – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат  
ФРК – фактор роста клеток  
ФРЭ – фактор роста эпидермиса  
ФХ – фосфатидилхолин  
ФЭ – фосфатидилэтаноламин  
ФС – фосфатидилсерин  
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс  
ЭР – эндоплазматического ретикулум  
ЯМР – ядерный магнитный резонанс  
GPCR – рецепторы, связанные с G-белками  
NANA – N-ацетилнейраминовая кислота  
РРаза – пирофосфатаза

Мембраны играют ключевую роль в структурной организации всех клеток – прокариотических и эукариотических, растительных и животных.

По мере развития биологии определяющая роль мембран в жизни клетки становится все более очевидной. В силу особенностей своего строения мембраны во многом определяют особенности функционирования клеток.

## **1. ЭВОЛЮЦИЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О СТРОЕНИИ МЕМБРАН**

Наличие мембран вокруг живых клеток было установлено более ста лет назад в работах К. Негели, который в 1855 году обнаружил, что неповрежденные клетки могут изменять свой объем при изменении осмотического давления окружающей среды. Эти исследования были продолжены Е. Овертоном, показавшим, что неполярные молекулы легче проходят через клеточную мембрану, чем полярные соединения. На основе этих наблюдений он впервые высказал предположение, что клеточная мембрана имеет липидную природу. Развитие идей о структуре мембран существенно продвинулось благодаря работам Е.Гортера и Ф.Грендела, проведенным в 1925 г. Эти авторы впервые выдвинули концепцию липидного бислоя. Эта идея возникла на основе простого эксперимента. Липиды эритроцитов экстрагировали ацетоном и затем получали из них тонкую пленку на поверхности воды. С помощью поплавка сжимали слой липидных молекул на границе раздела вода/воздух до тех пор, пока этот слой не начинал оказывать сопротивление дальнейшему сжатию; это явление было объяснено образованием плотно упакованной мономолекулярной липидной пленки. Измерение площади, занимаемой липидами, и сравнение ее с площадью поверхности эритроцитов, из которых эти липиды были экстрагированы, дали соотношение 2:1. Отсюда был сделан вывод, что мембрана эритроцитов состоит из липидных молекул, расположенных в два слоя. По-видимому, этот вывод Е. Гортера и Ф. Грендела оказался правильным только благодаря взаимной компенсации ошибок (во-первых, экстракция ацетоном извлекает

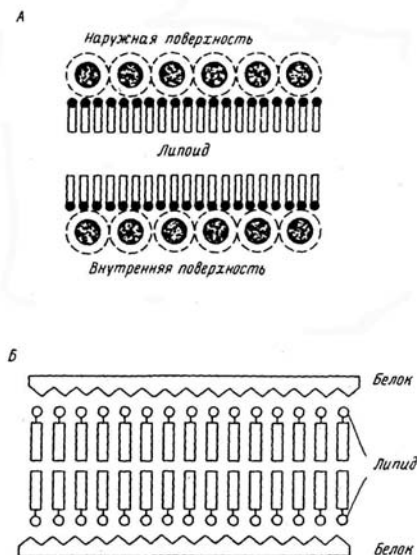


Рис. 1. Модель строения биологических мембран Даниели-Девсона

не все липиды, во-вторых, они дали заниженную оценку площади поверхности эритроцитов, используя для ее определения высушенные клетки). Однако в историческом плане эта работа имела большое значение, поскольку концепция липидного бислоя как структурной основы биологических мембран на самом деле оказалась верной.

Мысль о том, что с мембранами связаны белки, высказана десятью годами позже Дж. Даниелли в связи с необходимостью объяснить явное расхождение между поверхностным натяжением на границах раздела масло/вода и мембрана/вода. Была высказана гипотеза, что мембрана состоит из

двойного липидного слоя, и предположено, что белок располагается на ее поверхности — модель Даниели — Дэвсона, или модель «сэндвича» (рис. 1 А, Б). Это была очень удачная модель, и в течение последующих 30 лет многочисленные экспериментальные данные, особенно полученные с помощью дифракции рентгеновских лучей и электронной микроскопии, полностью подтвердили ее адекватность. Основными компонентами биологической мембраны являются липид и белок, вопрос о взаимном расположении этих компонентов в мембране стал предметом многочисленных дискуссий, так как обнаружилось, что мембраны выполняют разнообразные функции.

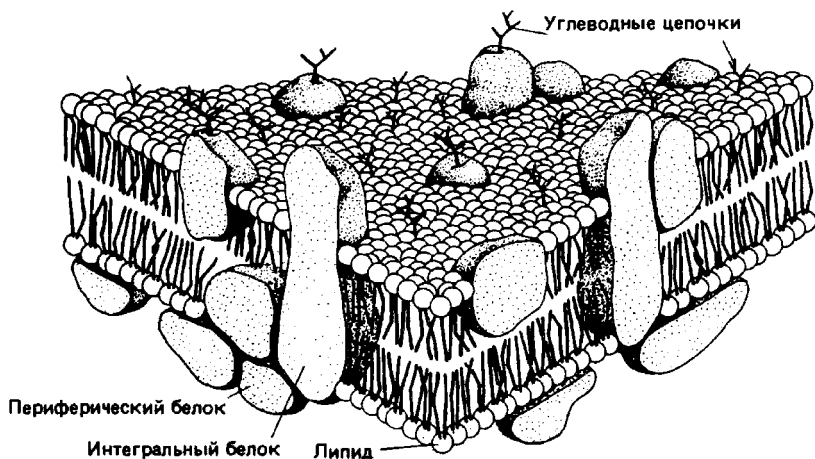


Рис. 2. Жидкостно-мозаичная модель строения биологических мембран

Быстрый прогресс в мембранологии, в результате которого сформировались современные представления, был достигнут в значительной мере благодаря успехам в изучении свойств мембранных белков. Электронно-микроскопические исследования с применением метода замораживания-скалывания показали, что в мембраны встроены глобулярные частицы. Тем временем биохимикам с помощью детергентов удалось «раздробить» мембраны до состояния функционально активных «частиц». Данные спектральных исследований указывали, что для мембранных белков характерно высокое содержание  $\alpha$ -спиралей и что они, вероятно, образуют глобулы, а не распределены в виде монослоя на поверхности липидного бислоя. Неполарные свойства мембранных белков наводили на мысль о наличии гидрофобных контактов между белками и внутренней неполярной областью липидного бислоя. С. Сингер и Дж. Никольсон свели воедино все эти идеи, создав жидкостно-мозаичную модель. В рамках этой модели мембрана представляется как фосфолипидный бислой, в который погружены свободно диффундирующие белки (рис. 2).

Прежняя модель Даниели – Дэвсона была статичной и успешно объясняла имевшиеся в то время структурные данные, полученные с довольно низким разрешением. Начиная с 70-х гг. XX в. большое внимание стало уделяться изучению динамических свойств мембран и их взаимосвязи с мембранными функциями. В последние годы жидкостно-мозаичная модель (рис.2) также подверглась модификации, и этот процесс будет продолжаться в соответствии совершенствованием наших знаний. Выявляются новые функции цитоскелета. Становится ясно, что не все мембранные белки свободно диффундируют в жидком липидном бислое. Имеются данные о существовании в мембране липидных доменов. Обнаружены динамические ассоциаты липидов, обладающие более плотной упаковкой (рафты). Выявлен специфический класс амфифильных белков, которые под влиянием внеклеточных сигналов меняют свою гидрофобность и обратимо диссоциируют от мембраны. Таким образом, клеточная мембрана все более отличается по своим свойствам от «классического» липидного бислоя. Тем не менее, жидкостно-мозаичная модель в ее разных модификациях все еще служит в качестве концептуальной основы для объяснения многих мембранных феноменов. Сложность создания единой модели биологических мембран связана с огромным разнообразием мембранных функций.



## 2. КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ

Успехи в исследовании мембран во многом достигнуты благодаря сравнительному изучению мембран из множества разнообразных организмов. Данные, полученные при изучении клеток млекопитающих методом электронной микроскопии, свидетельствуют о наличии развитой сети внутриклеточных мембранных образований (рис. 3). Не вызывает сомнений, что основные принципы структурной организации всех мембран животной клетки по сути одинаковы. Более того, эти принципы распространяются и на мембраны растительных и бактериальных клеток.

Любая клетка имеет наружную мембрану – ее называют плазматической. Она играет роль преграды, отделяющей живое содержимое от ее неживого окружения. Но плазматическая мембрана – не просто оболочка. Она регулирует поступление молекул и ионов в клетку и выход их наружу. Кроме того, в ней находятся различные ферменты, природа которых зависит от особенностей данной клетки. Она содержит специализированные компоненты, участвующие в межклеточных контактах и взаимодействиях, в гормональном ответе и системах транспорта через мембрану как малых, так и больших молекул. Плазматическая мембрана чрезвычайно эластична, благодаря чему животные клетки могут довольно сильно изменять форму без разрыва мембран.

Большинство растительных клеток в отличие от животных не способны изменять свою форму, так как их мембраны окружены толстой, прочной и мало упругой оболочкой. Ее называют клеточной стенкой. Стенки имеются также у бактерий. Бактериальные клетки имеют довольно простую наружную оболочку, содержащую один или два слоя.

Внутри клетки мембраны могут образовывать субклеточные частицы (органеллы) различного назначения. Заметим, что внешний вид органелл неодинаков в клетках разного типа.

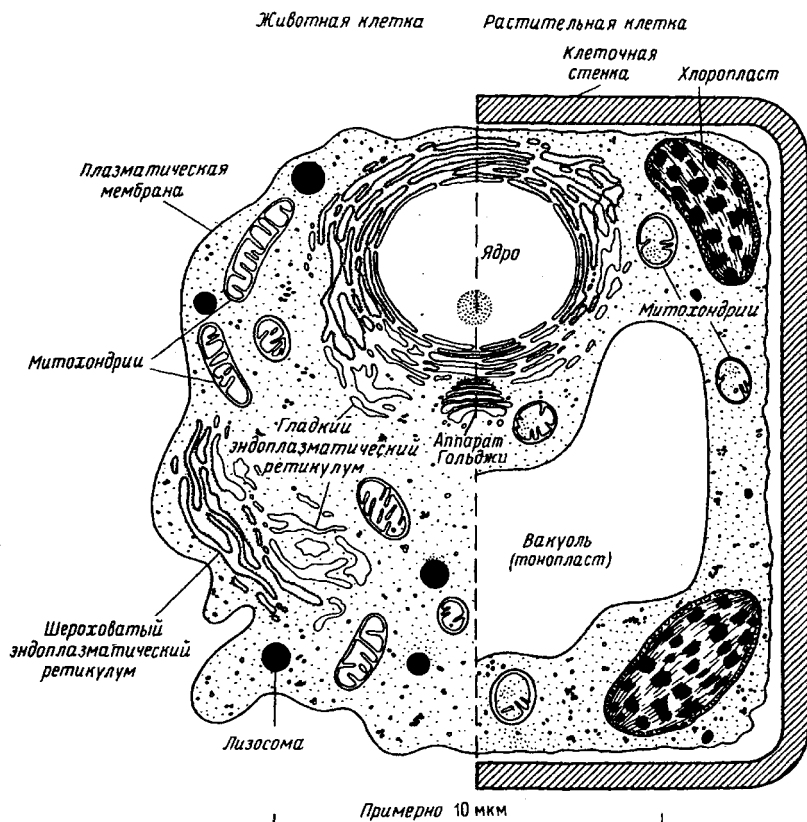


Рис. 3. Схематическое изображение оргanelл эукариотических клеток животных и растений на основании данных электронной микроскопии

К ним относятся, например, митохондрии - своеобразные энергетические станции клетки, специализированные на образовании АТФ. В этих оргanelлах осуществляются окислительные превращения субстратов, завершающиеся образованием АТФ. В одной клетке может содержаться от нескольких десятков до нескольких тысяч митохондрий. Они сильно отличаются по размерам и очертанию. Чаще всего митохондрии имеют вид нитей или гранул (по-

гречески митос-нить, а хондрион – гранула). Иногда они набухают, приобретая форму дубинки. Независимо от размера и формы каждая митохондрия содержит две мембраны – наружную и внутреннюю. Внутренняя мембрана образует складки в виде перегородок, называемых кристами, и содержит ферменты, участвующие в транспорте электронов и синтезе АТФ. Пространство, ограниченное этой мембраной, носит название матрикса, в нем протекают многие метаболические процессы. Межмембранное пространство также содержит специфические компоненты, отличающие его по составу от цитоплазмы.

Другие субклеточные органеллы – лизосомы – представляют собой окруженные мембранами органеллы, содержащие набор протеолитических и других деградиционных ферментов, которые расщепляют белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и другие соединения. Вещества, захваченные клеткой путем эндо- или фагоцитоза, которые необходимо расщепить, доставляются в лизосомы с помощью везикул - фагосом. В лизосомах происходит также расщепление компонентов клетки, осуществляющееся в ходе клеточного цикла. Содержащиеся в лизосомах ферменты способны разрушать не только чужие вещества, но и саму клетку. Если происходит гибель клетки, мембраны лизосом разрываются и запускаются процессы автолиза. В обычных условиях лизосомальная мембрана надежно защищает клетку от воздействия собственных смертоносных ферментов.

Фагосомы – это короткоживущие внутриклеточные везикулы, образованные в результате фагоцитоза – процесса поглощения, захвата крупных частиц, комплексов, вплоть до целых клеток, например, клеток бактерий. Этот процесс характерен только для клеток некоторых типов (амебы, макрофаги). После транспорта фагосомы внутрь клетки она сливается с лизосомой, содержащей ферменты деградации.

Пероксисомы – это органеллы, которые содержат окислительные ферменты, участвующие в деградации малых молекул, таких как аминокислоты, ксантин, жирные кислоты. Их название связано с присутствием в них каталазы, которая разлагает перекиси, образующиеся в качестве продуктов окисления.

Иной вид внутриклеточных мембран образует так называемую эндоплазматическую сеть – глубокие складки, непосредственно примыкающие к плазматической мембране. Это сложная сеть цистерн и трубочек, которая занимает значительную часть внутреннего объема клетки. На мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭР) расположены рибосомы. Он служит местом биосинтеза белков, которые затем транспортируются к месту их функционирования. У бактерий, которые не имеют эндоплазматической сети, синтез белка, по-видимому, осуществляется на особых выступах плазматической мембраны. Области ЭР, не содержащие рибосом, называют гладким ЭР. Здесь осуществляется биосинтез стеролов, происходит десатурация (образование двойных связей) жирных кислот. Мембраны эндоплазматической сети выполняют и другую важную функцию – они обезвреживают вещества, присутствие которых нарушает нормальную работу клетки. Этот процесс называется детоксикацией. Эти процессы входят в согласованную систему транспорта электронов, осуществляющегося при участии цитохромов  $b_5$  и  $P_{450}$ . Эндоплазматическая сеть клетки не однородна, а состоит из мембран, различающихся по составу и выполняемым функциям, но объединяемых в единую систему взаимодействующих друг с другом процессов.

К мембранам эндоплазматической сети примыкает так называемый аппарат Гольджи, также состоящий из ограниченных мембранами пузырьков и цистерн, собранных в стопки. Аппарат Гольджи выполняет в клетке узко специализированные, но весьма существенные задачи. Было замечено, что белки, синтезированные рибосомами, через несколько минут начинают перемещаться к аппарату Гольджи. С помощью электронного микроскопа удалось установить, что белки в аппарате Гольджи плотно упакованы в гранулы: такая упаковка белков происходит перед их секрецией. В аппарате Гольджи происходит также созревание сложных белков – например, посттрансляционная модификация гликопротеинов, синтезированных в ЭР и предназначенных для секреции, включения в плазматическую мембрану или доставки в лизосомы. Аппарат Гольджи содержит гликозидазы и гликозилтрансферазы, которые

вступают в действие последовательно, по мере того как белок, подвергаемый процессингу, перемещается (вероятно, с помощью мембранных везикул) от начала аппарата Гольджи (цис-область) до его конца (транс-область). Таким образом, простые белки превращаются в сложные – гликопротеины. Прикрепление к белкам углеводных радикалов, по-видимому, облегчает их прохождение через клеточные мембраны. В некоторых клетках аппарат Гольджи формирует также лизосомы и другие субклеточные частицы. Таким образом, деятельность аппарата Гольджи связана как с построением клеточных элементов, так и с их разрушением. Соблюдение баланса между этими противоположно направленными процессами исключительно важно для жизнедеятельности клетки.

Оболочка, окружающая клеточное ядро, состоит из двух мембран, наружной и внутренней, разделенных промежутком, называемым перинуклеарным пространством. Эта мембрана происходит из эндоплазматического ретикулума и неразрывно связана с ним. Ядерная мембрана защищает святое святых клетки – хранилище ее генетической информации – от вредных внешних воздействий. Наиболее характерными морфологическими признаками ядерной мембраны являются порообразные структуры. Они имеют диаметр около 600 Å. В том месте, где расположены эти структуры, внутренняя и наружная ядерные мембраны соединяются. По краям пор наружная и внутренняя мембрана ядра сливаются в одну общую мембрану. Полагают, что поры позволяют комплексам мРНК-белок переходить из ядра в цитоплазму, а регуляторным белкам перемещаться в обратном направлении, из цитоплазмы в ядро. Таким образом, ядерная мембрана контролирует перенос информации между ядром и остальной частью клетки. Есть также сведения, что мембрана обеспечивает энергией процессы, протекающие внутри ядра.

Хлоропласты – это органеллы, содержащие фотосинтетический аппарат. Они характерны для растений и некоторых микроорганизмов. Наружная оболочка хлоропластов образуется двумя мембранами, а внутренняя область составляет строма. В строме находятся тилакоидные мембраны, где локализованы компоненты системы фотосинтеза. На отдельных участках тилакоидные мембраны плот-

но упакованы в стопки, а на других – обращены непосредственно к стро́ме. Состав плотно упакованных и обращенных в стро́му доменов тилакоидной мембраны различен, что указывает на различие их функций.

Все клеточные мембраны представляют удивительные биологические конструкции. Они отличаются исключительной тонкостью, при этом обладают высокой прочностью на разрыв, устойчивостью и гибкостью, а по электроизоляционным свойствам превосходят многие изоляционные материалы, применяемые в технике. Общая площадь мембран в органах и тканях организма достигает огромных размеров. Печень крысы весит всего 6 г, суммарная же площадь ее клеточных мембран составляет несколько сотен квадратных метров. В эндоплазматической сети печени на каждый миллиграмм белка приходится 0,5 м<sup>2</sup> мембран.

### 3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МЕМБРАН

Несмотря на многообразие различных типов клеток, их мембраны выполняют общие биологические функции. Прежде всего они отграничивают живое от неживого. Более того, они организуют внутри клетки компартменты с различными свойствами. С их помощью происходит отделение содержимого компартментов от окружающей их среды. В каждом компартменте мембраны обеспечивают сохранение специфических физико-химических условий. Поэтому по обе стороны мембраны такие условия среды как кислотность, концентрация растворенных веществ, электрический потенциал, как правило, не одинаковы.

Однако мембраны не только разделяют клетку на отдельные компартменты, но и участвуют в регуляции метаболических сигналов, которые передаются между наружной и внутренней сторонами этих компартментов. Это может проявляться в виде физического переноса ионов или молекул через мембрану или при помощи конформационных изменений, индуцируемых в мембранных компонентах. Таким образом, мембраны контролируют проникновение в клетку и выход из нее метаболитов. С помощью мембранных рецепторов они реагируют на внешние сигналы и трансформируют их, то есть способны классифицировать и избирательно модулировать их (усиливать важные и снижать до уровня шумов второстепенные), передавая внутрь клетки существенную информацию. Мембраны способны обеспечивать образование и поддержание разности потенциалов, а также транспортировать мембранный потенциал вдоль по мембранным индукторам, позволяя использовать этот специфический вид энергии в разных частях клетки.

Кроме того, с мембранами связано функционирование многих клеточных ферментов. Мембраны оказывают большое влияние на процессы, протекающие внутри клетки, изменяя их активность. Некоторые ферменты активны только тогда, когда они прикреплены к мембране; другие, наоборот, в этом состоянии не проявляют активности и начинают действовать лишь после отщепления их и выхода в цитоплазму. Поэтому важным свойством мембран является способность создавать специальную среду для защиты гидро-

фобных белков от водной атаки и обеспечения их функций, то есть в мембране создаются специальные условия для протекания реакций, осуществляемых гидрофобными белками. Одновременно мембранные липиды осуществляют контроль за взаимодействием между отдельными белками, погруженными в мембранную толщу. Некоторые ферменты образуют своеобразные мембранные ансамбли, которые осуществляют цепь последовательных превращений именно благодаря тому, что их компоненты объединены общностью локализации, организованы мембраной. Благодаря этому обстоятельству повышается эффективность суммарного процесса. Имеются ферменты, которые, действуя на мембраносвязанные субстраты, участвуют тем самым в биосинтезе мембран.

С участием мембран в той или иной степени осуществляется большинство жизненно важных функций, например, протекают такие разные процессы, как репликация прокариотической ДНК, биосинтез белков и их секреция, биоэнергетические превращения, а также функционирование систем гормонального ответа. Важная сторона ферментативной деятельности мембран связана с координацией множества химических реакций, протекающих в клетке. Для этого мембраны объединяют различные ферменты в единый конвейер, в котором каждый фермент действует в строгом соответствии с остальными.

Мембраны участвуют во взаимодействии клеток со средой. Это свойство лежит в основе обеспечения специфики межклеточных контактов и иммунологических ответов. Клетки узнают себе подобных, вступают с ними в контакт, передают разнообразную информацию. Если измельчить эмбрионы амфибии до состояния свободных клеток и перемешать их, можно наблюдать, что через некоторое время клетки самопроизвольно начинают «сортировать»: родственные клетки объединяются в пласты, дающие начало тканям, и, в конце концов, вновь образуются структуры, напоминающие эмбрион. Эта поразительная способность клеток, несомненно, зависит от свойств наружных клеточных мембран, их способности узнавать себе подобных. Благодаря этому свойству клетки способны создавать ткани, органы и сами организмы.



Большинство мембран, кроме этих общих функций, выполняют и специальные функции. Например, мембраны митохондрий и хлоропластов зеленых растений осуществляют трансформацию энергии. Мембраны, расположенные в стенках кишечника, выполняют функции, связанные с процессами пристеночного пищеварения. Мембраны нервных клеток генерируют электрические импульсы. Некоторые клетки, например, палочки сетчатки глаза, имеют высокоспециализированные мембраны, позволяющие выполнять уникальные функции. Мембраны мышечных клеток участвуют в инициации и регуляции сокращения. Клетки органов чувств содержат специализированные мембраны, преобразующие энергию света и звука в электрические импульсы и передающие центральной нервной системе информацию о запахах, изменениях температуры и давления.

## 4. СОСТАВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

В состав биологических мембран входят представители трех классов веществ, обмен которых составляет основу метаболизма: это белки, жиры (липиды) и углеводы. В весовом отношении белки составляют 40–60%, согласно некоторым данным от 20% до 80%, остальное приходится на долю липидов. Часть углеводов представлена свободными олигосахаридами, а часть входит в состав сложных липидов (гликолипиды) или сложных белков (гликопротеиды). Белковый состав мембран чрезвычайно разнообразен, он в значительной мере определяет свойства мембран и их функциональную активность. Мембранные белки, как правило, почти не отличаются от растворимых по количеству входящих в них гидрофобных аминокислот. Однако эти гидрофобные аминокислоты сгруппированы в мембранных белках в ряд доменов так, что гидрофильных групп пептидной цепи недостает для их маскировки. Такие белки не активны вне гидрофобного окружения. Мембраны предоставляют им возможность стабилизировать свою структуру и нормально функционировать.

### 4.1. МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ

#### 4.1.1. ФОСФОЛИПИДЫ, ГЛИКОЛИПИДЫ, СТЕРОИДЫ

Липиды клеточных структур эукариотических клеток представлены 3 основными группами: фосфолипиды, гликолипиды и стероиды. Распространение и свойства фосфолипидов изучены наиболее детально.

**Фосфолипиды** подразделяются на 2 группы: *глицерофосфолипиды* (производные фосфатидной кислоты – фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит) и *сфингофосфолипиды* (производные церамида, сфингомиелины).

Глицерофосфолипиды представляют собой производные фосфатидной кислоты, к гидроксилу фосфорной кислоты которой сложноэфирной связью присоединен радикал X (рис. 4., табл. 1), где R1 и R2 – ацильные остатки жирных кислот, содержащих от 12 до 18 атомов углерода (как правило, четное количество).

В названия фосфолипидов, потерявших одну из двух ацильных цепей, вводится приставка «лизо». Лизофосфолипиды обнаруживаются в мембранах в небольших количествах – появление этих веществ приводит к нарушению структуры бислоя и лизису клеток.

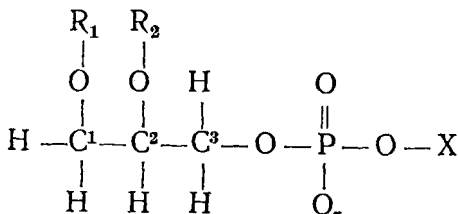


Рис. 4. Схематическое строение молекул фосфолипидов

Таблица 1. Классификация фосфолипидов осуществляется по структуре полярных радикалов

Радикал 1,2-диацилфосфатидной кислоты, X	Фосфолипид
$-\text{OH}$	фосфатидная кислота
$-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	фосфатидилхолин (лецитин)
$-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	фосфатидилэтаноламин (кефалин)
$-\text{OCH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{NH}_3^+$	фосфатидилсерин
$-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{NH}_3^+)-\text{COO}^-$	фосфатидилтреонин
$-\text{OCH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2(\text{OH})$	фосфатидилглицерин
$-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_3$	фосфатидилинозитол

Характеристика липидного состава некоторых мембран животных представлена ниже (табл. 2).

Видно, что основными липидами мембран животных клеток являются глицерофосфолипиды: фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. Структура фосфатидилхолина представлена на рис 5.

Наиболее часто встречающиеся фосфолипиды построены по единому плану, их молекулы стерически хорошо соответствуют друг другу. В то же время, огромное разнообразие фосфолипидов обеспечивается различием жирных кислот, которые входят в состав их молекул. Так, есть несколько десятков природных видов фосфатидилхолина, причем диолеилфосфатидилхолин сильно отличается по своим свойствам от дипальмитоилфосфатидилхолина.

Таблица 2. Липидный состав некоторых биологических мембран  
(в % от общего их количества)

Липид	Эритроциты человека	Миелин человека	Митохондрии сердца быка	E. coli
Фосфатидная кислота	1,5	0,5	0,0	0
Фосфатидилхолин	19,0	10,0	39,0	0
Фосфатидилэтаноламин	18,0	20,0	27,0.	66
Фосфатидилглицерол	0,0	0,0	0,0	18
Фосфатидинозит	1,0	1,0	7,0	0
Фосфатидилсерин	8,5	8,5	0,5	0
Кардиолипин	0,0	0,0	22,5	12
Сфингомиелин	17,5	8,5	0,0	0
Гликолипиды	10,0	26,0	0,0	0
Холестерол	25,0	26,0	3,0	0

Существует несколько групп фосфолипидов, отличающихся от приведенных в таблице 1 по своему строению: 1) плазмалогены, 2) диольные фосфолипиды и 3) дифосфатидилглицериды.

В молекуле плазмалогена первый углерод глицерина ( $C_1$ ) вместо ацильной группы присоединяет альдегид (рис. 4). Радикал X в плазмалогенах мышц представлен холином, в плазмалогенах мозга – серином или этаноламином.

Диольные фосфолипиды характеризуются тем, что вместо глицерина в составе их молекул содержатся двухатомные спирты: этиленгликоль или пропандиол; это одноцепочечные липиды. По физико-химическим свойствам, например растворимости, диольные фосфолипиды напоминают лизоформы фосфолипидов. В отношении клеточных мембран они обладают более сильной разрушающей способностью, чем лизолецитин. В малых дозах они не повреждают мембрану, а лишь изменяют ее свойства, например, повышают проницаемость для небольших молекул и ионов. В больших дозах они вызывают гемолиз эритроцитов, снижают рецепцию ацетилхолина, модифицируют иммунные реакции. По-видимому, некоторые клетки используют это свойство – начинают интенсивно синтезировать диольные липиды в период быстрого роста и прекращают их образование, когда клеточный рост замедляется. Возможно, это связано с тем, что в период роста клеток их мембраны должны быть более лабильными. Они присутствуют в виде незначительных примесей в органах и тканях, характеризующихся усиленной активностью (созревание семян, регенерация печени и т.д.).

Биологическое действие диольных фосфолипидов основано на их способности модифицировать структуру мембраны. Любопытно, что существуют организмы, которым не страшны высокие концентрации диольных липидов. Клетки морских звезд, например,

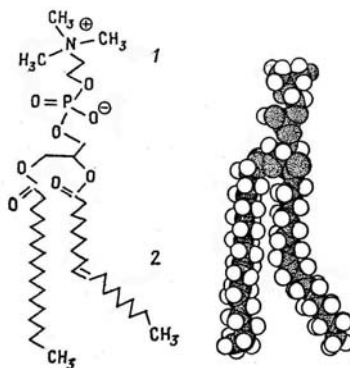


Рис. 5. Строение фосфатидилхолина

А – структурная формула, Б – стереоконфигурация молекулы в пространстве; 1 – полярная голова, 2 – цепи жирных кислот. Жирнокислотный радикал во втором положении представлен *цис*-формой.

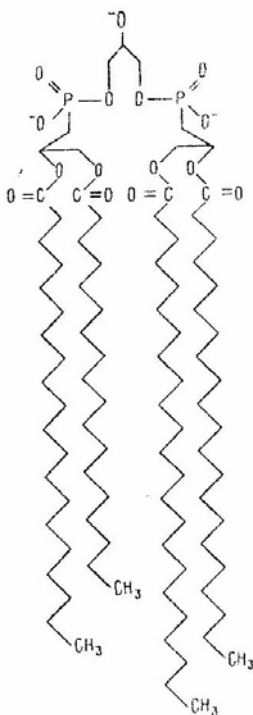


Рис. 6. Структурная формула кардиолипина

могут накапливать очень много диолов без вреда для их собственных мембран, хотя механизм защиты клеточных мембран от этих соединений не известен.

Дифосфатидилглицериды – наиболее широко распространенным представителем этой группы фосфолипидов является кардиолипин – неперенный компонент митохондриальных мембран, выделенный первоначально из сердечной мышцы (рис. 6).

Как упоминалось выше, кроме глицерофосфолипидов в группу фосфолипидов входят и сфинголипиды, которые можно представить как производные церамида (жирнокислотного эфира ненасыщенного аминок спирта сфингозина) и монофосфорных эфиров спиртов. В случае наиболее распространенного сфинголипида – сфингомиелина таким эфиром является фосфорилхолин (рис. 7).

Сфингомиелин содержится в больших количествах в белом веществе мозга, в миелиновых оболочках нервных стволов. Жирные кислоты, входящие в его состав, – длинноцепочечные и содержат мало двойных связей. Обычно это лигноцериновая  $C_{24:0}$  и невроновая  $C_{24:1}$  кислоты. В сером веществе мозга до 70% жирных кислот сфингомиелина представлено стеариновой кислотой  $C_{18:0}$ .

**Гликолипиды** клеточных мембран - гликозильные производные церамида, представлены цереброзидами, сульфатидами и ганглиозидами (рис. 8). В гликолипидах гидрофобная часть представлена церамидом. Гидрофильная группа – углеводный остаток, присоединенный гликозидной связью к гидроксиль-

ной группе у первого углеродного атома церамида (рис. 9). В зависимости от длины и строения углеводной части различают цереброзиды, содержащие моно- или олигосахаридный остаток, и ганглиозиды, к ОН-группе которых присоединен сложный, разветвленный олигосахарид, N-ацетилнейраминную кислоту (рис. 8).

Гликолипиды в большом количестве присутствуют в мембранах миелина. Природной функцией мембранных ганглиозидов является участие в дифференцировке нейрональной ткани, ганглиозиды других клеток - лимфоцитов, определяют видоспецифичность и регулируют межклеточные контакты.

Накапливается все больше фактов, характеризующих роль различных гликолипидов в функции иммунокомпетентной системы организма. При определенных состояниях организма некоторые ганглиозиды могут являться модуляторами иммунного ответа.

**Стероиды** – спирты со стерановым скелетом, к которым относятся как немембранные липиды (из них наиболее важны гормоны), так и компоненты мембран. В перечень мембранных компонентов стероидного ряда входят холестерин, ситостерин, тетрахименин. В тканях животных распространен холестерин.

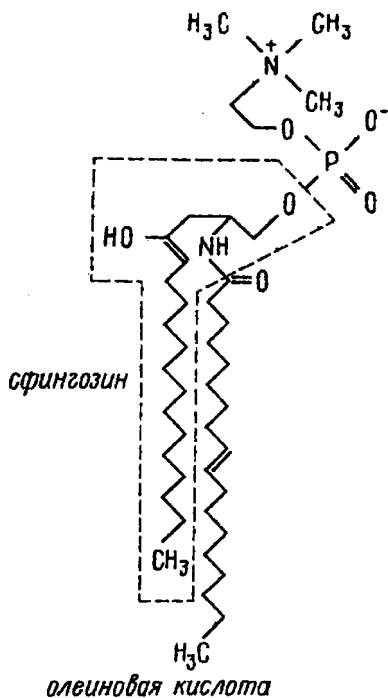


Рис. 7. Структура сфингомиелина (церамидфосфорилхолина)

Пунктиром обведена сфингозиновая группировка.

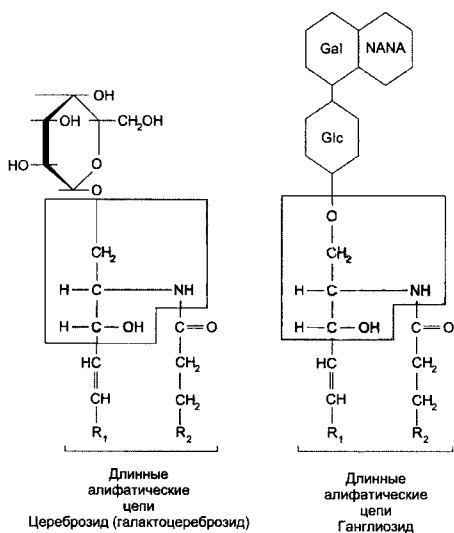


Рис. 8. Гликолипиды –  
цереброзиды и ганглиозиды

Gal – галактоза, Glc – глюкоза, NANA –  
N-ацетилнейраминовая

В растительных клетках холестерин не обнаружен, его заменяют фитостерины. У бактерий стероиды отсутствуют.

Холестерин и его эфиры – непременные составляющие плазматических мембран клеток животных. При этом холестерин легче встраивается в мембрану, чем его эфиры (рис. 10).

Молекула холестерина не содержит длинных прямых цепочек, а состоит из четырех колец; крайнее шестичленное кольцо соединено с полярной гидроксильной группой (OH), а наиболее отдаленное от него пятичленное кольцо – с разветвленной углеводородной цепочкой из восьми

атомов углерода (рис. 10).

Таким образом, молекулы холестерина, как и другие липидные молекулы, имеют полярную голову и вытянутую в длину неполярную часть. Поэтому они хорошо встраиваются в бислойные липидные структуры, образующие клеточные мембраны (рис. 10). При образовании эфиров холестерина (через гидроксильную группу) связь молекулы с бислоем ослабляется, что облегчает его вытеснение из мембраны.

Особенно много холестерина содержится в наружных мембранах. Например, в плазматической мембране клеток печени холестерин составляет около 30% всех мембранных липидов.



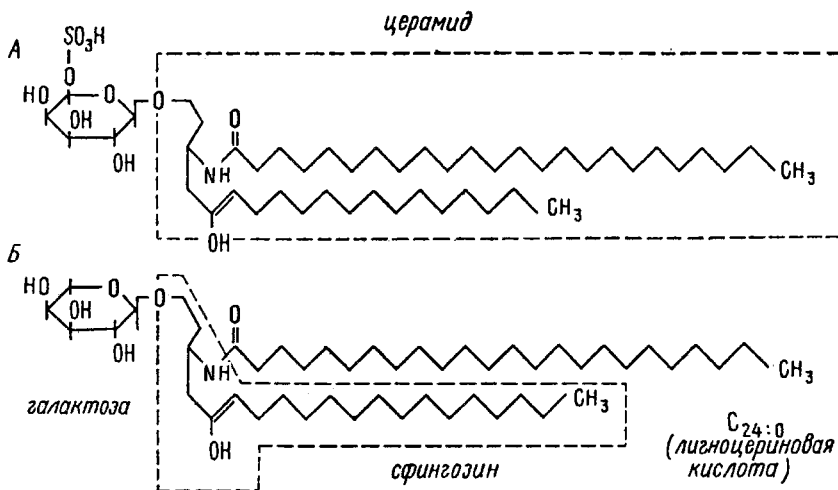


Рис. 9. Структура гликолипидов – цереброзида (А) и цереброзидсульфата (Б)

Пунктиром обведены радикалы сфингозина и церамида.

#### 4.1.2. РОЛЬ ХОЛЕСТЕРИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

Было показано, что холестерин влияет на подвижность жирнокислотных хвостов мембранных липидов. Если мембрана слишком ригидна и существует опасность «застывания» жирнокислотных цепей, холестерин вызывает ее разжижение, поскольку цепи в его присутствии становятся более подвижными. Если же мембрана слишком «жидкая», то холестерин ее уплотняет. Таким образом, холестерин играет роль регулятора, обеспечивающего правильную упаковку липидной части мембраны, необходимую для ее нормальной работы. Для мутантных клеток, которые не могут синтезировать холестерин, необходимо его присутствие в культуральной среде. В его отсутствии мембраны быстро разрушаются.

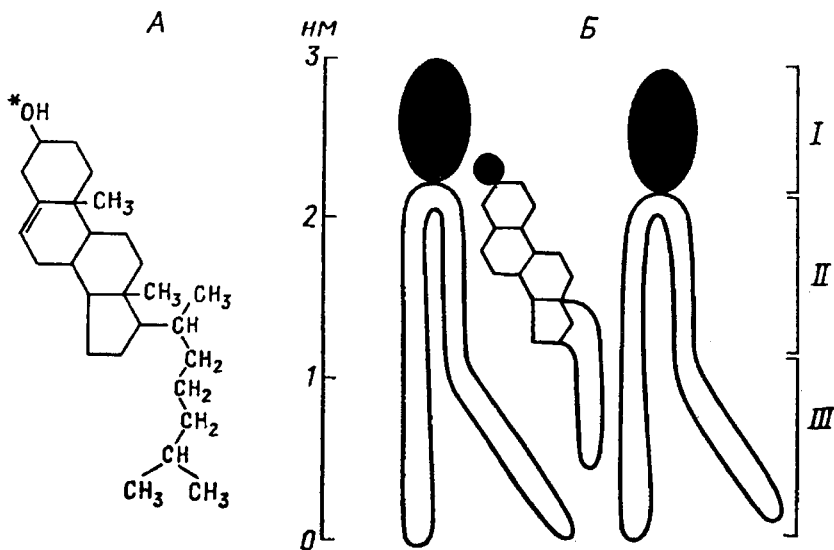


Рис. 10. Структурная формула холестерина (А), и его упаковка в бислое (Б)

Звездочкой отмечен гидроксил, используемый для образования эфиров холестерина. I – область полярных голов; II – область, упорядочиваемая холестерином; III – область более подвижных цепей.

Один из возможных способов взаимной укладки молекул фосфолипида и холестерина показан на рис. 11. Предполагается, что неполярные цепи молекулы лецитина вытянуты, а ее полярная головка изгибается так, что образуется фигура, напоминающая трость. В образующуюся при этом полость помещается молекула холестерина. Некоторые исследователи оспаривают обоснованность этой модели и полагают, что молекулы холестерина плавают в мембране более или менее свободно, или что в мембранах имеются островки, представляющие собой мультимолекулярные комплексы холестерина с липидами.

Какова же природа уплотняющего действия холестерина?

Обычно углеводородные хвосты фосфолипидов располагаются не перпендикулярно к плоскости мембраны, а под некоторым углом. В присутствии холестерина наклон хвостов становится меньше. Каждая молекула лецитина занимает в присутствии холестерина меньшую площадь на поверхности мембраны, в результате чего происходит ее уплотнение.

В организм человека холестерин поступает с пищей и всасывается в кишечнике (300-500 мг/сут). Кроме того, в дополнение к потребляемому с пищей в печени синтезируется 700-1000 мг/сут холестерина. В процессе обмена холестерина

возникает возможность образования ряда важных биохимических соединений: витаминов группы D, половых гормонов, минералокортикоидов (альдостерона), глюкокортикоида кортизола, противовоспалительного фактора кортизона. Обмен холестерина в организме связан с образованием и взаимопревращениями целого ряда биологически активных веществ, в частности, желчных кислот. Распад холестерина приводит к образованию желчных кислот: холевой, таурохолевой, и гликохолевой. Изменение содержания холестерина в органах и тканях может привести к тяжелым заболеваниям. При желчно-каменной болезни в желчном пузыре и печени образуются

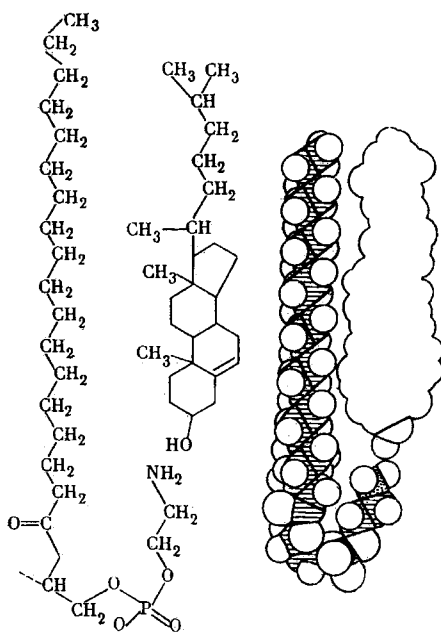


Рис. 11. Один из возможных способов взаимной укладки фосфолипида и холестерина в бислойной липидной мембране

отложения холестерина – камни. При атеросклерозе повышается содержание холестерина в крови. Он аккумулируется на мембранах гладкомышечных стенок сосудов, вызывая сужение их просвета или даже закупорку.

Липидный состав различных мембран у различных животных существенно отличается (рис. 12).

В субклеточных фракциях преобладают ФХ и ФЭ, а в цитоплазматических – холестерин. Наблюдаются также различия индивидуальные (между отдельными особями) и сезонные (связанные со сдвигами в липидном обмене). При сравнении липидного состава мембран разного происхождения следует принимать во внимание лишь выраженные различия.

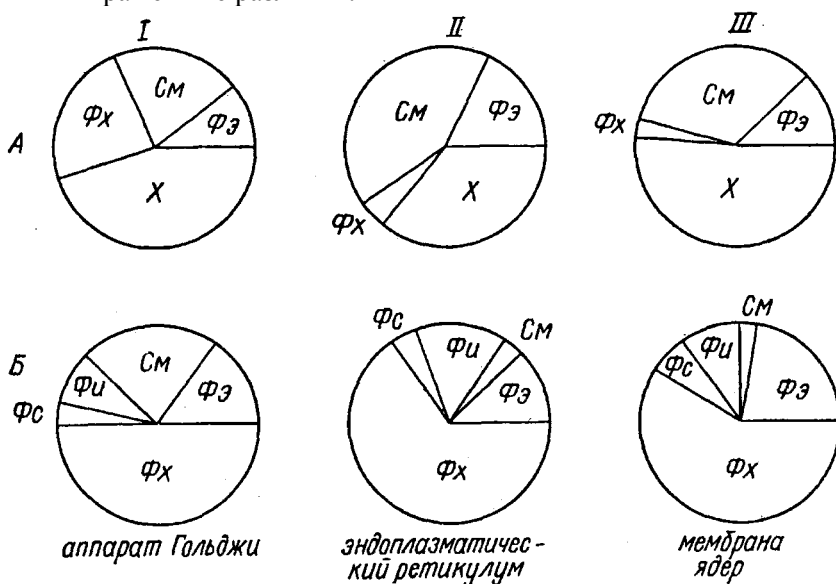


Рис. 12. Липидный состав цитоплазматических (А) и субклеточных (Б) мембран крысы (I), овцы (II) и быка (III)

Ф<sub>х</sub> – фосфатитилхолин, Ф<sub>э</sub> – фосфатидилэтаноламин, Ф<sub>и</sub> – фосфатидилинозит, Ф<sub>с</sub> – фосфатидилсерин, С<sub>м</sub> – сфингомиелин, Х – холестерол.

Помимо того, что липиды являются основным структурным компонентом мембран, они выполняют и другие клеточные функции. Они входят в состав внутриядерных структур, таких как хромосомы, хроматин, ДНК-мембранный комплекс и ядерный матрикс. Они также принимают участие в регуляции репликации, репарации и транскрипции ДНК за счет изменения активности ферментов, принимающих участие в процессах биосинтеза нуклеиновых кислот. Фосфолипиды ядерного матрикса, в основном, состоят из сфингомиелина и фосфатидилхолина. В регенерирующей печени крыс сфингомиелин принимает участие в регуляции синтеза ДНК на ядерном матриксе.

Особенности липидного состава бактерий часто используют для их классификации. Деление их на грам-отрицательные и грам-положительные основано на отсутствии или наличии окраски по Граму генцианфиолетовым в соответствии с наличием или отсутствием в составе клеточной стенки пептидогликанов и тейхоевых кислот. Особенности строения бактериальной оболочки объясняется и тот факт, что на грам-положительные бактерии действует пенициллин, а на грам-отрицательные – стрептомицин.

#### *4.1.3. ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ ПРОСТРАНСТВЕННАЯ КОНФИГУРАЦИЯ*

И фосфо-, и гликолипиды включают в состав молекул различные жирнокислотные радикалы (табл. 3). Холестерин и его аналоги также способны образовывать эфиры с разнообразными жирными кислотами. Вследствие этого свойства образующихся при этом липидов сильно варьируют. При всем разнообразии жирных кислот преобладающими для данной ткани являются обычно две или три из них.

В организме животных кроме пальмитиновой и олеиновой кислот содержатся большие количества стеариновой кислоты, а также и более высокомолекулярные кислоты с числом атомов углерода 20 и более. Как правило, они имеют четное количество атомов углерода; жирные кислоты с нечетным числом атомов встречаются только в составе цереброзидов и ганглиозидов.

Ацильные связи в молекулах природных фосфолипидов, как правило, представлены различными жирными кислотами. Они

различаются как длиной цепи, так и степенью ее ненасыщенности. Если ненасыщенной является лишь одна жирнокислотная цепь, то она присоединена ко второму углеродному атому глицерина. Число двойных связей в молекулах жирных кислот колеблется от 1 до 6 и зависит от среды обитания, состава пищи, сезона и т.д. Двойные связи в жирных кислотах животного происхождения разделены метиленовой группировкой  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ .

В высших растениях присутствуют, в основном, пальмитиновая, олеиновая, и линолевая кислоты (стеариновая почти не обнаруживается), а кислоты с четным числом атомов углерода от 20 до 24 встречаются крайне редко. Жирные кислоты растений часто имеют сопряженные (конъюгированные) связи:  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ .

Таблица 3. Распространенные жирные кислоты в составе мембранных липидов

Соединение	Тривиальное название	Молекулярная масса, Да	Температура плавления, °0
$\text{C}_{12:0}$	лауриловая	200,3	44,2
$\text{C}_{14:0}$	миристиновая	228,4	53,9
$\text{C}_{16:0}$	пальмитиновая	256,4	63,1
$\text{C}_{17:0}$	маргариновая	270,4	61,3
$\text{C}_{18:0}$	стеариновая	284,5	69,6
$\text{C}_{20:0}$	арахиновая	312,5	76,5
$\text{C}_{22:0}$	бегеновая	340,6	81,5
$\text{C}_{24:0}$	лигноцериновая	368,5	86,0
$\text{C}_{16:1(9)}$	пальмитоолеиновая	254,4	-0,5
$\text{C}_{18:1(9c)}$	олеиновая	282,5	13,5
$\text{C}_{18:1(9t)}$	элаидиновая	282,5	44,5
$\text{C}_{18:1(7)}$	вакценовая	282,5	44,0
$\text{C}_{24:1(9)}$	нервоновая	366,6	42,5
$\text{C}_{18:2(9, 12)}$	линолевая	280,5	-5,0
$\text{C}_{18:3(9, 12, 15)}$	линоленовая	278,4	-10,0
$\text{C}_{20:4(5, 8, 11, 14)}$	арахидоновая	304,5	-49,5
$\text{C}_{22:5(7, 10, 13, 16, 19)}$	клубанодоновая	330,5	-45,0
$\text{C}_{22:6(4,7, 10, 13, 16, 19)}$	докозогексаеновая	328,5	-44,1

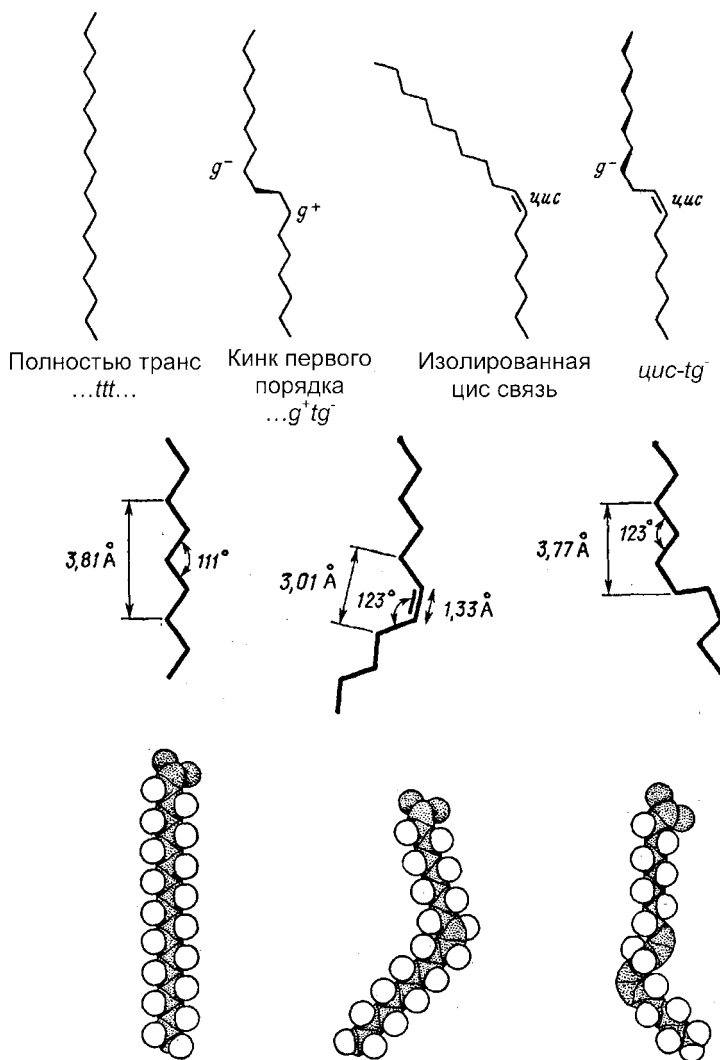


Рис. 13. Пространственная конфигурация жирных кислот

1 – насыщенная углеводородная цепь, 2 – ненасыщенная цепь в *цис*-конформации, 3 – насыщенная цепь в *gg*-конформации.

Углеродные связи в молекулах жирных кислот имеют различную конформацию (рис. 13). По своей структурной конфигурации насыщенные жирные кислоты сильно отличаются от ненасыщенных. Насыщенные жирные кислоты могут принимать множество конфигураций вследствие высокой свободы вращения вокруг одиночных С-С связей. Энергетически наиболее выгодной является *транс*-конфигурация. Ненасыщенные жирные кислоты имеют жесткую структуру, поскольку вращение вокруг двойных связей невозможно. Они существуют либо в *транс*-либо в *цис*-конфигурации. Ненасыщенные жирные кислоты содержат двойные связи почти всегда в *цис*-конформации (Рис. 13), *транс*-ненасыщенные жирные кислоты в природе почти не встречаются. Исключение составляет лишь вакценовая кислота – конформационный антипод олеиновой кислоты. Температура плавления ее 44°C, в то время как олеиновая кислота плавится при температуре 13,5°C.

*Цис*-конфигурация двойной связи обуславливает изгиб цепи под углом приблизительно 30°. По этой причине *цис*-ненасыщенные жирные кислоты с одной двойной связью вызывают локальные возмущения бислоя. При этом длина такой цепи уменьшается, а занимаемый ею объем возрастает (рис. 13). В области локализации двойных *цис*-связей образуются изгибы (так называемая *гош*-форма).

При повышении температуры тепловая подвижность жирнокислотных цепей приводит к спонтанному возникновению изгибов. Если изгибы, соответствующие *гош*-конформации, появляются на близлежащих участках жирнокислотной цепи, эта область может принимать вид петли или полости (кинк). В результате взаимопревращения *транс*- и *гош*-конформаций (так называемого *транс-гош*-перехода) кинки могут «скользить» вдоль цепи, обеспечивая перемещение их содержимого поперек мембраны. Таким образом может осуществляться диффузия захваченной воды через гидрофобный бислой.

При повышении плотности упаковки бислоя конфигурационная подвижность С-С-связей ограничивается. В таком бислое подвижность цепей ограничена согласованными колебаниями



или вращательной подвижностью около точки прикрепления жирнокислотных радикалов к полярной «головке» фосфолипида. В этой ситуации в бислое наиболее предпочтительны две конформации цепи: когда вся цепь находится в *транс*-конфигурации или когда имеется «двойной гош», то есть изгибы, возникающие на двух соседних участках цепи вследствие образования *гош*-конформации, компенсируют друг друга, и вся цепь в целом не имеет изгибов.

У бактерий полиненасыщенные жирные кислоты, как правило, отсутствуют. Для их мембран также характерно более высокое содержание свободных жирных кислот, которые в мембранах растений и животных содержатся в исчезающе малых количествах.

Синтез 16–18-углеродных жирных кислот осуществляется в цитоплазме. Удлинение жирнокислотных цепей осуществляется ферментными системами эндоплазматического ретикулума при участии НАДФН и малонил-КоА. Процесс удлинения может протекать также и в матриксе митохондрий. Образование двойных связей происходит при участии десатураз. У животных превращения олеил-КоА в олеинол-КоА (необходимых для вторичной десатурации) не происходит, вследствие чего линолевая, линоленовая и арахидоновая (полиненасыщенные) кислоты являются для них незаменимыми.

Ввиду высокой скорости обмена мембранных липидов синтез мембранных компонентов постоянно требует большого количества жирных кислот для образования диацилглицеридов. Из них образуются фосфатидная кислота, лежащая в основе обмена фосфолипидов, или галактозилдиглицерид, приводящий к гликолипидам. Жирные кислоты включаются также в обмен сфинганиновых соединений, приводящий к образованию церамида и сфингозина. В обмен стероидов жирные кислоты вступают на последних стадиях, когда становится возможным образование эфиров холестерина и его аналогов.

Жирнокислотный состав мембранных липидов животных, в отличие от бактериальных и растительных организмов, не так своеобразен, но более вариабелен. Разные липиды обладают различным жирнокислотным составом (табл. 4). Специфика этого состава

сохраняется при условии неизменности среды обитания, преимущественного характера питания и т.д.

Таблица 4. Жирнокислотный состав  
фосфолипидов  
эритроцитов человека

Жирная кислота	Фх	Фэ	Фс	См
C <sub>16:0</sub>	34	29	14	28
C <sub>18:0</sub>	13	9	36	7
C <sub>18:1</sub>	22	22	1.5	6
C <sub>18:2</sub>	18	6	7	2
C <sub>20:4</sub>	6	18	21	8
C <sub>24:0</sub>	—	—	—	20
C <sub>24:1</sub>	—	—	—	14

Поскольку все фосфолипиды являются продуктами обмена фосфатидной кислоты, можно заключить, что именно жирнокислотный состав ее молекул будет определять, какой вид фосфолипида образуется из этого предшественника в данных условиях. Но изменение состава диеты, особенно ее липидной части, быстро при-

водит к изменению липидного состава мембранных структур. Смена условий среды обитания, например, при переходе к зимней спячке у животных, при изменении солености у проходных рыб (смолтификация) и т. д., также изменяют жирнокислотный состав мембранных липидов, приспособлявая свойства мембран к условиям среды и новым потребностям организма.

Гипотеза адаптационной роли мембранных липидов была выдвинута и обоснована Е.М. Крепсом. Согласно этой гипотезе при сравнении мембран мозга рыб разных сред обитания наиболее резкие различия в жирнокислотном составе обнаруживают ганглиозиды (гликолипиды). В этой же фракции наиболее быстро обнаруживаются изменения в наборе жирных кислот при смене температур и глубины обитания, а именно: понижение температуры и увеличение глубины синергично повышают содержание полиненасыщенных жирных кислот в составе ганглиозидов. Цереброзиды и сульфатиды (другие гликолипиды) адаптационной изменчивости не проявляют.

## 4.2. ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ

### 4.2.1. ФОСФОЛИПИДЫ КАК СТРУКТУРНАЯ ОСНОВА БИСЛОЯ

Классификация мембранных липидов показывает, что этот класс объединяет соединения, которые построены по единому плану, их стереоконфигурация имеет общие черты. По этой причине, оказавшись в водном растворе, фосфолипиды ведут себя сходным образом: проявляют стремление создать ансамбли из множества молекул липидов.

Тем не менее, липиды плохо растворяются как в полярном растворителе – воде (мешают неполярные хвосты), так и в неполярной среде – масле (мешают полярные головки). Самое энергетически выгодное для них расположение – мономолекулярный слой на поверхности раздела между водой и маслом, в этом случае их хвосты погружены в масло (рис. 14).

Чтобы подчеркнуть различное отношение к воде и к маслу, головки называют гидрофильными, а хвосты – липофильными. Соответственно липиды, молекулы которых содержат как гидрофильную, так и липофильную группировку, называют амфифильными веществами (или амфипатическими).

Рассмотрим поведение липидов в воде. Строение липидных агрегатов в воде может быть чрезвычайно разнообразным. Оно зависит не только от природы самого липида, но и от его концентрации, температуры и присутствия других веществ. Большинство липидов плохо растворимы в воде. Как строение липидных образований зависит от концентрации

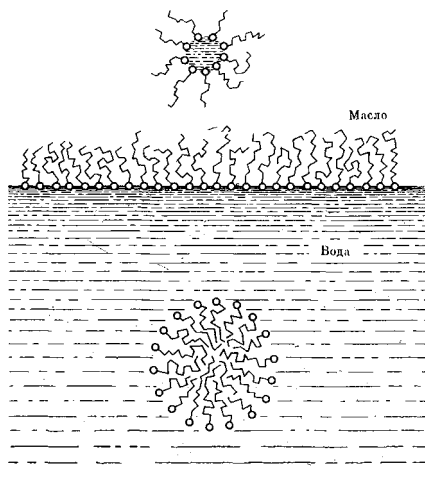


Рис. 14. Мономолекулярный слой липидов на поверхности раздела вода-масло и мицеллы липидов в масле и воде

липидов? Липиды лишь при очень большом разбавлении находятся в воде в виде отдельных, не связанных между собой молекул. Даже при небольшом повышении концентрации липида его молекулы объединяются в замкнутые агрегаты, так называемые мицеллы. Эту концентрацию называют критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). Для большинства мембранных липидов она составляет меньше 1% (рис. 14). При увеличении концентрации липида в воде и при понижении температуры количество таких мицелл растет. В разбавленных водных растворах образуются преимущественно шарообразные мицеллы - микроскопические капельки, у которых полярные головки обращены наружу, а неполярные хвосты обращены внутрь. В масле происходит аналогичный процесс, но тут мицеллы оказываются как бы вывернутыми наизнанку (рис. 14). Если еще более увеличить концентрацию липидов в воде, произойдет дальнейшее изменение структуры липидных ансамблей.

При относительно малом содержании воды фосфолипиды могут образовывать несколько типов жидкокристаллических структур (рис. 15). Среди них имеется ламеллярная (слоистая) структура, состоящая из чередующихся липидных бимолекулярных слоев и водных промежутков, а также цилиндрические структуры из молекул липидов, расположенных в водной фазе. Одна структура может переходить в другую при изменении концентрации воды и температуры. Часто липиды образуют агрегаты различных типов одновременно, причем они могут переходить друг в друга. Такое поведение называют «мезоморфизмом». Если переход одних агрегатов в другие зависит от содержания воды, говорят о «лиотропном мезоморфизме». Когда он осуществляется под влиянием изменения температуры – о «термотропном мезоморфизме». Такие фазовые переходы возможны и в биологических мембранах, они играют большую роль в жизни клеток.

Если концентрация липидов в воде высока, то мицеллы сливаются и образуются плоские бимолекулярные слои (рис. 16), являющиеся аналогами структуры мембранного липидного бислоя.

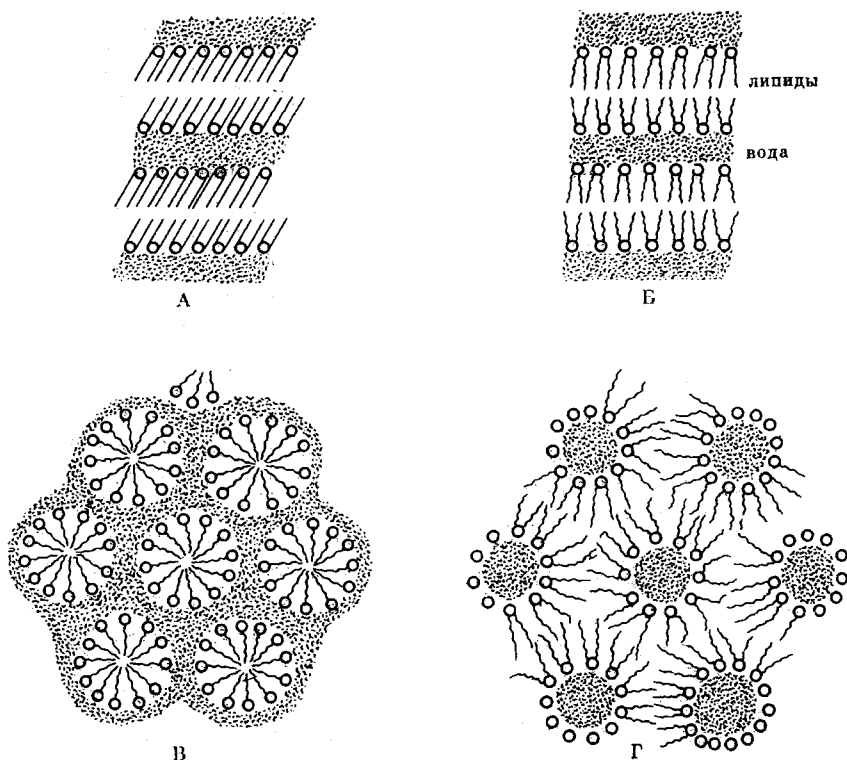


Рис. 15. Структуры липидных агрегатов в воде  
 А – гелеобразная, Б – ламеллярная, В – цилиндрическая (гексагональная) фаза липидов в воде, Г – цилиндры воды в липидной фазе.

Наличие у молекул липидов двух частей – сильно полярной (головки) и неполярной (хвостов) имеет прямое отношение к их способности самопроизвольно образовывать мембраны - происходит так называемая самосборка мембранного бислоя. В бислойных структурах полярные «головы» обращены к воде, а гидрофобные хвосты ориентированы внутрь бислоя. Как искусственные, так и естественные мембраны всегда замкнуты сами на себя, образуя полые вакуоли, пузырьки, везикулы, плоские замкнутые мешки или трубчатые образования.

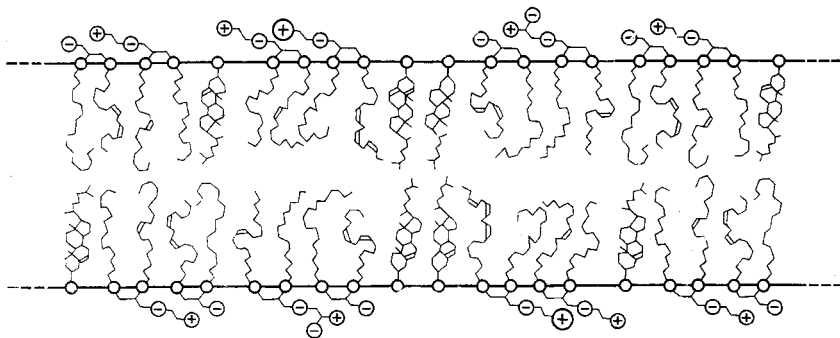


Рис. 16. Сплошной бимолекулярный слой, образующийся в воде при высокой концентрации липида

Природные фосфолипиды – выраженные амфифилы. Величина ККМ для них очень мала. Другими словами, уже при низких концентрациях при комнатной температуре они образуют упорядоченные мицеллы, сливающиеся при повышении концентрации фосфолипидов в однослойные или многослойные агрегаты, которые называют липосомами.

Какие силы заставляют липиды объединяться в агрегаты, состоящие из многих молекул? Бислойная структура стабилизируется гидрофобными взаимодействиями в области ацильных цепей и полярными взаимодействиями на границе раздела водной и липидной фаз. В основе полярных взаимодействий действуют ионные, диполь-дипольные, водородные и вандерваальсовы связи. Все они являются слабыми. Важная роль слабых взаимодействий в стабилизации бислоя объясняется их высокой плотностью. Не менее важна роль и гидрофобных взаимодействий. Так как термодинамически невыгодно неполярным хвостам липидов взаимодействовать с упорядоченной структурой воды (которая стабилизирована водородными связями), липиды стремятся избежать взаимодействия с водой и объединяются в агрегаты. Такое взаимодействие между липидами, вызывающее их «неприязнь» к воде, называют гидрофобным взаимодействием. Гидрофобные силы определяют как «способность аполярных групп к тесному контакту в водных сре-

дах, которое обеспечивает вытеснение воды из образуемых агрегатов».

Мы говорили о поведении липидов в чистой воде. Но жизнь клеток проходит не в дистиллированной воле, а в растворах, содержащих те или иные соли. Поэтому необходимо рассмотреть влияние солей на липидные агрегаты. Липидная мицелла с суммарным отрицательным зарядом будет не безразлична к солевому составу окружающей ее среды. На поверхности раздела между водой и липидом создается разность потенциалов. Если к водной среде добавить поваренную соль (хлористый натрий), то положительно заряженные ионы натрия ( $\text{Na}^+$ ) будут связываться поверхностью мембраны, а отрицательно заряженные ионы хлора ( $\text{Cl}^-$ ) – отталкиваться в водную фазу. Обычно приповерхностную область разделяют на 2 части – ближайшую к поверхности липида, в которой ионы натрия стабилизированы (там концентрация ионов больше, – сольватация) и внешнюю, диффузную часть, в которой ионы передвигаются более свободно.

Как известно, в воде присутствуют в очень малой степени положительные ионы водорода и отрицательно заряженные гидроксильные группы. Ионы водорода притягиваются отрицательно заряженной поверхностью мицеллы, а гидроксильные группы – отталкиваются в водную фазу. Поэтому кислотность среды вблизи поверхности мицелл отличается от кислотности водного раствора. И по своим физическим свойствам вода вблизи поверхности мицеллы заметно отличается от обыкновенной воды, например, она не замерзает при  $0^\circ\text{C}$ .

Таким образом, у поверхности липидов в воде существенно меняются концентрация солей, физические свойства и кислотность среды.

Форма и размеры образуемых липидных ассоциатов зависят от многих факторов:

- 1) от длины ацильных цепей фосфолипидов,
- 2) от жирнокислотного состава фосфолипидов
- 3) от степени ненасыщенности ацильных цепей фосфолипидов,
- 4) от структуры полярной части молекул фосфолипидов.

Рассмотрим перечисленные факторы.

1) Упаковка жирнокислотных цепей в мицеллах зависит от длины углеводородной цепи. При малых значениях  $n$  (до 16) количество молекул, необходимых для формирования мицеллы, таково, что в ее объеме жирнокислотные цепи располагаются достаточно свободно. Структурную стабильность таких мицелл поддерживают полярные связи. При возрастании длины жирнокислотной цепи плотность упаковки в мицеллах увеличивается быстрее, чем их размер, и внутреннее содержимое мицелл становится более компактным благодаря усилению связей между гидрофобными цепями. Гидрофобные взаимодействия зависят от степени контакта между ацильными цепями – эффективность этих взаимодействий обратно пропорциональна подвижности цепей. Один из важных факторов, регулирующих подвижность, – наличие двойных связей в цепи.

2) Подавляющее большинство природных жирных кислот содержит четное количество атомов углерода. Ранее это связывали с удобствами превращения этих соединений в процессе окисления. Затем было показано, что жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода в цепи также подвергаются окислительным превращениям. Но обращает на себя внимание разная стабильность мицелл, образуемых жирными кислотами с четным и нечетным числом атомов углерода. Об этом говорит величина энергии, которую необходимо сообщить структуре для перевода ее из кристаллического в жидкое состояние. Из таблицы 5 видно, что изменение энтальпии для жирных кислот с четным количеством атомов углерода выше, т.е. образуемые ими ассоциаты структурно стабильнее.

3) Углеводородные цепи липидных молекул бывают двух видов: насыщенные и ненасыщенные, причем у ненасыщенных цепей может быть одна или несколько двойных связей. Если пленка состоит из смеси насыщенных и ненасыщенных фосфолипидов, то в месте расположения двойных связей нарушится порядок, так как не будет соблюдаться строго параллельное расположение цепей. Поэтому пленки из смеси липидов, содержащих как насыщенные, так и ненасыщенные цепи при той же температуре являются более



жидкими, чем пленки, построенные из липидов, содержащих только насыщенные цепи.

Это явление имеет огромное значение для нормальной работы биологических мембран в живой клетке. Для того, чтобы клетка могла проявлять процессы жизнедеятельности, липиды, входящие в состав ее мембран, обязательно должны находиться в состоянии «жидкой» пленки. Только в этом состоянии может быть обеспечено правильное функционирование мембранных белков и нормальное прохождение различных веществ через мембрану. Было, например, показано, что при замене ненасыщенных липидов на насыщенные в мембранах бактерий скорость прохождения веществ через мембрану падает в 20 раз.

Таблица 1. Зависимость температуры плавления и энтальпии фазового перехода жирных кислот от длины их углеродной цепи

Число атомов углерода в жирнокислотной цепи	Температура плавления, °C	Изменение энтальпии (H <sup>0</sup> ), ккал/моль
C <sub>13</sub>	-5,4	6,8
C <sub>14</sub>	5,9	10,8
C <sub>15</sub>	10,0	8,3
C <sub>16</sub>	18,2	12,8
C <sub>17</sub>	22,0	9,7
C <sub>18</sub>	28,2	14,8
C <sub>19</sub>	32,0	12,0
C <sub>20</sub>	36,7	16,8

Понятно поэтому, что клетки очень чутко реагируют на изменение температуры, стремясь к тому, чтобы их мембрана постоянно оставалась в «жидком» состоянии. Как только снижается температура окружающей среды, бактерии заменяют насыщенные липиды в своих мембранах на ненасыщенные. Так же ведут себя и клетки растений. Организм человека и теплокровных животных обеспечивает жидкое состояние своих клеточных мембран, поддерживая строго постоянную температуру тела. У некоторых животных это свойство принимает причудливые формы. Например, в ногах пингвина и северного оленя температура падает по мере удаления от корпуса, соответственно мембраны клеток в этих тканях все более обогащаются ненасыщенными жирными кислотами.

4) Способность липидов к самоорганизации (самосборке) зависит, конечно, не только от их углеводородных цепей, но и от природы полярных головок. Головки несут либо отрицательный заряд, либо одновременно отрицательный и положительный заряды, нейтрализующие друг друга. Именно последний тип липидов (нейтральные) преобладает в большинстве клеточных мембран. Это не случайно. Липидам с отрицательно заряженными головками трудно объединяться в агрегаты, так как между головками действуют электростатические силы отталкивания. В случае электронеutralных полярных головок липидные молекулы могут быть упакованы так, чтобы полностью реализовалась выгода гидрофобного взаимодействия неполярных цепей.

В зависимости от размеров полярных областей фосфолипидов возникает асимметрия мембранного бислоя, что является важной особенностью мембран.

#### *4.2.2. ТРАНСМЕМБРАННАЯ АСИММЕТРИЯ ЛИПИДОВ*

Клеточные мембраны замкнуты, они имеют внутреннюю и внешнюю поверхности, различающиеся по липидному и белковому составу – эту особенность мембран называют трансмембранной асимметрией. Характерная особенность биологических мембран – различный состав липидов по обе стороны бислоя. Известно несколько механизмов, обеспечивающих асимметричное распределение фосфолипидов в мембране. Один из них связан с термодинамической вероятностью распределения липидов в соответствии со стереоконfigurацией их молекул. Асимметрия липидов возникает, прежде всего, потому, что в случае замкнутого мембранного бислоя липиды с более объемными полярными «головками» стремятся находиться в наружном монослое, так как там площадь поверхности, приходящаяся на полярную «головку», больше. По этой причине фосфатидилхолины и сфингомиелины локализованы преимущественно в наружном монослое, а фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин, в основном, во внутреннем. Это, соответственно, приводит к различиям в заряде фосфолипидов и различной гидратации их полярных «голов» по обе стороны бислоя.

Второй механизм реализуется за счет различий в составе среды по обе стороны бислоя в условиях нативной клетки. С внеклеточной стороны мембрану омывает среда с высоким содержанием натрия и кальция, а со стороны цитоплазмы мембрана контактирует с магнием и калием. Различия ионного состава вне- и внутриклеточной среды вносят вклад в создание и поддержание изгибов, то есть в асимметрию бислоя. Именно этот фактор обеспечивает создание градиента кривизны, складок, сморщиваний, отшнуровку частей биологической мембраны в виде везикул.

#### *4.2.3. РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ ПОДВИЖНОСТИ КОМПОНЕНТОВ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ*

Молекулам в изотропной жидкости присущи разные виды подвижности: вибрационные колебания, вращение, трансляционные движения. В анизотропном бислое, напротив, молекулярная подвижность его компонент упорядочена. Различные типы подвижности проиллюстрированы на рис. 17.

Молекулы фосфолипидов способны к нескольким видам подвижности в бислое:

- 1) изменение ориентации полярных голов
- 2) латеральное движение,
- 3) колебания ацильных цепей,
- 4) образование кинков и их перемещение вдоль ацильных цепей (в поперечном направлении),
- 5) ротационная подвижность (вращение вокруг длинной оси),
- 6) переход с одной стороны бислоя на другую (по типу флип-флоп),
- 7) выход из бислоя.

Рассмотрим некоторые виды подвижности молекул фосфолипидов подробнее.

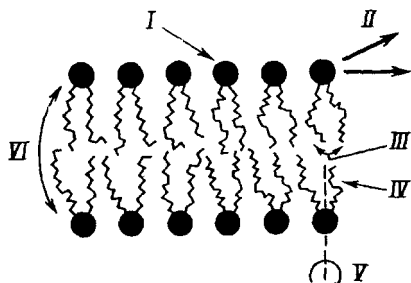


Рис. 17. Виды подвижности липидных компонентов в бислое

I – изменение ориентации полярных голов, II – быстрая латеральная диффузия в двумерном пространстве бислоя, III – быстрые колебания жирнокислотных цепей, IV – образование кинков и их продвижение по ацильным цепям, V – вращательная подвижность вокруг длинной оси, VI – медленный обмен между компонентами монослоев мембраны.

*Латеральное движение.* Способность липидов перемещаться в мембране в латеральном (продольном) направлении показана многими экспериментами. Например, для суспензии яичного лецитина при 25°C молекула преодолевает путь, равный 2,5 мкм за 1 сек. Таким образом, латеральная диффузия в упорядоченной мембране позволяет веществам перемещаться с относительно высокой скоростью. Она делает возможным образование липидных кластеров. Латеральная диффузия оказывается возможной даже при температуре кристаллического состояния. По-видимому, единственный механизм, который мог бы удовлетворительно объяснить этот факт, заключается в латеральной неоднородности мембраны.

наличии дефектных зон (пустот), куда могут вытесняться молекулы из соседних упорядоченных областей.

Упорядоченность мембран, измеряемая с помощью ЭПР спектроскопии, снижается при движении к метильному радикалу ацильной цепи, что свидетельствует об увеличении подвижности жирнокислотных цепей в этом направлении.

Различные конфигурации молекул жирных кислот, возникающие при поворотах (вращениях) вокруг единичной С-С связи, называют ротамерами, или конформерами, а изменение конформации молекулы за счет таких поворотов носит название *транс-гош* изомеризации. Вращательная подвижность мо-

лекул фосфолипидов, измеренная методом ЯМР, показала, что подвижность гидрофобных сегментов цепи повышается в направлении от сложноэфирной связи к метильной группе, т.е. к центру бислоя.

*Трансмембранный переход «флип-флоп» типа.* В липидных искусственных мембранах такие переходы осуществляются весьма медленно, например, полупериод перехода молекул холестерина с одной стороны бислоя на другую в липосомах из фосфатидилхолина занимает более 24 часов, однако, в принципе, такой переход возможен. Молекулы липидов не могут преодолеть липидный бислой в поперечном направлении путем перескока молекул с одной стороны бислоя на другую (флип-флоп), если в молекуле нет особых ферментов, известных под названием транслокаторов. Липиды и в биологических мембранах с довольно большой частотой мигрируют с одной стороны мембраны на другую, то есть совершают «флип-флоп» переходы. Возможно, что гетерогенность липидного состава биологических мембран увеличивает вероятность «флип-флоп» перехода в природных мембранах. Одним из результатов этой гетерогенности является возможность образования гексагональной фазы (вывернутых везикул), кратковременное существование которых позволяет вовлекать молекулы липидов с одной стороны бислоя, а возвращать их на другую.

Следовательно, динамическое состояние бислоя с высокой подвижностью его компонентов определяется одновременно несколькими факторами. С одной стороны, это вращательная подвижность отдельных молекул фосфолипидов. Вблизи метильного конца она осуществляется для каждой молекулы независимо, но с приближением к полярной «голове» и возрастанием плотности упаковки (особенно начиная с 9 углеродного атома, ближе которого к поверхности бислоя не встречается *цис*-двойных связей) подвижность уменьшается.

#### 4.2.4. ДЕФЕКТНЫЕ ЗОНЫ. РОЛЬ ХОЛЕСТЕРИНА

Различные виды подвижности липидных компонентов в бислое нарушают гомогенную упаковку и приводят к образованию различных дефектов. Высокая скорость вращения жирнокислотных радикалов вокруг С-С-связей, а также наличие в мембране в со-

ставе фосфолипидов *цис*-изомеров ненасыщенных жирных кислот делают бислоем достаточно рыхлым. Образование дефектов такого рода демонстрирует рис. 18.

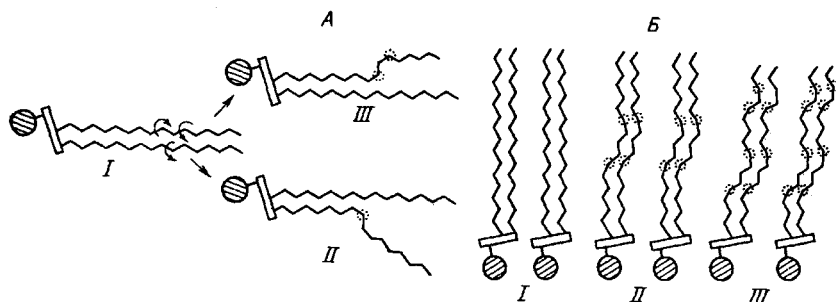


Рис. 18. Образование дефектов в мембранном бислое

А – обе жирнокислотные цепи молекулы фосфолипида находятся в *транс*-конфигурации, вращение вокруг С-С связей, указанное круговыми стрелками, ничем не ограничено (I); в результате несогласованного вращения образуется скошенная (*гош*-) конформация (II) или кинк (III); Б – влияние кинков на упаковку бислоя: I – кинки отсутствуют, II – один кинк на жирнокислотную цепь, III – два кинка на жирнокислотную цепь.

Рассмотрим сначала насыщенные углеводородные цепи. Наиболее стабильна *транс*-конформация (I), в которой цепь максимально вытянута и не меняет своего направления, тогда как в *гош*-конформации ее направление меняется (II) и образуется дефект упаковки. Последовательность *гош-транс-гош* для трех смежных С-С связей приводит к появлению в цепи излома (*кинка*), в результате чего участки цепи выше и ниже цепи излома оказываются значительно смещенными друг относительно друга (III) – образуется дефект. Возможность образования таких структур обеспечивает возникновение подвижных дефектов, способных захватывать целые блоки мембраны – кластеры. Их концентрация и подвижность зависит от температуры.

В случае ненасыщенных жирных кислот почти все двойные связи в мембранных липидах находятся в *цис*-форме. Как и в случае *гош*-формы, это приводит к изменению общего направления цепи – образуется дефект (рис. 19). Такие пространственные де-

фекты бислоя, индуцируемые включением в него ненасыщенных жирных кислот, являются более стабильными. В результате появления дефектов бислоя становится более рыхлым.

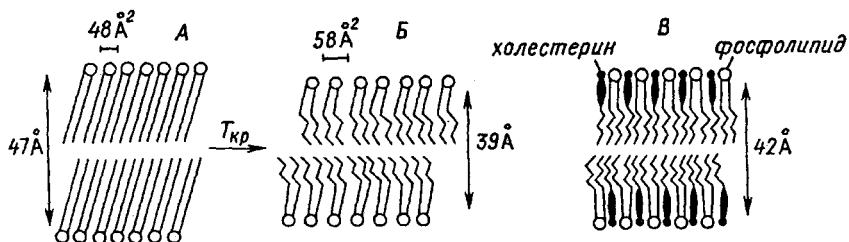


Рис. 19. Изменение упаковки бислоя при термоиндуцированном фазовом переходе (от А к Б) и при встраивании в бислой молекул холестерина (от Б к В)

Указаны толщина бислоя в ангстремах и площадь сечения, занимаемая каждой молекулой фосфолипида.

Рассмотрим вызванное дефектами изменение геометрии бислоя. Растянутая углеводородная цепь жирной кислоты, содержащая 18 углеродных атомов, имеет длину примерно 23–24 Å, что возможно в случае геля, то есть в случае высокоструктурированного (упорядоченного) состояния липидов. По этой причине можно было бы предположить, что бислоем, составленный из фосфолипидов, жирные кислоты которых содержат 18–20 углеродных радикалов, должен иметь толщину более 47 Å. Однако реальная толщина мембраны редко превышает это значение (она составляет на 15–20% меньшую величину). Это указывает, что жирнокислотные радикалы бислоя не распрямлены полностью, а образуют рыхлые структуры. Из-за этого факта площадь мембраны оказывается несколько большей, чем следует из расчета теоретического пространства, приходящегося на одну молекулу фосфолипида. Встраивание холестерина в бислой делает возможным изменение формы мембран в результате значительной деформации обеих сторон липидного бислоя, так как в отличие от фосфолипидов холестерин может легко перемещаться из одного моно слоя в

другой. При таких воздействиях и толщина бислоя несколько возрастает.

Наличие в углеводородных цепях кинков, двойных связей (и других особенностей) приводит к увеличению площади поперечного сечения цепи (минимальное ее значение составляет около  $19 \text{ \AA}^2$ ) при полностью *транс*-конфигурации; это может иметь важные последствия для упаковки липидов в бислое. В жидкокристаллической фазе появление в цепи *гош*-конформеров увеличивает эффективное поперечное сечение цепей по меньшей мере до  $50 \text{ \AA}^2$ . Толщина бислоя уменьшается за счет наличия в цепях *гош*-конформеров, приводящих к разупорядочиванию цепей, причем сами цепи в целом растянуты и расположены перпендикулярно поверхности бислоя.

В фазе геля насыщенные углеводородные цепи фосфолипидов находятся преимущественно в полностью *транс*-конформации. Минимальная площадь поперечного сечения молекулы диацильного фосфолипида равна около  $38 \text{ \AA}^2$ . Примерно такую же площадь занимает полярная головка фосфатидилэтаноламина, поэтому насыщенные фосфатидилэтаноламины в фазе геля упаковываются так, что их ацильные цепи располагаются перпендикулярно плоскости бислоя (как в липидных кристаллах).

На рисунках и схемах цепи фосфолипидов в бислое, как правило, представляют скошенными относительно перпендикулярной оси мембран. Угол наклона цепей определяется природой полярной головы молекулы: наклон возникает в том случае, если объем гидратированной головы молекулы больше площади сечения ее хвостовой части. Например, в случае кристаллов фосфатидилхолина минимальная площадь, приходящаяся на одну полярную головку, составляет примерно  $50 \text{ \AA}^2$ . Поэтому дипальмитоилфосфатидилхолин ( $38 \text{ \AA}^2$ ) в фазе геля не может упаковываться так, как фосфатидилэтаноламин. В этом случае ацильные цепи дипальмитоилфосфатидилхолина отклоняются на  $30^\circ$  от нормали к бислою, благодаря чему их поперечное сечение увеличивается и достигается соответствие размеру полярной головки. При этом углеводородные цепи сохраняют полностью *транс*-конформацию. В случае, когда эти величины равны (например, для фосфатидилэтаноламина), скоса практически не наблюдается.



Наличие перечисленных особенностей обеспечивает определенную рыхлость упаковки (микровязкость) мембранного бислоя при нормальных условиях.

#### *4.2.5. МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАН*

Для мембран характерна высокая степень текучести бислоя, обеспечивающая способность липидов и белков к латеральной диффузии. Повышенная плотность упаковки (структуризация) бислоя увеличивает сопротивление диффузии молекул, транспортируемых через мембрану, повышает ее микровязкость. Так что скорость перемещения молекул зависит от микровязкости мембран, которая, в свою очередь, определяется относительным содержанием насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в составе липидов. Микровязкость мембран меньше, если в составе липидов преобладают ненасыщенные жирные кислоты, и больше при высоком содержании насыщенных жирных кислот. На этот параметр влияют также размеры углеводородных «хвостов» липидов, с увеличением длины которых микровязкость бислоя уменьшается.

#### *4.2.6. ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ*

В водной среде различные структуры (рис. 20), образуемые фосфолипидами (ламеллярные, мицеллярные, гексагональные) ведут себя как жидкие кристаллы, то есть анизотропные жидкости, обладающие признаками упорядоченности.

Таким структурам присущи лиотропный мезоморфизм (зависимость структуры от гидратации) и термотропный мезоморфизм (зависимость структуры от температуры). Представления о лиотропном и термотропном мезоморфизме как свойствах мембран связаны между собой. Фазовые переходы липидов, осуществляющиеся по типу «гель – жидкий кристалл», происходят при температуре ( $T_{кр}$ ), величина которой зависит от содержания воды в системе.  $T_{кр}$  достигает минимума, как только общее содержание

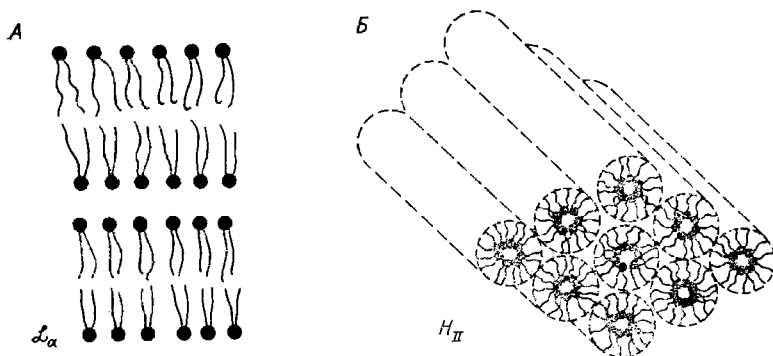


Рис. 20. Структуры, образуемые в водных суспензиях липидами, склонными к созданию ламеллярных образований (А) и небислойных гексагональных образований (Б)

воды превышает то количество, которое могут связывать липидные структуры. Фазовая диаграмма для яичного лецитина, характеризующая

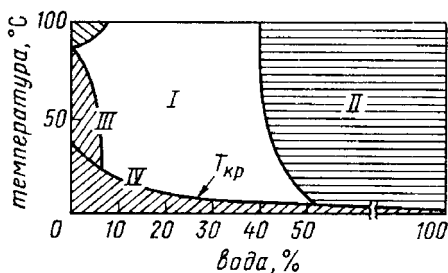


Рис. 21. Фазовая диаграмма смеси яичного лецитина с водой

I – жидкокристаллическое состояние, бислой; II – двухфазная система: вода-бислойные структуры; III – область сосуществования ламеллярных и гексагональных структур; IV – гель.  $T_{кр}$  – кривая температуры фазового перехода.

соотношение различных мезоформ этого липида в разных условиях представлена на рис. 21.

Примером того, как существенно влияет вода на фазовые переходы, является модификация фазового состояния мембраны под влиянием перекисного окисления липидов (ПОЛ), когда  $T_{кр}$  снижается. Это явление объясняется увеличением содержания воды в бислое. Почему это происходит?

Гидратация бислоя зависит от присутствия заряженных фосфолипидов, наиболее сильно она возрастает при индукции ПОЛ. Образую-

щие в качестве промежуточных продуктов гидроперекиси являются высоко гидрофильными, они эффективно разрушают бислои, увеличивая доступность гидрофобных доменов мембраны для молекул воды. Именно по этим причинам ПОЛ имеет такое «разрушительное» влияние на мембранные структуры.

В момент фазового перехода бислоя происходит несколько одновременных событий: возрастает подвижность полярных  $-N^+-(CH_3)_3$ -групп; увеличивается вращательная подвижность С-С связей, что приводит к облегчению *транс-гош* перехода и образованию кинков; увеличивается скорость латеральной диффузии молекул (рис. 22). Следствием этого являются два важных обстоятельства: изменение геометрических размеров бислоя, которое объясняется латеральным расширением площади, занимаемой каждой молекулой фосфолипидов, увеличением гидрофобного объема мембраны.

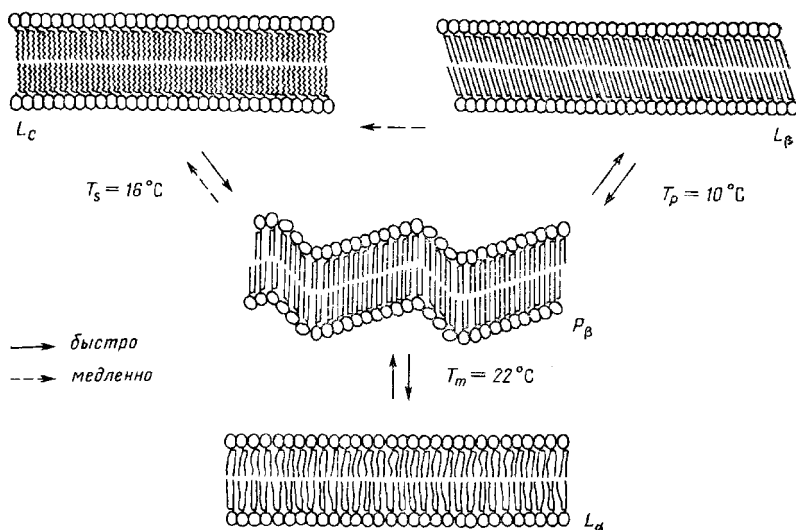


Рис. 22. Схематическое изображение четырех фазовых состояний ламеллярного бислоя, образованного чистым димристоилфосфатидилхолином

Сплошная стрелка обозначает быстрые (порядка минут или меньше), а пунктирная – медленные (порядка месяцев) переходы.

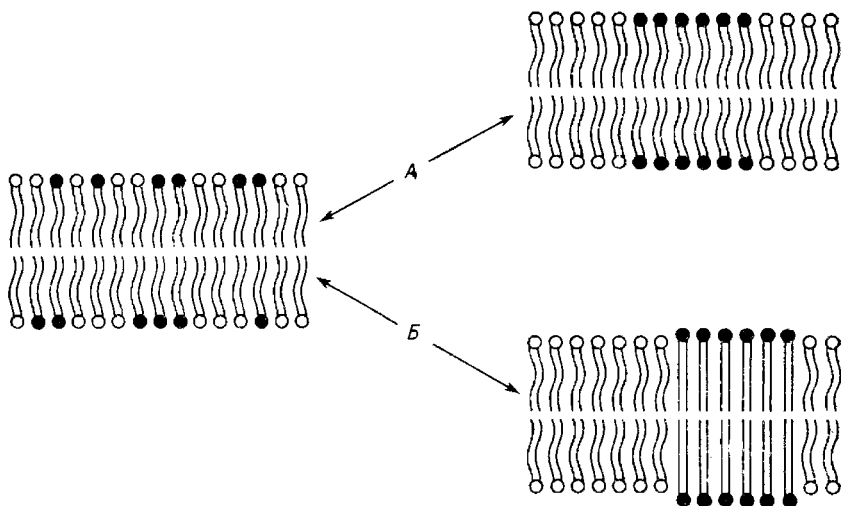


Рис. 23. Разделение фаз в гетерогенном бислое (А) с одновременным фазовым переходом части бислоя (Б) под влиянием температуры

Из-за неодновременности проявления этих свойств в ходе фазовых перестроек бислоя более упорядоченные области мембраны сосуществуют с уже расплавленными – наблюдается фазовое разделение (рис. 23).

В этих условиях для мембраны характерно существование разного рода дефектов, индуцирующих взаимодействие белковых молекул друг с другом, встраивание в бислой соединений, повышение проницаемости для ионов и т. д.

Фазовые переходы, индуцируемые температурой, – объективная характеристика бислоя, состоящего из одного или нескольких (не больше 2–3 компонентов). В случае гетерогенных систем методы регистрации дают результаты, не поддающиеся однозначной интерпретации. Фазовые переходы в мембране индуцируются не только изменениями температуры. Они могут быть вызваны сдвигом рН среды, электрическим потенциалом, двухвалентными катионами, способствующими образованию кластеров определенных фосфолипидов и разделению фаз; фазовые переходы также сопровождают действие гормо-

нов на биологические мембраны. Таким образом, исследование термотропных переходов имеет не только теоретическое значение: аналогичные переходы осуществляются в биологических системах при подготовке животных к гибернации или выходе из зимней спячки, при термоадаптациях, адаптации мигрирующих рыб к морской воде и т. д.

Кроме перехода типа «гель – жидкий кристалл» липиды могут претерпевать превращения другого рода, приводящие к образованию гексагональной фазы  $H_{II}$  (рис. 20). Эти небислойные структуры легко образуют короткоцепочечные фосфолипиды с полярными головами (например, фосфатидилсерин, фосфатидная кислота). Образованию гексагональных структур способствуют такие явления как повышение температуры, увеличение ненасыщенности жирнокислотных цепей, высокая ионная сила при щелочном  $pH$ , а также понижение гидратации бислоя. Переход отдельных участков бислоя в фазу  $H_{II}$  приводит к нарушению целостности мембраны, формированию каналов проницаемости, образованию дефектных зон.

В искусственных мембранах были зарегистрированы переходы такого рода. В нативных мембранах, вероятно, они также могут образовываться. Для мембран хлоропластов переходам бислоя в гексагональную  $H_{II}$ -фазу приписывается важная регуляторная роль. Предполагают, что в мембранах саркоплазматического ретикулума мышц такие переходы могут индуцироваться в результате ферментативного обмена жирнокислотными цепями между длинноцепочечными фосфатидилсерином и короткоцепочечным фосфатидилхолином.

В мембранах эубактерий обнаруживается большое количество липида, склонного к образованию гексагональных структур – плазменилэтаноамина. Превращение его в глицероацетальплазмалоген препятствует образованию фазы  $H_{II}$ . Обратная реакция, выражающаяся в увеличении ненасыщенности мембранных компонентов и «разрыхлении» ее структуры, индуцирует образование гексагональной фазы в мембране. Как уже упоминалось, гексагональная фаза может облегчать флип-флоп переходы липидных молекул.

#### 4.2.7. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ

Микровязкость и фазовые переходы липидов определяют функциональную динамичность мембраны. Совершенно очевидно, что липидный состав различных мембран не является случайным, однако удовлетворительного объяснения этому феномену не найдено. Клеточная мембрана может содержать более 100 разных типов липидных молекул. Почему их так много и почему каждая мембрана имеет уникальный липидный состав, пока неясно. Но становится все более очевидным, что липиды активно участвуют в процессах, протекающих в мембранах. Рассмотрим некоторые факторы, возможно, предопределяющие липидный состав мембраны.

1. Смесь липидов обязательно должна быть способна образовывать стабильный бислой, в котором могли бы функционировать белки.

2. Некоторые липиды способствуют стабилизации сильно искривленных участков мембраны, образованию контакта между мембранами или связыванию определенных белков, поскольку форма этих молекул благоприятствует нужной упаковке бислоя на соответствующих участках мембраны.

3. Некоторые липиды являются важными биорегуляторами. Наиболее изучена в этом отношении регуляторная роль производных фосфатидилинозитола в плазматических мембранах клеток эукариот. Некоторые мембранные липиды являются предшественниками вторичных посредников при передаче гормонального сигнала. Так, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (ФИФ<sub>2</sub>) под действием фермента фосфолипазы C гидролизруется до диацилглицерола, ДАГ, активатора протеинкиназы C, и инозитол-1,4,5-трисфосфата (ИФ<sub>3</sub>) – регулятора кальциевого обмена в клетке (см. раздел 8). ДАГ, ИФ<sub>3</sub>, протеинкиназа C и Ca<sup>2+</sup> – участники фосфоинозитольной системы передачи сигнала, причем два первых образуются из мембранных компонентов, третий является мембраносвязанным белком, а последний (кальций) – является ионом, проникающим через специальные каналы на клеточной мембране и запускающим этот процесс.

4. Некоторые липиды участвуют в реакциях биосинтеза. Например, в клетках *E. coli* фосфатидилглицерол поставляет глицерофосфатный фрагмент при биосинтезе периплазматических олигосахаридов.

5. Отдельные липиды необходимы для поддержания оптимальной активности ряда ферментов. Они формируют среду для функционирования мембранных белков, способных принимать нативную конформацию лишь в гидрофобном окружении. Выделенные из мембран ферменты, лишенные липидного окружения, как правило, не проявляют каталитической активности, или изменяют ее при изменении гидрофобности среды. Такова, например, митохондриальная креатинкиназа, фермент, катализирующий образование креатинфосфата. Для проявления ее нормальной активности требуется взаимодействие с кардиолипином внутренней мембраны митохондрий.

6. Ганглиозиды (гликолипиды), как полагают, играют важную роль в регуляции роста клеток, являются специфическими рецепторами в плазматической мембране и ответственны за клеточную адгезию.

7. Кроме того, некоторые липиды выполняют «якорную» функцию, например, к молекуле фосфатидилинозитола через олигосахарид могут присоединяться специфические белки наружной поверхности клетки – образуется фосфатидилинозитолгликан. Пример такого заякоренного белка – ацетилхолинэстераза, катализирующая гидролиз ацетилхолина в синаптической щели. Этот фермент фиксируется на постсинаптической мембране, ковалентно присоединяясь к фосфатидилинозитолгликану. При участии фосфолипазы C (гидролизующей мембранные липиды) может происходить модификация мембраны и отделение белков от внешней поверхности клетки.

8. Липиды могут быть аллостерическими активаторами мембранных ферментов. Фермент протеинкиназа C катализирует реакции фосфорилирования белков. В неактивной форме протеинкиназа C находится в цитозоле. Однако после стимуляции клетки (повышении в клетке концентрации кальция) фермент быстро активируется ионами кальция и оказывается связанным с мембраной.

Функционально активная протеинкиназа С – комплекс, содержащий мономер фермента, молекулу диацилглицерола, один или более ионов кальция и четыре молекулы фосфатидилсерина.

Экспериментально было показано, что организмы часто могут выдерживать, причем без всяких последствий, существенные изменения липидного состава мембран. Например, с помощью генетической трансформации можно получить жизнеспособный штамм *E. coli*, в мембранах которых содержится до 34% фосфатидной кислоты, обычно отсутствующей в штаммах дикого типа. Очевидно, тот липидный состав, который характерен для штаммов дикого типа, не является обязательным для выживания клеток, по крайней мере, в условиях их выращивания в лаборатории.

#### 4.3. УГЛЕВОДЫ МЕМБРАН

Другой мембранный компонент, **углеводы**, в составе мембран обнаруживаются лишь в соединении с белками (гликопротеины и протеогликаны) и липидами (гликолипиды). В мембранах гликозилировано около 10% всех белков и от 5 до 26% липидов (в зависимости от объекта). В числе углеводных компонентов – глюкоза, галактоза, нейраминовая кислота, фукоза и манноза.

В составе соединительной ткани и межклеточного вещества обнаруживаются протеогликаны: углеводные компоненты в них сульфатированы. Их типичными представителями являются хондроитинсульфат, дерматансульфат и гепарансульфат.

Углеводные компоненты мембранных структур в подавляющем большинстве открываются во внеклеточную среду. Их функции связаны с контролем за межклеточными взаимодействиями, поддержанием иммунного статуса клетки, обеспечением стабильности белковых молекул в мембране.

В качестве наиболее распространенного примера гликопротеинов обычно приводят иммуноглобулины крови, но это не мембранные гликопротеины. Типичным примером *гликоконъюгатов*, выполняющих свои функции в составе мембран, являются антиген-



ные детерминанты эритроцитов различных групп крови. Они представлены как гликолипидами, так и гликопротеинами, в числе которых – белок гликофорин.

Очень важна роль углеводного компонента белковых молекул в формировании специфических функций мембранных белков и липидов. Многие белковые молекулы, особенно биологически активные вещества (например, нейропептиды), синтезируются в виде крупных, неактивных предшественников, которые затем расщепляются специфическими протеазами с формированием «зрелых» биологически активных продуктов. Деятельность протеаз контролируется уровнем гликозилирования белков. Так, многие белки, синтезируемые вначале как гликопротеины, в дальнейшем в результате *процессинга* теряют олигосахаридную часть.

#### **4.4. МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ – ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ**

Если липиды – относительно низкомолекулярные соединения с молекулярным весом около 1000 дальтон (1 килодальтон, кДа), то **белки** относятся к высокомолекулярным соединениям. Их молекулярный вес достигает 1000 кДа и более.

Белковые цепи состоят из различных аминокислот, имеющих или гидрофильную, или гидрофобную природу. Белковая цепь включает сотни аминокислотных остатков. Отдельные белки различаются между собой не только по числу аминокислотных остатков, но и по их структуре и по порядку следования друг за другом. Физико-химические и биологические свойства белка определяются именно последовательностью аминокислотных остатков в ее цепи, то есть своей первичной структурой. В растворе белковая цепь не имеет форму вытянутой нити, а частично образуют  $\alpha$ -спираль. Между  $-C=O$  и  $-NH$  группами, если они достаточно близко подходят друг к другу, возникают водородные связи, которые придают устойчивость спиральным участкам:  $-C=O \dots H-N-$ . Протяженность спиральных участков определяется включением в белковую цепь аминокислоты пролина, в этом участке образуются изгибы.

Некоторые аминокислоты плохо укладываются в спирали и возникает так называемая  $\beta$ -складчатая структура. Кроме того, остатки цистеина, даже расположенные на большом расстоянии друг от друга, могут сшиваться между собой ковалентными S–S связями. В результате белковая молекула сворачивается в компактную глобулу. Глобулярная структура характерна для белков, функционирующих в гидрофильной среде (в цитоплазме). Имеются и белки, которые в силу особенностей аминокислотного состава (в частности, низкого содержания пролина) принимают форму длинных фибрилл (фибриллярные белки).

Поскольку функции белков определяются особенностями их структуры и упаковки, ученые обращают особое внимание на это обстоятельство. Различают несколько видов белковых структур, различающихся по сложности. Последовательность аминокислот называют первичной структурой, поскольку именно она во многом определяет свойства белковой молекулы. По-видимому, именно в первичной структуре «записана» информация о том, какая будет вторичная структура белка, составленная из  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -складок. Белковые глобулы рассматривают как пример третичной структуры – на ее уровне формируется специфическая ферментативная, рецепторная и другие виды активности белковой молекулы. При ассоциации нескольких глобул определенным образом между собой образуется четвертичная структура, приобретающая способность тонкой регуляции белковых функций. Как происходит образование белковых ассоциатов при формировании четвертичной структуры?

Если полярных участков в молекуле белка недостаточно для того, чтобы изолировать гидрофобные участки глобулы от соприкосновения с водой, то часть из них окажется на поверхности. Для того, чтобы уменьшить невыгодные контакты с водой, гидрофобные белки образуют ассоциаты, состоящие из нескольких субъединиц. Именно такое строение имеет подавляющее число мембранных белков, поэтому можно предположить, что в их составе преобладают аминокислоты с неполярными радикалами. Для ряда мембранных белков это действительно справедливо.

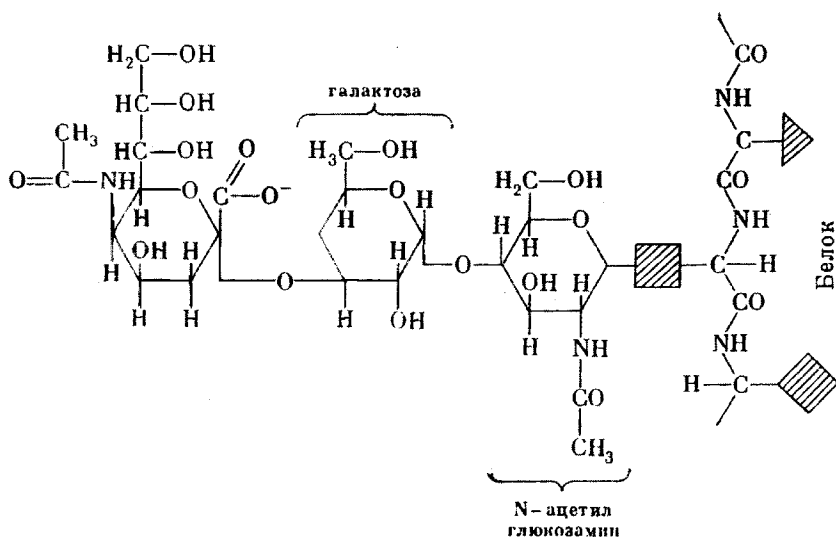


Рис. 24. Структура гликопротеина

Молекула гликопротеина состоит из белкового остова, к которому присоединены сахарные цепочки. Длина и состав цепочек могут варьировать. Заштрихованными фигурами обозначены радикалы аминокислот.

Важный белковый компонент мембраны – гликопротеины – белковые молекулы, содержащие углеводные цепочки (рис. 24). Периферические белки или домены интегральных белков, расположенные на наружной поверхности мембраны, почти всегда гликозилированы.

Углеводные цепочки гликопротеинов имеют разнообразную структуру. Роль гликопротеинов в жизни клетки многообразна. Некоторые из них играют роль ферментов, другие обладают гормональной активностью. Предполагают, что одна из функций процесса гликозилирования – обеспечить возможность белкам, синтезированным в аппарате Гольджи, транспорта через клеточную мембрану. Гликопротеины, расположенные на поверхности

клеток, ответственны за такие важные процессы, как взаимное распознавание клеток – с их помощью клетки многоклеточного организма устанавливают межклеточные контакты. Они, по-видимому, также служат материалом, склеивающим клетки одного типа между собой. Предполагают также, что от структуры гликопротеинов зависят устойчивость и многие другие свойства клеточной поверхности. Гликозилированные белки обладают резистентностью к протеолизу и поэтому имеют большую длительность жизни. Гликопротеины, находящиеся на поверхности эритроцитов, определяют группу крови.

#### *4.4.1. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКОВ В БИСЛОЕ*

Мембраны содержат от 20 до 80% белка (по весу). При этом в разных мембранах количество белков существенно различается. Так, в мембранах митохондрий на долю белков приходится около 75%, а в плазматической мембране клеток миелиновой оболочки – около 25%. Так как липидные молекулы имеют небольшой размер (5 Å) и невысокую молекулярную массу, их число в 50 раз больше числа белковых молекул. Поэтому белковые молекулы как бы вкраплены в липидный бислой мембраны.

Белки различаются по своему положению в мембране (рис. 25). Молекулы белков могут глубоко проникать в липидный бислой и пронизывать его (интегральные белки), либо прикрепляться к мембране разными способами (периферические белки). Периферические белки отличаются от интегральных меньшей глубиной проникновения в бислой и более слабыми белок-липидными взаимодействиями (то есть меньшей зависимостью от бислоя). Периферические белки могут обратимо менять свой статус, прикрепляясь к мембране на определенное время (такие белки называют амфипатическими). Прикрепляясь к мембране, они взаимодействуют либо с интегральными белками, либо с поверхностными участками липидного бислоя, приобретая новые свойства. Деление мембранных белков на периферические и интегральные определяется их структурой, количеством гидрофобных аминокислот и их расположением в первичной структуре, то есть всеми теми свойствами, которые обеспечивают взаимодействие белка с бислойем. Для амфипатиче-

ских белков имеются специальные сигналы, стимулирующие их ассоциацию с мембраной (часто таким сигналом является их фосфорилирование специфическими киназами, изменяющее их третичную структуру и гидрофобность, точнее – лиотропность). К таким белкам, например, относят протеинкиназу C, факторы свертывания крови.

Белки, образующие комплексы с интегральными белками (к ним относится ряд пищеварительных ферментов, участвующих в гидролизе крахмала и белков), прикрепляются к интегральным белкам мембран микроворсинок кишечника. Примерами таких комплексов могут быть сахараза-изомальтаза и мальтаза-гликоамилаза. Полярные или заряженные домены белковой молекулы могут взаимодействовать с полярными «головками» липидов, образуя ионные и водородные связи.

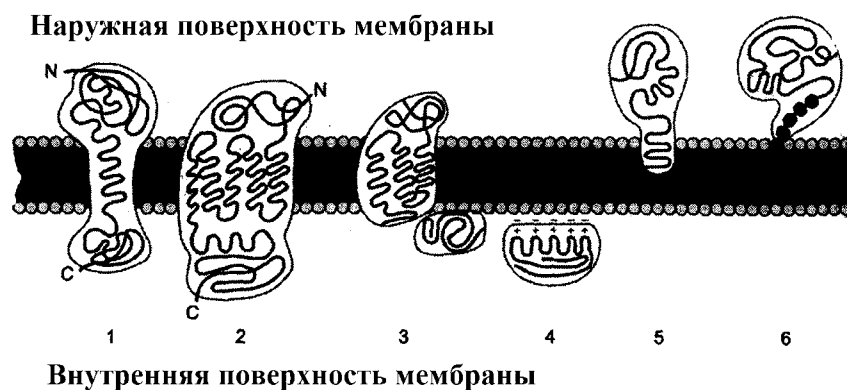


Рис. 25. Локализация белков в мембранах

Трансмембранные белки: 1 – гликофорин, 2 – рецептор адреналина. Поверхностные белки: 3 – белки, связанные с интегральными белками (сукцинатдегидрогеназа); 4 – белки, присоединенные к полярным «головкам» липидного слоя (протеинкиназа C); 5 – белки, «заякоренные» в мембране с помощью короткого гидрофобного концевой домена (цитохром  $b_5$ ); 6 – белки «заякоренные» в мембране за счет жирнокислотного радикала, ковалентно присоединенного к белковой молекуле (G-белок).

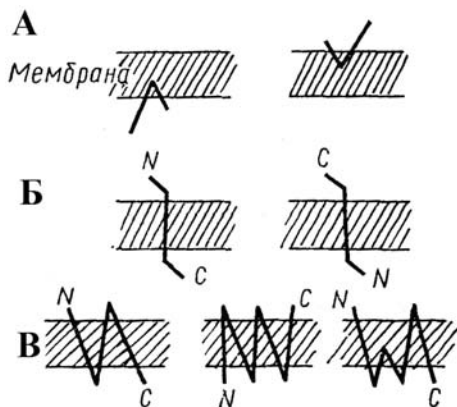


Рис. 26. Монотопическая (А), битопическая (Б) и поли-топическая (В) локализация белков в мембране

Интересный пример регулируемого взаимодействия с мембраной был обнаружен при изучении аминокислотной последовательности интактной формы микросомного цитохрома  $b_5$  (рис. 25). Этот белок участвует в различных окислительно-восстановительных реакциях в качестве переносчика электронов. Его относительно короткий участок пептидной цепи вблизи карбоксильного конца состоит сплошь из гидрофобных аминокислот. Если «гидрофобный якорь» удалить с помощью протеолиза, гем-

связывающий домен теряет связь с мембраной и высвобождается в среду.

Локализованный в мембране гидрофобный домен или «якорь» является еще одним характерным элементом структуры мембранных белков. С помощью такой структуры происходит закрепление периферических белков в мембране.

Согласно классификации, интегральные белки пронизывают липидный бислой. Размер интегральных мембранных белков в среднем составляет 80 Å, но встречаются и более крупные белки – до 350 Å величиной (белок тилакоидов хлоропластов). Обычно эти белки обладают выраженной асимметрией и, соответственно, асимметрично расположены в мембране (рис. 25).

Некоторые из трансмембранных белков пронизывают мембрану один раз (гликофорин) – битопические, другие имеют несколько участков (доменов), последовательно пересекающих бислой – политопические (рис. 26). Монотопические белки относятся к периферическим белкам (рис. 25).

Примером политопических белков являются транспортные АТФазы, бактериородопсин. Для бактериородопсина из мембраны *Halobacterium halobium* по данным рентгеноструктурного исследования фотосинтетических реакционных центров бактерий было показано, что его молекула содержит несколько  $\alpha$ -спиральных участков, последовательно пересекающих бислой (рис. 27).

Diagram illustrating the structure of a lipid bilayer and various embedded proteins. The bilayer is shown with lipid tails (N and C) and proteins are labeled as follows:

- Left side (outside):**
  - Гликофорин
  - Рецептор ЛНП
  - Тяжелая цепь HLA-A
  - Гемагглютинин вируса гриппа
- Right side (inside):**
  - Снаружи
  - С фосфолипидный бислой
  - Внутри
  - Субъединица рецептора ацетилхолина
  - Бычий родопсин
  - Цитохром  $b_5$
- Central labels:**
  - Нейраминидаза вируса гриппа
  - Эритроцитарный белок полосы III

63

Анализ аминокислот некоторых мембранных белков показал, что они содержат примерно столько же полярных аминокислот, сколько и обычные водорастворимые белки, тем не менее в воде они растворяются очень плохо. Причина их гидрофобности кроется не в самом аминокислотном составе, а в порядке чередования аминокислотных остатков – гидрофобные аминокислотные радикалы не рассеяны вдоль по полипептидной цепи, а сконцентрированы в гидрофобные домены.

Некоторые мембранные белки увеличивают свою гидрофобность с помощью *ковалентной связи с липидными компонентами мембран*. Эти белки используют для более прочного контакта с бислоем миристиновую  $C_{14:0}$  или пальмитиновую  $C_{16:0}$  жирные кислоты или гликозилфосфатидилинозитол. Белки, связанные с жирными кислотами, локализованы, в основном, на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны, а белки, связанные с гликозилфосфатидилинозитолом – на наружной.

В структуре многих мембранных белков, как правило, четко различаются участки, ответственные за их биологическую активность. Очень часто биологически активный участок состоит преимущественно из полярных аминокислот, тогда как не активные домены построены, главным образом, с участием аминокислот с неполярными радикалами. Поэтому вероятно, что полярная часть мембранного белка контактирует с цитоплазмой и с полярными головками липидов и обеспечивает функциональную активность белка, а неполярная часть связывается с углеводородными цепями липидных молекул и обеспечивает структурную устойчивость молекулы. Однако такое правило не является универсальным. Так, белки, превращающие гидрофобные субстраты (к ним относятся, например, гидроксилазы не растворимых в водной фазе ксенобиотиков) имеют гидрофобные карманы, концентрирующие молекулы субстрата для его ферментативной модификации. Таким образом, мы видим, что мембранные белки обычно связываются с мембраной с помощью нековалентных взаимодействий двух типов: – *электростатических* (на уровне полярных голов фосфолипидов) и *гидрофобных* (в толще бислоя).



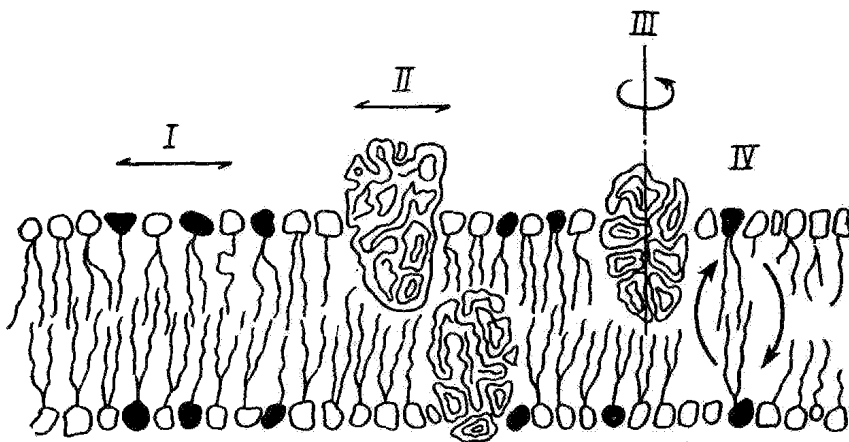


Рис. 28. Подвижность компонентов биологических мембран

I – латеральная подвижность липидов в бислое, II – латеральная подвижность белковых молекул, III – вращательная подвижность, IV – флип-флоп переход липидных молекул.

Белки в бислое весьма лабильны и могут совершать различные виды движений, при этом подвижность белков в бислое и их ассоциация контролируется липидами (рис. 28, I). Некоторые мембранные белки перемещаются вдоль бислоя (рис. 28, II). Например, фосфолипаза А, связываясь цитоплазматической поверхностью мембраны, может латерально перемещаться по поверхности бислоя и гидролизовать несколько тысяч фосфолипидов до тех пор, пока не диссоциирует от мембраны. Латеральная диффузия интегральных белков в мембране ограничена их большими размерами, взаимодействием с другими мембранными белками, а также элементами цитоскелета или внеклеточного матрикса. Однако она также имеет вполне измеримую величину.

Вращательная подвижность белков (рис. 28, III) связана с их вращением вокруг оси, перпендикулярной поверхности бислоя. Периферические белки оказывают менее значительное воздействие на состояние и подвижность ацильных цепей фосфолипидов. Напротив, интегральные белки сильно ограничивают

подвижность аннулярных липидов, которые их непосредственно окружают в мембране. По этой причине аннулярные липиды называют связанными (иммобилизованными). Они по своему поведению и подвижности отличаются от липидов суммарного липидного бислоя. Белковые молекулы ограничивают подвижность примыкающих к их поверхности липидов, и аннулярный слой оказывается более упорядоченным. Количество связанных липидов зависит от насыщенности мембраны белками.

#### 4.4.2. БЕЛОК-ЛИПИДНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Анализ белок-липидных взаимодействий в мембране позволяет выделить контакты 4 основных типов (рис. 29).

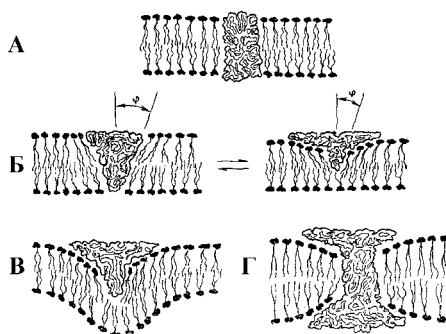


Рис. 29. Вызванная белком модификация бислоя

1 тип: наиболее часто распространен случай, когда внедряющийся в бислой белок вызывает локальное возрастание упорядоченности части липидной массы (создание аннулярного слоя). Так действуют бактериородопсин, грамицидин (пептидный ионофор, увеличивающий проницаемость мембран для ионов) и многие другие интегральные мембранные белки.

2 тип: периферические белки, не проникающие на всю глубину бислоя, вызывают эластическую деформацию одной его стороны. Такое влияние на физико-химические параметры бислоя характеризуется определенным дальнодействием. Именно им определяется облегчение взаимодействия мембранных рецепторов с инсулином и другими гормонами.

3 тип: в результате ярко выраженной гидрофобности белка может происходить резкое изменение градиента кривизны и деформация бислоя, что имеет место в случае взаимодействия с мембраной цитохрома  $b_5$ .

4 тип: сочетание гидрофильных и гидрофобных свойств белковой молекулы может обеспечить не только проникновение белка через бислой, но и существенное давление на него, приводящее к изменению геометрии бислоя – сжиманию одних частей и уширению других (например, в случае белка эритроцитарных мембран гликофорина).

#### *4.4.3. ФУНКЦИИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ*

Как правило, именно белки ответственны за функциональную активность мембран. К таким белкам относятся разнообразные ферменты, транспортные белки, рецепторы, каналы, белки, образующие поры (аквапорины), то есть разнообразные белковые структуры, которые обеспечивают уникальность функций каждой мембраны.

Мембранные белки по биологической роли можно разделить на три группы:

- I – белки-ферменты, обладающие каталитической активностью,
- II – рецепторные белки, специфически связывающие те или иные вещества,
- III – структурные белки.

I. Белки-ферменты наиболее распространены среди всех мембранных белков. В их число входят как интегральные (мембранные АТФазы), так и периферические (ацетилхолинэстераза, кислая и щелочная фосфатазы, РНКазы) белки. Ферменты – большие молекулы, в то время как размеры молекул веществ (субстратов), вступающих в ферментативные реакции, обычно в тысячи раз меньше. Фермент взаимодействует с субстратом небольшим участком своей поверхности – активным центром. Специфичность фермента всегда определяется тем, насколько поверхность его активного центра соответствует поверхности субстрата. Этот принцип структурного соответствия повсеместно используется и в работе белков клеточных мембран. В дополнение к этому надо учесть, что конформация внедряющихся в мембрану белков зависит от мембранного бислоя, так что и их ферментативная активность контролируется мембранными липидами. Этот контроль может реализоваться благодаря как влиянию на сродство к субстратам или на их доступность, так и воздействию

на длительность жизни (прочность) белковых ассоциатов мембранных ферментов, образующихся в клеточной мембране.

Ферменты входят в состав как плазматических, так и внутриклеточных мембран. Например, на наружной мембране эпителиальных клеток, выстилающих пищеварительные органы, имеются ферменты, осуществляющие расщепление питательных веществ еще до того, как они попадут внутрь клетки (этот процесс, открытый отечественным физиологом А.М. Уголевым носит название «мембранное пищеварение»). Наружная мембрана клеток печени содержит более 20 различных ферментов.

Мембранные ферменты нуждаются в контакте с окружающими их липидами. Когда их извлекают из липидного окружения (например, когда липиды экстрагируются из мембраны неполярными растворителями), работа мембранных ферментов нарушается (меняются особенности кинетики или характера влияния посторонних веществ или же вообще прекращается). Активность таких мембранных ферментов удастся частично восстановить, если к ним добавить липидные мицеллы. Анализ природы липидов, активирующих мембранные ферменты, демонстрирует отсутствие строгой специфичности - определяющим является гидрофильно-липофильный коэффициент липидной смеси. В ряде случаев активировать делипидированный фермент удастся даже детергентом. Однако такой реактивированный фермент теряет способность воспринимать регулирующие сигналы извне, которые управляли его работой в «живой» мембране.

Активирующее действие липидов на мембранные ферменты может быть по меньшей мере двояким. Во-первых, в присутствии липидов может меняться форма молекулы мембранного фермента, так что его активный центр становится доступным для субстрата. Во-вторых, липиды могут играть роль организатора ансамбля или конвейера, состоящего из многих ферментов.

Молекулы мембранных ферментов содержат большие неполярные гидрофобные участки. Поэтому в водной среде они агрегируют, из-за чего большая часть активных центров маскируется. В присутствии липидов мембранные ферменты организуются в ансамбли, окруженные аннулярными липидными молекулами, и их

ферментативная активность может проявиться в полной мере. Для нормальной работы мембранных ферментов существенно, чтобы окружающие их липиды находились в жидком агрегатном состоянии.

II. Рецепторными белками называют белки, специфически связывающие те или иные низкомолекулярные вещества. При связывании специфических лигандов рецепторные белки обратимо меняют свою форму. Эти изменения запускают внутри клетки ответные химические реакции. Таким способом клетка воспринимает различные сигналы, поступающие из внешней среды, и отвечает на них. Белки-рецепторы и белки, определяющие иммунную реакцию клетки, – антигены, также могут быть как интегральными, так и периферическими компонентами мембраны (рис. 25). Часто рецепторы входят в состав более сложных мембранных комплексов, содержащих белки-исполнители. Например, холинорецептор воспринимает сигнал от нейромедиатора и передает его на белок-каналобразователь. Эта реакция открывает проницаемость мембраны для ионов натрия и калия и формирует возбуждающий потенциал.

III. Структурные мембранные белки лишены явных ферментативных свойств, возможно потому, что в химическом отношении они мало изучены. Их исследование затрудняется главным образом двумя обстоятельствами. Во-первых, структурные белки как бы «немые», то есть, не обладают известной ферментативной активностью. Во-вторых, структурные белки имеют в составе своих молекул обширные гидрофобные участки. При очистке они легко образуют тесные ассоциаты друг с другом или с липидами, что затрудняет их характеристику.

#### ***4.5. ЦИТОСКЕЛЕТ И ГЛИКОКАЛИКС МЕМБРАН***

Структурные белки мембраны связаны со стороны цитоплазмы с примембранными белками, создающими белковые компоненты цитоскелета. Структура цитоскелета довольно лабильна, его перестройки происходят постоянно и с большой скоростью. Изменчива и связь цитоскелета с мембранными белками.

Исследована ориентация белков цитоскелета эритроцитов, а также относительное расположение индивидуальных белков этой структуры. В состав цитоскелета входят 12 различных белков с молекулярной массой от 25 до 250 кДа (рис. 30). Функции ряда белков установлены. Эти белки позволяют сделать мембраны более устойчивыми без утраты определенной подвижности ее компонентов, необходимой для обеспечения транспортных функций мембран. Например, жесткость плазматической мембраны безъядерных эритроцитов создается за счет ковалентного связывания структурных белков с интегральными белками мембран. В ее состав входит так называемый «белок полосы 3» – интегральный гликопротеин, который обеспечивает транспорт ионов через бислой. Одновременно через белок анкерин он связывается с молекулами спектрина, основного белка цитоскелета, образующего двумерную сеть, к которой прикрепляется актин. Актин цитоскелета не существует в виде отдельных глобул, а образует микрофиламенты – они представляют собой сократительный аппарат цитоскелета.

С промежуточными филаментами цитоскелета связана также : наружная ядерная мембрана. Они фиксируют положение ядра в объеме цитоплазмы. Митохондрии перемещаются в клетке также при участии элементов цитоскелета. К цитоскелету примыкают микротрубочки, образуемые при полимеризации глобулярного белка тубулина.

Основная роль микротрубочек заключается в обеспечении примембранного транспорта веществ, секреции, эндоцитоза. Микротрубочки и микрофиламенты цитоскелета обеспечивают противодействие клетки изменению ее объема и придают эластичность мембране. Благодаря динамическим свойствам цитоскелета изменения в его структуре позволяют клетке проявить гибко-эластичные свойства, изменять свою форму. В той области клетки, где спектриновая сеть разрушается, могут образовываться впячивания или возникать отшнуровывающиеся части клетки.

Наличие цитоскелета обеспечивает дополнительную прочность мембране. Однако роль структурных белков не ограничивается лишь функцией остова, на котором крепятся липиды и ферменты. Известно, например, что структурные белки взаимодействуют со

многими низкомолекулярными соединениями, в том числе с АТФ, и могут влиять на работу мембранных ферментов. Достаточно заменить одну аминокислоту в составе структурного белка митохондрий для того, чтобы нарушить многоэтапный процесс сборки ферментов митохондриальной дыхательной цепи.

Окружая клетку со всех сторон, мембрана выполняет роль механического защитного барьера. Например, чтобы проколоть клетку с помощью микроэлектрода требуется довольно большое усилие. При давлении иглы электрода на мембрану она сначала сильно прогибается, и лишь затем прорывается. Искусственные липидные мембраны менее устойчивы. Эта механическая устойчивость мембраны может определяться дополнительными компонентами, такими как цитоскелет и гликокаликс (внеклеточный матрикс).

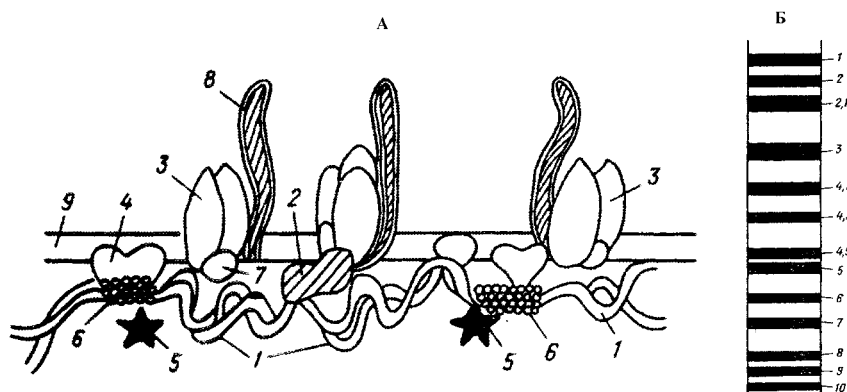


Рис. 30. Цитоскелет клетки

А – схема расположения белков в цитоскелете эритроцитов: 1 – спектрин; 2 – анкерин; 3 – белок полосы 3; 4 – белок полосы 4.1; 5 – белок полосы 4.9; 6 – олигомер актина; 7 – белок полосы 6; 8 – гликофорин; 9 – мембрана.

Б – электрофореграмма белков цитоскелета: 1, 2 – спектрины; 2.1 – анкерин; 5 – актин; 6 – неидентифицированный белок; 7 – тропомиозин; 8–10 – гликофорины; остальные белки обозначены цифрами, соответствующими их положению на электрофореграмме.

Гликокаликс представляет собой внешний по отношению к клеточной мембране слой. Он состоит из гликопротеинов, протеогликанов и глюкозаминогликанов и связывается с мембранными структурами с помощью специальных белков-рецепторов, объединяя цитоскелет, мембрану и внеклеточный матрикс в динамическую, подвижную структуру (рис. 31). Как показали электронномикроскопические исследования, гликокаликс имеет вид рыхлого волокнистого слоя толщиной 30-49 Å, покрывающего всю поверхность клетки.

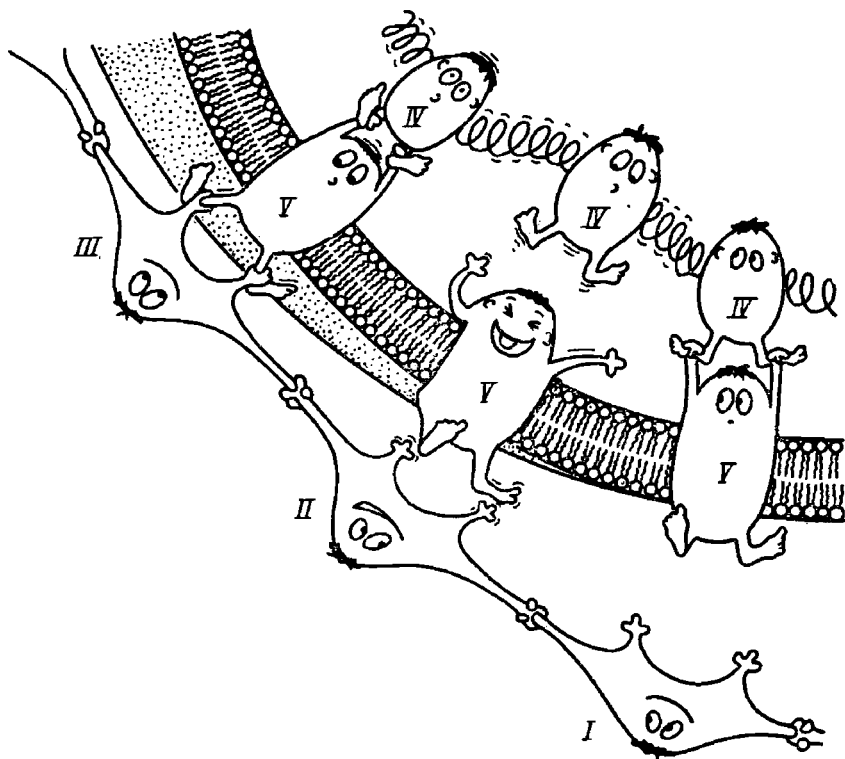


Рис. 31. Взаимодействие цитоскелета с гликокаликсом

I – протеогликан, II – коллаген, III – фибронектин; образует плотную сеть, IV – молекулы актина, V – интегральные белки мембраны типа белка полосы 3.



В состав гликокаликса входят полисахаридные цепочки мембранных интегральных белков – гликопротеидов. Они содержат такие углеводы, как манноза, глюкоза, сиаловая кислота и др. Углеводные гетерополимеры гликокаликса образуют ветвящиеся цепочки, между которыми располагаются свободные гликолипиды и протеоглики. Слой гликокаликса сильно обводнен, имеет желеобразную консистенцию, что значительно снижает диффузию различных веществ из клетки. Здесь же могут накапливаться выделенные клеткой гидролитические ферменты, участвующие во внеклеточном расщеплении полимеров (внеклеточное пищеварение) до мономерных молекул, которые затем транспортируются в клетку.

## **5. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН**

Клеточные мембраны даже в клетках одного типа значительно отличаются друг от друга как по составу, так и по осуществляемым ими функциям. По этой причине первоочередной задачей исследования обычно является получение клеточных фракций в достаточно чистом виде.

### ***5.1. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ***

Исследование мембран, как правило, сопряжено с их очисткой, причем для каждого типа мембран характерны свои условия препаративного выделения. Нужно подобрать оптимальные условия разрушения клеток и отделения мембран, представляющих интерес, от других клеточных компонентов. Особого внимания заслуживают критерии чистоты выделенных мембран.

Для получения мембран клетки сначала разрушают, используя один из следующих методов: осмотический шок, растирание нарезанных кусочков ткани с кварцевым стеклом или стеклянными шариками или размельчение гомогенизаторами различных типов. Метод разрушения клеток и длительность обработки выбирают в зависимости от типа ткани. Бактериальные протопласты и эритроциты обычно подвергают осмотическому шоку. Мягкие ткани (печень, мозг) разрушают с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера, более плотные – ножевым гомогенизатором, жаберы рыб растирают с кварцевым песком.

Если полученную путем гомогенизации смесь органелл и мембранных фрагментов подвергнуть центрифугированию, то частицы, имеющие различную плотность и размеры, будут осаждаться с различной скоростью. При постоянном центробежном ускорении скорость осаждения будет прямо пропорциональна массе частиц и разности между их плотностью и плотностью среды.

Разрушенные клеточные мембраны способны замыкаться и образовывать пузырьки (везикулы) диаметром 0,3–3,0 мкм. В

качестве примера можно привести 1) микросомы, получаемые из плазматической мембраны, эндоплазматического ретикулула (ЭР) или специализированных систем; 2) субмитохондриальные частицы из внутренней митохондриальной мембраны; 3) синаптосомы, образующиеся при отрыве нервных окончаний в области синаптических контактов; 4) бактериальные мембранные везикулы, образующиеся из плазматической мембраны *E.coli*.

Везикулы образуются и из других мембранных систем, например, из мембран аппарата Гольджи. Некоторые мембраны, в частности, мембраны боковых поверхностей соприкасающихся друг с другом животных клеток, не образуют везикул. При разрушении таких клеток происходит отрыв пары смежных мембранных фрагментов, удерживаемых вместе областью контакта. Наличие таких контактов предотвращает замыкание фрагментов в везикулы, поэтому мембраны выделяются в виде пластин или лентообразных структур.

В таблице 6 приведены данные о размерах и плотности различных органелл и получаемых из них фрагментов.

Таблица 6. Клеточные компоненты печени крыс

Фракция	Диаметр частиц, мкм	Режим осаждения		Равновесная плотность, г/см <sup>3</sup>
		Ускорение, g	Время, мин	
Целые клетки	15–20	600	15	1,20
Ядра	3–12	600	15	1,32
Аппарат Гольджи				
крупные фрагменты	1–3	2000	20	1,12–1,16
везикулы	0,05–0,5	14500	15	1,06–1,14
Митохондрии	0,7–1,1	10000	25	1,17–1,21
Лизосомы	0,4–0,8	10000	25	1,12–1,16
Шероховатые микросомы	0,05–0,2	14500	25	1,13–1,25
Гладкие микросомы	0,05–0,3	14500	25	1,06–1,23
Плазматические мембраны				
крупные фрагменты	3–20	1500	15	1,15–1,19
везикулы	0,05–0,3	14500	30	1,07–1,19

Видно, что если гомогенат какой-либо ткани центрифугировать с небольшим ускорением (например, в режиме 600 g, 15 мин), то

осаждут только ядра и неразрушенные клетки, при больших ускорениях (10000 g, 15 мин) можно осадить фракцию, содержащую преимущественно митохондрии, а затем – смешанную микросомальную фракцию. После центрифугирования в режиме 100000 g, 1 час) в супернатанте остаются только растворимые белки (фракция цитозоля); все мембранные фрагменты выпадают в осадок. Метод избирательного осаждения клеточных фрагментов называют методом дифференциального центрифугирования, а получаемые с его помощью препараты – субклеточными фракциями.

Фракции, полученные при однократном центрифугировании, никогда не бывают чистыми. Так, митохондриальная фракция кроме митохондрий и их фрагментов будет содержать в различных количествах лизосомы, везикулы, образованные из плазматической мембраны и мембран ЭР). Результаты фракционирования зависят от способа разрушения, состава среды и типа клеток, так как эти факторы определяют характер разрыва мембран и, следовательно, размеры образующихся фрагментов. После выделения субклеточных фракций необходимо их идентифицировать и проверить степень загрязненности другими органеллами. Для этого применяют несколько методов.

При выяснении морфологии мембранных фракций важную роль сыграли два метода: *дифракция рентгеновских лучей и электронная микроскопия*. Но следует иметь в виду, что при выяснении детальной картины молекулярной организации мембран оба этих метода сталкиваются с рядом ограничений.

*Микроскопию с фазовым контрастом* применяют в первую очередь для идентификации ядерной фракции. Митохондриальные фрагменты или везикулы шероховатого ЭР, содержащие на своей поверхности рибосомы, легко распознаются морфологически.

*Определение активности маркерных ферментов.* Фермент может служить маркером определенного типа мембран, если он прочно связан с мембраной, не инактивируется при выделении данной фракции и локализуется исключительно в данных органеллах.

К сожалению, многие маркерные ферменты (например, Na/K-АТФаза, 5'-нуклеотидаза, сукцинатдегидрогеназа) при выделении или хранении могут терять активность. Кроме того, большинство встроенных в мембрану ферментов характеризуется асимметричной локализацией активного центра. По этой причине их активность в замкнутых фрагментах часто не удастся определить из-за недоступности для субстрата. Это так называемая «латентная активность фермента». Она может быть выявлена в присутствии низких концентраций детергента или ионофоров (типа аламетицина), образующих крупные каналы в замкнутых мембранных везикулах. В таблице 7 приведены маркерные ферменты различных субклеточных фракций.

Таблица 7. Биохимические маркеры различных клеточных мембран

Органелла	Биохимический маркер
Плазматическая мембрана	Na, K-АТФаза, 5'-нуклеотидаза, аденилатциклаза
Эндоплазматический ретикулум	Глюкозо-6-фосфатаза, цитохром-P <sub>450</sub> , НАДФН-дегидрогеназа, цитохром b <sub>5</sub>
Митохондрии	моноаминоксидаза
наружная мембрана	малатдегидрогеназа
матрикс	цитохром c оксидаза, сукцинатдегидрогеназа
внутренняя мембрана	УДФ-галактозилтрансфераза
Аппарат Гольджи	кислая фосфатаза, кислые гидролазы
Лизосомы	каталаза
Пероксисомы	щелочная фосфатаза, сахараза
Мембраны щелочной каемки	ацетилхолинэстераза, ацетилхолиновые
Синапсомы	рецепторы

Для определения происхождения той или иной субклеточной фракции или степени ее чистоты недостаточно использовать один тест, а желательно иметь подробное описание полученной фракции. В то же время, определяя активность маркерных ферментов, можно оценить степень загрязненности используемой фракции мембран примесями.

## **5.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР**

### **5.2.1. ДИФРАКЦИЯ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ**

Этот метод в применении к изучению высокоупорядоченных кристаллических образований позволяет с высоким разрешением получать информацию о структуре. В случае малоупорядоченных препаратов возможности этого метода ограничены. Некоторые специализированные мембранные системы имеют регулярную структуру, поэтому их можно изучать рентгеноструктурными методами. Наиболее распространенным примером такого рода служит миелиновая оболочка, которая многократно оборачиваясь вокруг аксона, формирует регулярную систему из концентрических мембранных структур. Исследования дифракции рентгеновских лучей на миелине, проведенные еще в 1930 г., подтверждают адекватность бислойной модели мембран. К такому же выводу приводит и изучение наружного сегмента палочек сетчатки позвоночных, которые представляют собой упорядоченные диски.

Этот метод применим и для изучения искусственно упорядоченных систем, которые образуются при коллапсировании в условиях центрифугирования мембранных везикул, полученных из митохондрий и эритроцитов. Однако рентгеноструктурные данные, полученные для разных мембран, различаются лишь незначительно, несмотря на большие различия в содержании белка (от 20 до 80%). Хотя рентгеноструктурные данные позволяют получить некоторую информацию о том, как расположена в мембране основная масса мембранных белков (интегральных или периферических), в целом метод рентгеноструктурного анализа не дает детальной молекулярной картины.

В 1971 г. М. Уилкинс и соавторы показали, что метод дифракции рентгеновских лучей применим и для изучения водных дисперсий мембран и фосфолипидов. И в этом случае мембранные препараты, полученные из разных источников, дали сходную дифракционную картину, что подтверждает универсальность бислойной модели. Этот метод может быть весьма полезен при исследовании упорядоченных липидно-водных систем, но невозможность получения детальной молекулярной картины с его помощью ограничивает его использование для изучения биологических мембран.

### 5.2.2. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Просвечивающая электронная микроскопия тонких срезов миелина, как и многих других мембранных структур, выявляет характерную картину, состоящую из двух электроноплотных полос, разделенных промежутком около 80 Å. Такая картина получается в результате обработки мембранных препаратов четырехокисью осмия, обычно применяемой в этом методе. Дж. Робертсон назвал наблюдаемую картину «унитарной», чтобы подчеркнуть ее универсальность, и хотя молекулярные механизмы прокрашивания мембран осмием до сих пор не известны, эта структура долгое время рассматривалась как основное подтверждение справедливости бислойной модели мембраны.

Однако в этом методе есть существенный артефакт – при подготовке препаратов для анализа мембраны подвергаются неблагоприятным воздействиям. Обработка четырехокисью осмия приводит к значительной потере белка из эритроцитарной мембраны. И хотя наблюдаемая при этом трехслойная структура до некоторой степени отражает организацию бислойных мембран, более детальные сведения относительно локализации белков в мембране этим методом получить не удастся.

Некоторую информацию о расположении мембранных белков дали новые электронно-микроскопические методы, ставшие теперь уже классическими – методы замораживания-скалывания и замораживания-травления. В этом случае препараты быстро замораживают, не подвергая их каким-либо повреждающим действиям. Процесс подготовки препарата включает следующие операции (рис. 32):

1. После замораживания образец, представляющий собой суспензию клеток или мембран, скалывают с помощью ножа при низкой температуре ( $-100^{\circ}\text{C}$ ) в глубоком вакууме. При этом мембрана раскалывается по своей срединной области и расщепляется на две половинки. В результате на образовавшихся плоскостях скола обнажается внутренняя область мембраны.

2. При необходимости образец подвергают травлению – проводят обычную возгонку льда в вакууме. Это позволяет лучше визуализировать поверхностные структуры клеточных мембран.

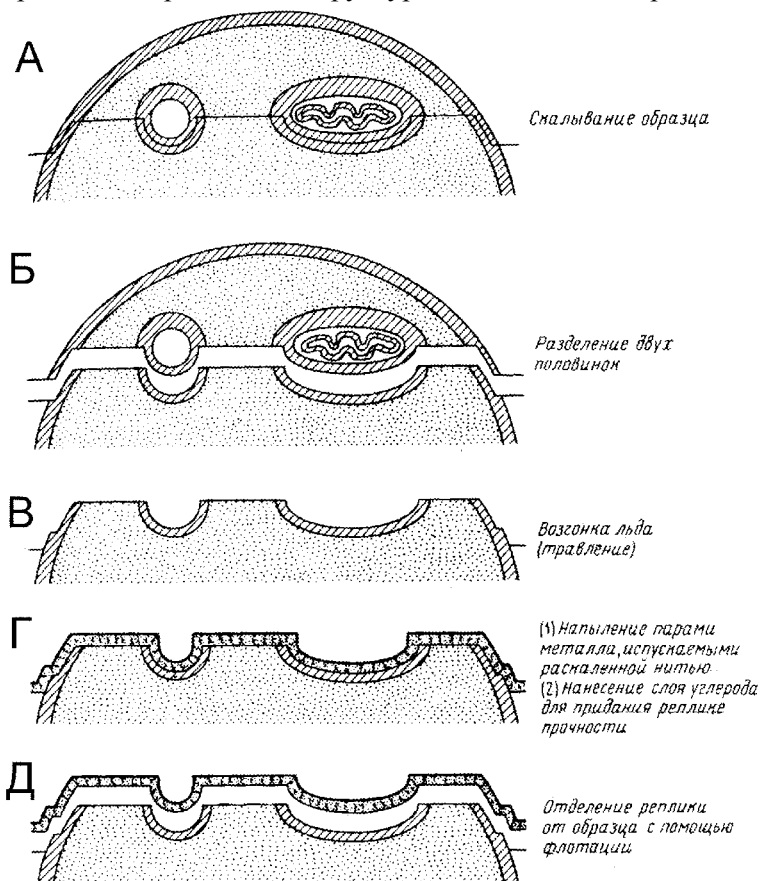


Рис. 32. Исследование мембран методом замораживания-скалывания

А – плоскость скола замороженной клетки частично проходит через центральную часть различных мембран. Б – разъединение двух половинок. В – образец подвергают травлению для выявления деталей поверхности слоя. Г – на образец напыляют слой платины, а затем слой углерода, получая реплику с поверхности образца. Д – эту реплику отделяют от препарата и исследуют под электронным микроскопом.



3. После этого получают так называемую реплику с обнаженной поверхности (именно эту реплику и исследуют под электронным микроскопом). Для получения реплики сначала напыляют на образец платину под углом около  $45^\circ$ , чтобы выявить топологические характеристики препарата. Затем платиновой реплике придают механическую прочность, нанеся на нее слой углерода. После этого препарат оттаивают, реплика всплывает и подвергается анализу.

Наиболее характерные структуры, наблюдаемые при изучении мембран методом замораживания – скалывания, – это многочисленные внутримембранные частицы диаметром от 80 до 100 Å, лежащие в плоскости мембранных сколов. Обычно они расположены хаотично, но иногда образуют группы. Вероятнее всего, эти частицы являются мембранными белками. При электронной микроскопии тонких срезов подобные структуры не обнаруживаются. Реплики, полученные от двух половинок расщепленной мембраны, не всегда топологически комплементарны. Это означает, что некоторые частицы связаны только с одной из половин мембраны. Данные, полученные методом замораживания-скалывания, широко использовались С. Сингером и Дж. Никольсоном при создании жидкостно-мозаичной модели мембран, поскольку они убедительно показывали, что глобулярные белки находятся не только на поверхности мембраны, но и внутри бислоя.

Кроме органелл, характерных для большинства клеток, имеются и специализированные мембранные системы, такие как саркоплазматический ретикулум мышечных клеток, миелиновая оболочка периферических нервных волокон, тилакоидные мембраны хлоропластов и мембраны дисков в палочках сетчатки. У прокариотических организмов также имеются мембраны, хотя и не настолько сложно устроенные, как у эукариотических организмов. Грам-положительные бактерии, например, *Bacillus subtilis*, имеют лишь цитоплазматическую мембрану, а грам-отрицательные бактерии (*Escherichia coli*) – еще и наружную оболочку, расположенную поверх тонкой пептидогликановой клеточной стенки. В клетках прокариот обнаружены также некоторые специализированные органеллы (в частности, хроматофоры, содержащие фотосинтезирующий аппарат у пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides*).

### **5.3. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ДИНАМИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ МЕМБРАННЫХ СИСТЕМ И ЛИПИД-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ**

Все биологические структуры по своей природе динамичны, и при рассмотрении их функций необходимо учитывать подвижность компонентов, из которых эти структуры состоят. Это относится к ферментам, полинуклеотидам и конечно, к мембранам. В жидкостно-мозаичной модели, в центре которой находится представление о подвижности мембранных компонентов, мембрана рассматривается как некое липидное море, в котором свободно плавают глобулярные белки, окруженные аннулярными липидами.

Динамическая подвижность мембранных компонентов связана с их биологическими функциями и является залогом их нормального функционирования. Необходимым условием протекания ферментативных процессов является свободная диффузия мембраносвязанных компонентов. Между шероховатым и гладким ЭР, аппаратом Гольджи и плазматической мембраной происходит быстрый обмен различными веществами, тем не менее, их состав и функции различаются. Чтобы понять суть этих и многих других биологических феноменов, необходимо прежде всего выяснить механизмы, управляющие динамической подвижностью мембран.

Что кроется за понятием «динамические свойства мембран»? Поперечная асимметрия в распределении липидов, а, возможно, и пассивная диффузия через бислой очевидным образом связаны со скоростью трансмембранного флип-флоп перехода липидов. Биогенез мембран зависит от скорости обмена липидов между различными мембранами. Скорость ферментативных реакций, протекающих с участием мембраносвязанных компонентов, зависит от скорости латеральной диффузии компонентов мембран. И, наконец, липидно-белковые взаимодействия зависят от скорости, с которой происходит обмен липидами между ближайшим окружением белков и остальным объемом мембраны.

Изучая процессы, протекающие в мембранных структурах, необходимо представлять их временные характеристики и одновременно временное разрешение методов, используемых для анализа. Для примера на рис. 33 приведено сопоставление некоторых химических и физических реакций в биологических мембранах с диапазоном скоростей, доступных для измерения с помощью распространенных методов.

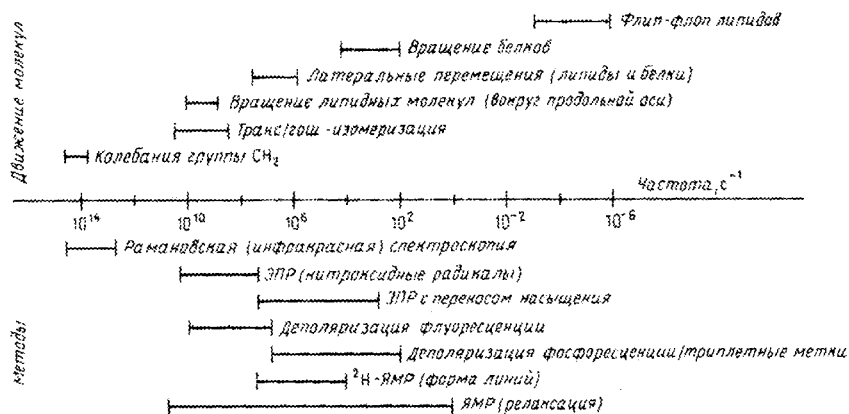


Рис. 33. Сравнение характерных частот движений мембранных белков и липидов с диапазоном чувствительности различных спектроскопических методов

Характерные времена равны величинам, обратным указанным частотам. Диапазон чувствительности методов указан приблизительно.

Временной диапазон разных форм подвижности, зафиксированных в мембране, весьма широк: от молекулярных колебаний с частотой порядка  $10^{14}$  сек<sup>-1</sup> до трансмембранного флип-флоп перехода липидов, характерное время которого может достигать нескольких часов. На рисунке в общем виде представлены некоторые из этих процессов, а также указаны временные пределы чувствительности различных биофизических методов. Видно, что одни методы позволяют получить статическую картину мембраны, поскольку характерное время соответствующих

движений больше, чем время измерения, а другие методы дают усредненную по времени картину, поскольку время перемещения молекул гораздо меньше, чем время измерения. Рассмотрим два основных типа экспериментов.

Первые основаны на использовании внутримембранных зондов для изучения микровязкости мембраны. Индикаторами физического состояния мембраны, а также характера липидно-белковых взаимодействий могут служить низкомолекулярные ЭПР-метки и флуоресцентные зонды.

Второй тип экспериментов направлен на прямое измерение латеральной диффузии мембранных белков или липидов и вращательной подвижности белков внутри бислоя. Исследовались также молекулярные взаимодействия в бислое, поскольку они влияют на динамику изучаемых молекул.

### *5.3.1. МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАН И ПРИМЕНИМОСТЬ МЕМБРАННЫХ ЗОНДОВ*

Для обычной жидкости, какой является, например, вода, текучесть определяется как величина, обратная вязкости – понятному и легко измеряемому физическому параметру. Вязкость характеризует трение, возникающее между соседними слоями жидкости, которые движутся с разными скоростями. Вязкость жидкости можно оценить, измерив скорость, с которой падает мраморный шарик в жидкой среде. В случае мембран термин «текучесть» обычно носит качественный характер: имеется в виду сопротивление, которое оказывает мембрана различным типам перемещений в ней.

Почему так важно определить микровязкость мембран? Как уже отмечалось, она играет важную физиологическую роль при адаптации различных организмов к внешним воздействиям. Подобные явления наблюдаются чаще всего при изучении термического стресса, когда микроорганизмы, растения, пойкилотермные или зимующие животные подвергаются воздействию низких температур. Адаптация заключается в изменении липидного состава мембран, а именно в увеличении содержания ненасыщенных липидов или уменьшении средней длины ацильной цепи. Подобные изменения ведут к уменьшению плотности упаковки липидов в мем-

бране и таким образом поддерживают микровязкость мембран на необходимом уровне. Так почему же все-таки так важна микровязкость мембран?

Обычно мембраны находятся в жидкокристаллическом состоянии, и, по-видимому, его поддержание очень важно для их функционирования. При переходе мембраны из жидкокристаллической фазы в фазу геля (более твердое состояние) микровязкость увеличивается. Структурные и функциональные свойства бислоя, находящегося в фазе геля, не совместимы с организацией и успешным функционированием белковых компонентов в мембране. При переходе мембраны из жидкокристаллической фазы в фазу геля микровязкость увеличивается примерно на два порядка. Как правило, для измерения текучести измеряют молекулярную подвижность спиновых или флуоресцентных зондов, включенных в мембрану. Зондами обычно являются небольшие молекулы, сравнимые по размерам с мембранными фосфолипидами. Некоторые из них представлены в таблице 8.

Следует указать моменты, существенные для интерпретации данных по движению зондов внутри мембраны.

Липидный бислой не является просто вязкой трехмерной жидкокристаллической структурой, а представляет собой жидкую среду с низкой вязкостью, у которой состав и динамические свойства в центральной области сильно отличаются от состава и свойств периферических полярных участков. Вращательная подвижность молекулы зонда в мембране не изотропна, как это имеет место в случае сферических частиц, не обладающих выделенной осью вращения, а до определенной степени ограничено. Часто зонды внутри мембраны имеют предпочтительную ориентацию и их движения ограничены определенными рамками. Локализация разных зондов в мембране зависит от их природы, так что подбирая зонды различной структуры, можно получать информацию от различных участков мембран. Например, зонд может быть связан с белковой молекулой или белковыми агрегатами, или располагаться внутри липидных кластеров, которые могут находиться в различных физических состояниях.

Таблица 8. Некоторые метки, используемые для изучения динамики мембран

<p><b>А. Флуоресцентные зонды</b></p> <p><i>Дифенилгекса триен (ДФГ)</i></p> <p>(a) транс-Паринаровая кислота</p> <p>(б) цис-Паринаровая кислота</p> <p>(т, л) Антроцистеариновая кислота</p> <p>NBD-фосфатидилэтаноламин (NBD-PE)</p> <p>NBD-фосфатидилхолин</p> <p>1-<i>dan</i>IC<sub>18</sub>(3)</p>	<p><b>Б. Триплетная метка для мембранных белков</b></p> <p><i>Дозинналицид</i></p> <p><b>В. Спиновые метки</b></p> <p>ТЕМРО</p> <p>Спин-меченные фосфолипиды, например</p> <p>Спин-меченные жирные кислоты, (т, л) жирная кислота</p> <p>Спин-меченный холестерол (пирролидинхолестерол)</p>
---	--

В таблице 8 приведены структурные формулы некоторых зондов, используемых при измерении динамических свойств мембран. Для оценки микровязкости мембран определяют специфические параметры ЭПР спектров. К таким параметрам относятся:

- время вращательной корреляции спиновых меток,  $\tau$  (аналогичную величину можно рассчитать и для флуоресцентных зондов);
- параметр упорядоченности (S);
- стационарная анизотропия флуоресцентных зондов;
- коэффициент распределения молекул зонда между гидрофобной и гидрофильной фазами.

Ясно, что микровязкость мембраны, оцененная только по одному параметру, не может служить достаточно полной характеристикой физического состояния мембраны. И все же измерение отдельных параметров весьма полезно, особенно для характеристик из-

менений физического состояния мембраны, обусловленных, например, изменениями температуры, давления, внедрением в бислой холестерина, изменения фосфолипидного состава бислоя или ионного состава среды. Воздействия, приводящие к уменьшению площади, приходящейся на одну липидную молекулу (увеличение гидростатического давления, понижение температуры или добавление холестерина к фосфолипидам в жидкокристаллическом состоянии), вызывают увеличение микровязкости. Это согласуется с теорией свободного объема, согласно которой микровязкость и плотность связаны между собой. Действительно, чем более плотная упаковка характерна для мембраны, тем в большей степени ограничивается подвижность зонда.

Рассмотрим 3 метода: электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), метод деполяризации флуоресценции, которые позволяют измерять как скорость движения зонда, так и сопротивление этому движению, и метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Необходимо иметь представление о том, что именно измеряется с помощью мембранных зондов. Рассмотрим общий случай, который применим к ЭПР, измерению флуоресценции или  $^2\text{H}$ -ЯМР. Все три спектроскопических метода чувствительны к ориентации молекул зондов. Спектр  $^2\text{H}$ -ЯМР чувствителен к ориентации связи C-D (углерод - дейтерий) относительно приложенного поля. Градиент локального поля, векторно суммируясь с внешним полем, дает результирующую, которая и улавливается дейтерием. Аналогичная ситуация характерна и для ЭПР. Спектр ЭПР зависит от ориентации нитроксильной связи N-O, которую содержат большинство обычно используемых зондов (табл. 8), относительно приложенного магнитного поля. В случае флуоресцентной спектроскопии измеряемая поляризация испускаемого света зависит от ориентации дипольного момента перехода относительно направления, определяемого используемым поляризатором.

### *5.3.2. ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС (ЭПР)*

Принцип парамагнитного резонанса был открыт в 1944 г. профессором Е.К. Завойским. Как метод исследования подвижности (упорядоченности) макроструктур он стал применяться лишь

после разработки способа создания стабильных парамагнитных соединений, содержащих нитроксидный радикал, впервые синтезированных Э.Г. Розанцевым.

Неспаренный электрон атома азота стабильного парамагнитного соединения (спинового зонда или спиновой метки – разница между ними в том, что молекулы первого типа свободно плавают в мембране, а второго – ковалентно связаны с ее компонентами; разграничения между ними часто игнорируются в американской научной литературе, хотя выдерживаются в русской и английской научной периодике) при наложении сильного магнитного поля переходит с одного энергетического уровня на другой под действием микроволнового излучения (около  $10^{10}$  Гц). Метод довольно чувствителен: спектр зонда может быть зарегистрирован при концентрации спиновых меток около  $10^{-6}$  М. Спектр ЭПР представляют в виде первой производной от спектра поглощения (рис. 34).

В спектре нитроксильного радикала имеются три пика, отвечающие спин-спиновым взаимодействиям неспаренного электрона и ядра атома азота. Как уже было отмечено, спектр ЭПР зависит от ориентации молекулы – спиновой метки или спинового зонда, содержащих нитроксильный радикал, относительно приложенного магнитного поля. Введение такого радикала позволяет использовать ЭПР-спектроскопию для характеристики упорядоченности вращательной или поступательной подвижности спиновой метки или спин-меченых молекул в разных условиях.

Подвижность, описываемая этим методом, характеризуется так называемым временем вращательной корреляции, которое находится в пределах  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  сек (от нескольких нсек до 0,1 нсек) для свободного вращения метки. Примеры ЭПР спектров приведены на рис. 34. Характер спектра зависит от характера вращения молекулы. На рисунке приведены спектры для разных случаев – от свободного вращения до полной заторможенности. Уже упоминалось, что характеристикой спиновых меток является *время корреляции* ( $\tau$ ). Время корреляции рассчитывают в предположении, что вращательное движение молекулы изотропно, используя параметр высоты пиков. Если спиновые метки – производные жирных кислот или фосфолипидов, – то они, конечно, не вращаются изотропно, и



в этом случае *параметр упорядоченности S* рассчитывается исходя из величины расщепления между линиями спектра. Предположив, что такие молекулы имеют форму жесткого стержня, можно из величины параметра *S* оценить максимальное отклонение зонда от нормали к поверхности мембраны. И время корреляции, и параметр упорядоченности позволяют получить полуколичественное представление о свойствах мембраны. Спиновая метка может быть введена в разнообразные соединения, локализацию которых в мембране легко предсказать, поэтому этим методом можно оценивать подвижность и взаимодействие разных компонентов мембраны.

ЭПР-спектроскопия позволяет измерять плотность упаковки бислоя. Спин-меченые жирные кислоты, содержащие нитрокисильную группировку на разном расстоянии от полярной  $\text{COOH}$ -группы, встраиваясь в бислой, ориентируются в поперечном направлении. Вид ЭПР спектра этих меток зависит от глубины погружения спиновой метки внутрь бислоя. С помощью спиновых меток можно оценить скорость вращательной корреляции и, соответственно, подвижность жирнокислотных цепей на разной глубине бислоя. Результаты измерения степени упорядоченности спиновых меток, фиксированных в мембране на разной глубине, свидетельствуют о росте неупорядоченности в направлении

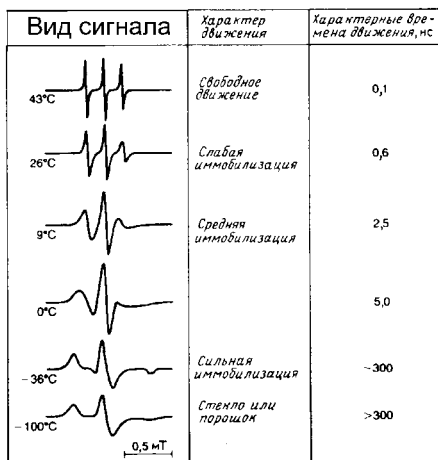


Рис. 34. Зависимость ЭПР-спектров нитрокисильной спиновой метки от скорости молекулярного вращения

Спектры, представляющие собой первую производную сигнала, получены при разных температурах и, следовательно, при разной вязкости среды.

от поверхности мембраны к ее центральной части. Во многих исследованиях проводилось сравнение микровязкости мембран, которую определяли по данным о величинах  $\tau$  и  $S$  при различных возмущающих воздействиях.

Метод ЭПР-спектроскопии требует специального оборудования, хотя сами измерения высоко автоматизированы. Использование этого подхода широко и разнообразно. В то же время, этот метод имеет определенные ограничения. Высокие концентрации спиновых зондов модифицируют бислой, а ковалентные метки, связываясь с белками, могут инактивировать их. В результате исследователь изучает мембрану не в нативном состоянии, а в том виде, который она принимает после модификации, хотя надо сказать, что это артефакт не только данного метода. Кроме того, надо иметь в виду, что скорости процессов, описываемых с помощью метода ЭПР, много больше тех, которые лежат в основе функционирования мембранных ферментов.

### *5.3.3. ДЕПОЛЯРИЗАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ*

Для измерения вращательной диффузии молекул давно используется метод деполяризации флуоресценции. Вращение некоторых зондов в мембранах часто сравнивают с их вращением в маслах с известной вязкостью, при этом пользуются понятием «микровязкость». Суть метода состоит в том, что образец облучают поляризованным светом, который будет предпочтительно возбуждать молекулы, имеющих такую же ориентацию дипольного момента. Испускаемый свет анализируют с помощью поляризаторов. Микровязкость бислоя весьма высока (соответствует величинам 1–10 пуаз), поэтому время вращательной корреляции небольших флуоресцентных (ДФГ) и ЭПР-зондов составляет  $10^{-8}$ – $10^{-9}$  сек. В воде, имеющей вязкость 0,01 пуаз, молекулы такого размера вращались бы по крайней мере в 100 раз быстрее. Методы ЭПР и деполяризации флуоресценции регистрируют быстрые процессы, совершающиеся за времена порядка  $10^{-8}$  сек, а информация о более медленных движениях ускользает от наблюдения.

Мембранные белки имеют значительно большие размеры, чем упомянутые метки, и поэтому вращаются гораздо медленнее. Чтобы метки, пришитые к этим белкам, были чувствительны к их вращению, их время жизни в возбужденном состоянии должно составлять порядка  $10^{-3}$  сек. Следовательно, методы, применимые для изучения вращения белков в бислое, должны быть способны регистрировать времена корреляции от  $10^{-5}$  до  $10^{-3}$  сек. Метод деполяризации флуоресценции, как мы отмечали, в этом случае непригоден, поскольку время жизни молекул в возбужденном состоянии составляет около  $10^{-8}$  сек, и в таком временном масштабе молекулы белков представляются неподвижными. Для получения такой информации могут успешно использоваться следующие 3 метода.

1) К исследуемому белку присоединяют зонд, время жизни которого в возбужденном триплетном состоянии достаточно велико. Если метка жестко связана с белком, то для регистрации вращения белка можно использовать измерение анизотропии фосфоресценции. Для таких измерений оказались пригодными производные эозина, поскольку время жизни эозина в триплетном состоянии составляет примерно 2 мсек. Эксперимент состоит в определении характерного времени затухания анизотропии фосфоресценции.

2) В том случае, когда сами молекулы белка содержат группы, переходящие при флэш-фотолизе в долгоживущее возбужденное состояние, параметры можно оценить с помощью дихроизма поглощения. В качестве примера можно привести родопсин и бактериородопсин, где используются возбужденное состояние связанного ретиналя и возбужденные состояния, наблюдающиеся при фотолизе комплексов цитохром-СО с использованием цитохром *c* оксидазы и цитохрома  $P_{450}$ . Измерения можно проводить *in situ* (например, в составе митохондриальных мембран) или с очищенным белком, встроенным в фосфолипидные везикулы.

3) С помощью обычной ЭПР-спектроскопии не удастся регистрировать вращения, характерная частота которых равна частоте вращения мембранных белков. Для этих целей разработан специальный метод – ЭПР с переносом насыщения, диапазон чувствительности которого очень широк – от  $10^{-7}$  до  $10^{-3}$  сек. Этот метод применялся

при изучении вращения нескольких мембранных белков с ковалентно-пришитыми к ним спиновыми метками.

Недавно предложен модифицированный метод деполяризации флуоресценции. В его основе лежат те же принципы, что и в основе метода деполяризации флуоресценции, но используется другая молекулярная модель движения, вызывающего деполяризацию. К исследуемому белку присоединяют зонд с достаточно большим временем жизни в возбужденном состоянии. Если система гетерогенна, могут возникнуть определенные трудности с количественным расчетом. Аналогичные ограничения возникают и в тех случаях, если метка может свободно вращаться на поверхности белка или если у белковой молекулы имеются гибкие сегменты.

Интегральные мембранные белки характеризуются широким спектром времен вращательной релаксации. На одном конце временной шкалы находится родопсин, который, по-видимому, свободно вращается в мембране наружного сегмента палочки сетчатки, а на другом – бактериородопсин, который образует в пурпурной мембране упорядоченную кристаллическую решетку и неподвижен. Мембранные белки способны к заметному вращению в плоскости мембраны, и скорость этого вращения согласуется с величиной, ожидаемой исходя из простой гидродинамической модели.

#### *5.3.4. ЯДЕРНО-МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС (ЯМР)*

В основе ЯМР-спектроскопии лежит поглощение электромагнитных волн в радиочастотном диапазоне ядрами, обладающими магнитным моментом. Наиболее часто в исследованиях используются ядра  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ . Детальную картину строения гидрофобной области липидного бислоя удалось получить с помощью метода  $^2\text{H}$ -ЯМР. Атомы водорода в определенных местах липидной молекулы можно избирательно заменить дейтерием. Это мягкий способ зондирования мембран. Считается, что он, как правило, не вносит возмущений в их структуру. Спектры некоторых дейтерированных димиристоилфосфатидилхолинов представлены на рис. 36.

Структура ЯМР спектров определяется временем жизни различных спиновых состояний, величиной диполь-дипольного взаимодействия между данным ядром и соседними ядрами, неоднородностью магнитного поля и т. д. Характерным параметром ЯМР-спектров является величина химического сдвига  $\delta$ . Иногда для анализа используют время релаксации  $\tau$ , которые связаны соотношением:  $\delta = 10 - \tau$ .

Пики ЯМР лежат в радиочастотном диапазоне, а различия в частотах сигналов для разных изотопов намного превышают ширину сигнала поглощения. Спектры ЯМР малых молекул хорошо разрешимы. Так, спектр ЯМР молекулы холестерина позволяет идентифицировать резонанс каждого атома в отдельности и получить информацию о подвижности различных участков молекулы в зависимости от ее

окружения. Кроме параметра химического сдвига —  $\delta$  рассчитывается параметр  $T_1$ , характеризующий процесс продольной (спин-решеточной) релаксации, который прямо пропорционален увеличению подвижности отдельных атомов.

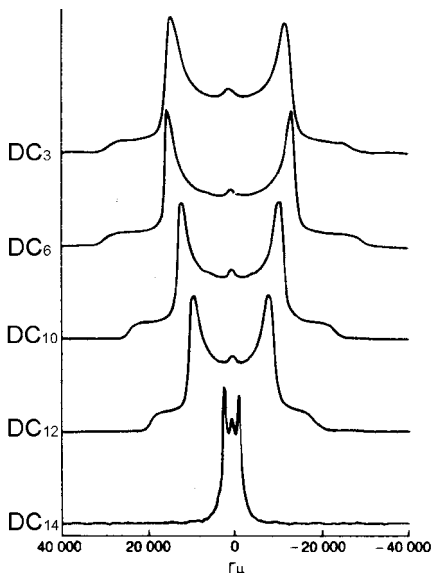


Рис. 35. Спектры  $^2\text{H}$ -ЯМР димиристоилфосфатидилхолина, дейтерированного по разным положениям ацильной цепи

Числа слева обозначают положение двух (или трех) атомов дейтерия в каждой цепи. Спектр образца с дейтерированной концевой метильной группой гораздо уже всех остальных приведенных спектров, что указывает на значительную неупорядоченность центральной области бислоя.

$T_1$	Структурная формула фосфолипида	
3,3	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
1,8	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>
1,1	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>
0,6	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>
0,2	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>
0,1	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>
	C=O	C=O
	O	O
0,1	CH <sub>2</sub> —	CH — CH <sub>2</sub>
		O
		—O—P=O
		O
0,3		CH <sub>2</sub>
0,3		CH <sub>2</sub>
0,7		N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>

Рис. 36. Величины подвижности  $T_1$  для различных атомов углерода в молекуле фосфатидилхолина в составе мембраны при температуре выше критической (рассчитаны по данным ЯМР-спектроскопии)

Метод ЯМР позволяет с высокой избирательностью получить сведения о поведении разных частей молекулы. Например, на рис. 36 указаны значения  $T_1$  для отдельных атомов углерода в молекуле фосфатидилхолина. Увеличение  $T_1$  соответствует возрастанию подвижности С-С-связей от поверхности мембраны к атомам, приближенным к середине бислоя.

В литературе часто используется *параметр упорядоченности*  $S$ , который отражает усредненную ориентацию вектора С-D-связи. Колебательные и вращательные движения молекулы, которые влияют на ориентацию С-D-связи в бислое в целом, происходят с достаточно большой скоростью ( $>10^6$  с<sup>-1</sup>), так что лю-

бой атом дейтерия воспринимает единое усредненное магнитное окружение.

Это окружение зависит от соседних атомов, а также от ограничений движения по типу и амплитуде. Например, определены параметры упорядоченности для

нескольких селективно дейтерированных фосфолипидов, в которых атом дейтерия включен в определенные метиленовые группы

sn-1-пальмитоильного остатка. Исследовались как липидные бислои, так и природные мембраны, находящиеся в жидкокристаллическом состоянии, поскольку в случае фазы геля спектры сильно уширяются из-за плотной упаковки липидов и поэтому с трудом поддаются анализу.

Сопоставление результатов различных опытов позволяют сделать два вывода: метиленовые группы в средней части бислоя значительно более разупорядочены, чем группы вблизи его на поверхности; и для синтетических липидов разных типов, включая фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и сфингомиелин, а также для биологических мембран, содержащих дейтерированные зонды профили параметра упорядоченности идентичны. Таким образом, характер упорядоченности бислоя мало зависит от химического строения липида и от состава мембраны, если бислоем находится в жидкокристаллическом состоянии.

При переходе к более крупным молекулам спектры ЯМР сильно усложняются и зачастую становятся неразрешимыми. Так, ЯМР-спектроскопия белков в лучшем случае может позволить охарактеризовать состояние (лабильность) отдельных групп молекулы, например, окружение фосфолипидного радикала в активной группе трансфераз. Другим недостатком ЯМР-спектроскопии является довольно низкая чувствительность – концентрация образца должна быть не менее  $10^{-3}$  М (что довольно много), в то время как оптические методы позволяют получить информацию о молекулах, концентрация которых составляет  $10^{-6}$ – $10^{-7}$  М.

Сопоставление подвижности жирнокислотных цепей в бислое, рассчитанное разными способами, вскрывает различия между методами ЭПР- и ЯМР-спектроскопии (рис. 37). Судя по результатам измерений спектров ЭПР можно заключить, что упорядоченность возрастает, а подвижность соответственно падает монотонно в направлении от эфирной связи к метильному концу молекулы. ЯМР-спектроскопия показывает, что область, примыкающая к сложноэфирной связи, характеризуется определенной жесткостью, и снижение упорядоченности наступает при движении по жирнокислотной цепи к метильному концу, начиная с  $C_6$ -атома. Причина различий в оценке подвижности фосфолипидов в мембране, выявляемых при сравнении этих двух методов,

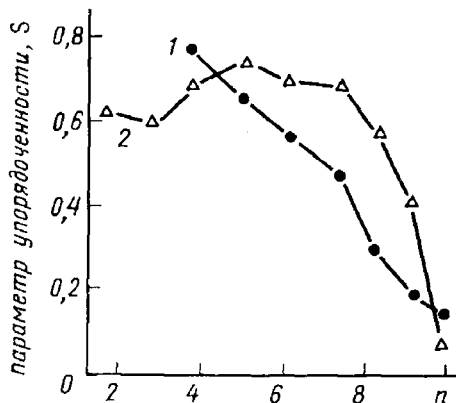


Рис. 37. Зависимость параметра упорядоченности  $S$  от положения метки в ацильном хвосте спин-меченой декановой кислоты

1 – по результатам ЭПР, 2 – по данным ЯМР-спектроскопии ( $n$  – положение метки у атома углерода, начиная от карбоксильной группы).

вероятно, заключается в том возмущающем влиянии, которое спиновые зонды оказывают на упаковку бислоя. Кроме того, временные характеристики подвижности, измеряемые методами ЭПР- и ЯМР-спектроскопии, также различаются.

Несмотря на то, что для изучения мембранных белков ЯМР-спектроскопия оказалась не столь эффективна, этот подход часто используют как немодифицирующий метод изучения мембранных структур. Столь же перспективны и другие немодифицирующие методы: кругового дихроизма и сканирующей калориметрии.

### 5.3.5. МЕТОД КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА

Метод *кругового дихроизма* позволяет выяснить, какой тип вторичной структуры преобладает в мембранных белках. Величина кругового дихроизма, характеризующаяся обычно эллиптичностью, представляет собой разницу в поглощении образцом право- и лево-поляризованного света. Она объясняется различиями в коэффициентах молярной экстинкции право- и лево-поляризованного по кругу света. При интерпретации спектров кругового дихроизма возникают некоторые трудности, которые связаны, в основном, с неомогенностью мембранных суспензий, обуславливающей сглаживание спектральных кривых.



На первый взгляд представляется, что доля спиральных участков в молекуле белка – не самый информативный параметр. Но с помощью этого метода можно выяснить, осуществляется ли прямое влияние на мембранные структуры внешних факторов, если это влияние изменяет спирализацию белковых молекул. Это изменение часто имеет место в тех случаях, когда наблюдается собственный конформационный сдвиг в молекуле белка или есть взаимодействие молекул белка друг с другом, которое изменяет их конформацию.

### 5.3.6. МЕТОД СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ

Принцип метода *дифференциальной сканирующей калориметрии* состоит в измерении тепла, необходимого для увеличения температуры объекта на очень малую величину при непрерывном повышении температуры объекта. При работе с липидами мембран изменение их фазового состояния также может сопровождаться поглощением или выделением тепла. Чем выше значение поглощенного тепла, тем более значительная молекулярная реорганизация происходит в образце при этих условиях. Таким образом, изменения конформации макромолекул можно измерять, регистрируя тепло, выделяемое или поглощаемое при конформационных переходах.

Почему метод называется дифференциальным? Потому что для нахождения теплоты фазового состояния вещества необходимо из регистрируемого поглощения (или выделения) системой тепла вычесть тепло, поглощаемое (или выделяемое) ею в отсутствии фазовых переходов, – собственную теплоемкость.

Современные чувствительные калориметры позволяют измерять фазовые переходы в водно-липидных дисперсиях. Применение этого метода для исследования простых искусственных систем (мицеллы, везикулы, бислои которых организованы из фосфолипидов заданного вида) дало ценную информацию о принципах организации бислоя.

Было обнаружено, что в бислоях индивидуальных фосфолипидов критическая температура ( $T_{\text{кр}}$ ) для фазового перехода занимает доли градуса.

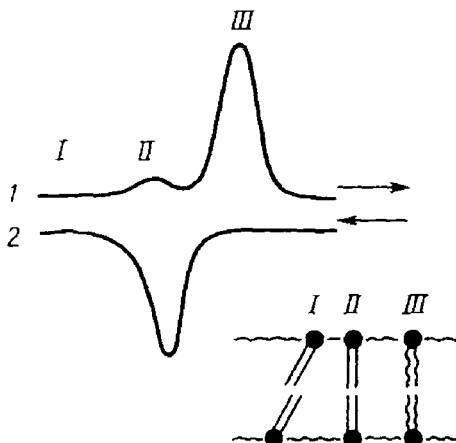


Рис. 38. Схематическое изображение гелеобразного (I), переходного (II) и жидкокристаллического (III) состояния бислоя в ходе изменения температуры

Термограммы характеризуют переход между этими состояниями при увеличении (1) и уменьшении (2) температуры.

В смеси различных фосфолипидов область фазового перехода занимает 1–2 градуса. Некоторые фосфолипиды плохо смешиваются друг с другом, например, если их жирнокислотные цепи отличаются по длине более, чем на 4 атома углерода. Не смешиваются также глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды: пики, характеризующие их фазовые переходы, регистрируются на термограммах отдельно. Добавление к таким образцам холестерина способствует образованию фазы со смешанными свойствами, при этом фазовый переход уже не является. В фосфолипидах смешанного состава, образующих одну фазу, величина  $T_{кр}$  представляет собой характеристику этой смеси.

На величину  $T_{кр}$  влияют длина жирнокислотных цепей в молекуле (чем больше атомов углерода в жирнокислотном радикале, тем выше температура перехода) и степень ее гидратации. Обводнение бислоя снижает температуру фазового перехода. Анализ термограмм некоторых фосфолипидов выявляет перед наступлением области фазового перехода так называемый *предпереход* (рис. 38). В настоящее время считают, что предпереход вызван образованием складок бислоя, выявляющихся при изменении объема, занимаемого каждой молекулой, толщины бислоя и связывания молекул воды с его компонентами. При охлаждении образца состояния, соответствующие предпереходу, не обнаруживаются (рис. 38).

Термограмма нагревания мембранных образцов отличается от термограммы их охлаждения. Это явление носит название *гистерезиса* липидных систем и объясняется «памятью» липидов. Одна из причин такой памяти заключается в неодинаковой энергии гидратации и дегидратации липидного бислоя.

Для нативных мембран ценность метода дифференциальной сканирующей калориметрии ниже, чем для искусственных систем. Высокое содержание холестерина в плазматических мембранах не позволяет выявить отчетливых изменений теплопродукции в области фазовых переходов. В случае внутриклеточных мембран фазовые переходы не обнаруживаются по другой причине – эти мембраны оказываются достаточно «жидкими» в приемлемом интервале температур (5–60°C).

### 5.3.7. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Световая волна, сталкиваясь с молекулой какого-либо вещества, либо рассеивается (изменяет направление движения), либо поглощается (передает свою энергию молекуле). При этом молекула переходит в возбужденное состояние. Энергия, поглощенная молекулой, может рассеяться в виде тепла (в результате столкновения с другими молекулами) или излучиться в виде света. Какое именно событие из указанных здесь будет иметь место, – определяется состоянием молекулы в момент столкновения. Возбужденные электроны возвращаются на основной уровень двумя путями: либо испуская свет, либо с помощью безизлучательного перехода. В первом случае испускаемый свет обладает меньшей энергией и большей длиной волны (так называемый Стоксов сдвиг), так как часть энергии теряется.

Эффективность флуоресценции (вероятность излучательного перехода) характеризуется квантовым выходом  $\Phi$ , равным отношению числа излученных фотонов к числу поглощенных. Величину  $\Phi$ , как и Стоксов сдвиг, определяют и внутренние, и внешние факторы. Например, в случае *транс*-изомеров в несколько раз выше, чем в случае *цис*-изомеров флуоресцирующих молекул. К числу внешних факторов относится столкновение с молекулой тушителя

(*динамическое тушение*) или образование комплекса флуоресцентной молекулы с тушителем (*статическое тушение*).

Первый процесс (излучательный переход) зависит от вязкости среды и может быть использован для ее измерения. Тушителями флуоресценции являются *тяжелые анионы или катионы* ( $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), парамагнетики ( $\text{Mn}^{2+}$ , нитроксильные радикалы). Кроме того, наблюдается тушение флуоресценции в полярных растворителях, например, в воде.

Второй случай – безызлучательный переход в основное состояние – происходит, если наиболее высокий колебательный подуровень основного состояния имеет приблизительно ту же энергию, что и низкий колебательный уровень возбужденного состояния. Такой переход характерен для «гибких» молекул. У «жестких» молекул, содержащих ароматические кольца, чаще всего наблюдается излучение части поглощенной энергии. Переход молекулы в возбужденное состояние сопровождается изменением дипольного момента молекулы. Это в свою очередь поляризует электронные оболочки окружающих молекул, что приводит к смещению атомов и переориентации молекул. Затрата энергии на эти процессы и приводит к сдвигу в длинноволновую область спектра. Стоксов сдвиг будет тем больше, чем больше: 1) изменение дипольного момента молекулы при возбуждении, 2) время жизни молекулы в возбужденном состоянии, 3) поляризуемость окружающих молекул.

В некоторых случаях возбужденная молекула, сталкиваясь с идентичной невозбужденной молекулой, образует комплекс – *эксимер*. При этом из плоских молекул возникают структуры типа сэндвича, которые стабилизированы переносом заряда от одной молекулы к другой. На перенос заряда тратится часть энергии поглощенного кванта, поэтому эксимер флуоресцирует в более длинноволновой области. *Степень эксимеризации* зависит от концентрации хромофора, температуры и вязкости окружающей среды.

Распространенным флуоресцентным зондом, используемым для измерения микровязкости мембран по легкости его эксимеризации, является пирен (рис. 39). Пирен концентрируется в гидрофобных компартментах мембраны, располагаясь между жирнокислотными цепями липидов. Его эксимеризация пропорциональна

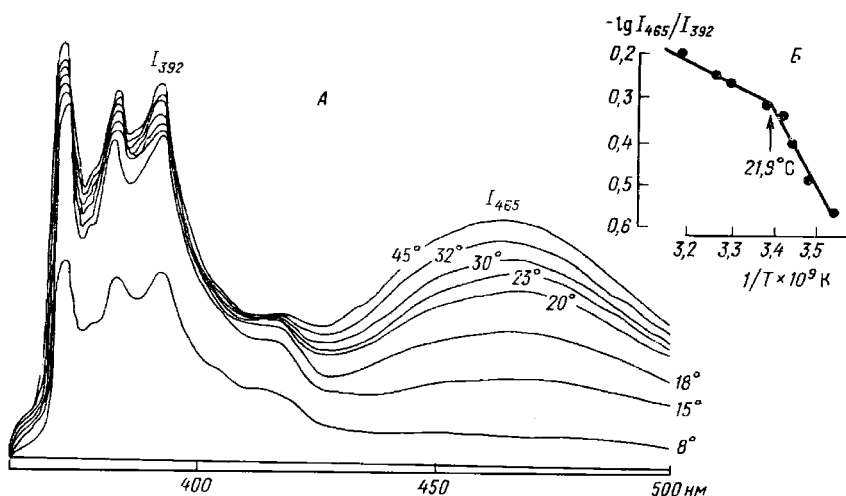


Рис. 39. Спектры флуоресценции пирена в мембранах микросом почек при разных температурах с указанием максимума флуоресценции мономерной ( $I_{392}$ ) и эксимерной ( $I_{465}$ ) форм (А) и график Аррениуса для эксимеризации пирена в исследуемом образце (Б)

Область перегиба на графике соответствует температуре фазового перехода.

подвижности молекул в бислое, поэтому при прочих равных условиях и неизменной концентрации пирена величина эксимеризации может служить характеристикой микровязкости мембраны.

Понижение температуры увеличивает микровязкость бислоя, ограничивает подвижность молекул пирена и снижает уровень его эксимеризации. При возрастании температуры подвижность жирнокислотных цепей в сердцевине бислоя возрастает, увеличивает-ся и вероятность встречи молекул пирена. Изучение зависимости эксимеризации пирена в мембранах от температуры (или других факторов) позволяет выяснить относительную микровязкость мембранных структур и выявить область критических температур, при которых наблюдается фазовый переход в мембранах.

Тушение флуоресценции иногда представляет собой результат дальней безызлучательной передачи (так называемого резонансного переноса) энергии. В этом случае система содержит два флуоресцирующих хромофора, причем спектр испускания одного из них (донора) должен перекрываться со спектром поглощения другого (акцептора). При наличии переноса энергии интенсивность флуоресценции донора снижается, а акцептора – увеличивается. Эффективность переноса зависит от дистанции между донором и акцептором, и это явление может быть использовано для определения расстояния между определенными группами в мембране с помощью своеобразной «спектроскопической линейки». Такой «линейкой» может являться пирен. С его помощью можно измерить упорядоченность аннулярного слоя липидов и оценить характер межбелковых взаимодействий в мембране.

Область возбуждения пирена перекрывается с областью испускания *триптофанильных радикалов* белка (330–335 нм). Если мембранные белки содержат триптофанильные радикалы и обладают собственной флуоресценцией, частично она будет тушиться теми молекулами пирена, которые могут подойти к белковым хромофорам на расстояние радиуса Ферстера (15–20 Å). Следовательно, освещая пробу в области возбуждения триптофанильных остатков (280 нм) и исследуя тушение белковой флуоресценции и возгорание флуоресценции пирена, можно оценить доступность белку той порции пирена, которая локализуется в аннулярном слое. Образование белковых ассоциатов, сопровождающееся снижением доли аннулярных липидов вследствие их вытеснения из области межбелковых контактов, будет защищать собственную флуоресценцию триптофанильных радикалов белка от тушения пиреном и также может быть выявлено и количественно выражено с помощью этого метода.

## 6. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

### 6.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТНЫХ ПРОЦЕССОВ

Одна из наиболее существенных функций биологических мембран – обеспечение избирательной проницаемости для веществ, транспортируемых в процессе жизнедеятельности как из клетки в среду, так и из среды во внутреннее пространство клетки. Отдельные части живой системы, разделенные мембраной, будь то разные клетки или отдельные компартменты внутриклеточной среды, функционируют как открытые системы. С помощью транспортных систем осуществляется регуляция объема клеток, величины рН и ионного состава цитоплазмы.

Среди многообразных явлений, протекающих в клетке, важное место занимают активный и пассивный транспорт веществ, осмос, фильтрация и *биоэлектрогенез*. Благодаря транспортным системам клетки накапливают метаболиты, важные для обеспечения энергетического цикла и метаболических процессов, выводят в окружающую среду токсические вещества, а также создают разность потенциалов на мембране. В настоящее время очевидно, что все эти явления так или иначе определяются барьерными свойствами клеточных мембран.

В зависимости от потребностей клетки транспорт веществ осуществляется или по или против концентрационного градиента. Способ проникновения через мембрану в значительной степени определяется свойствами вещества. Низкомолекулярные нейтральные вещества, такие, как газы, вода, аммиак, глицерин и мочевины, свободно диффундируют через биомембраны. Однако с увеличением размера молекулы теряют эту способность. К примеру, клеточные мембраны непроницаемы для глюкозы и других сахаров. Проницаемость биомембран зависит также от полярности веществ. Неполярные вещества, такие, как бензол, этанол, диэтиловый эфир и многие наркотики, способны проникать в клетку в результате диффузии. Напротив, для гидрофильных, особенно заряженных веществ, мембрана непроницаема. Однако во многих случаях именно такие вещества необходимы для функционирования клетки, поэтому в живых

системах эволюционно сформировались специализированные транспортные системы для переноса таких веществ через мембрану.

Выделяют 5 разновидностей мембранного транспорта: 1) пассивная диффузия; 2) облегченная диффузия; 3) первично-активный транспорт; 4) вторично-активный транспорт; 5) механизм, сопряженный с изменением структурной целостности мембран (рис. 40).

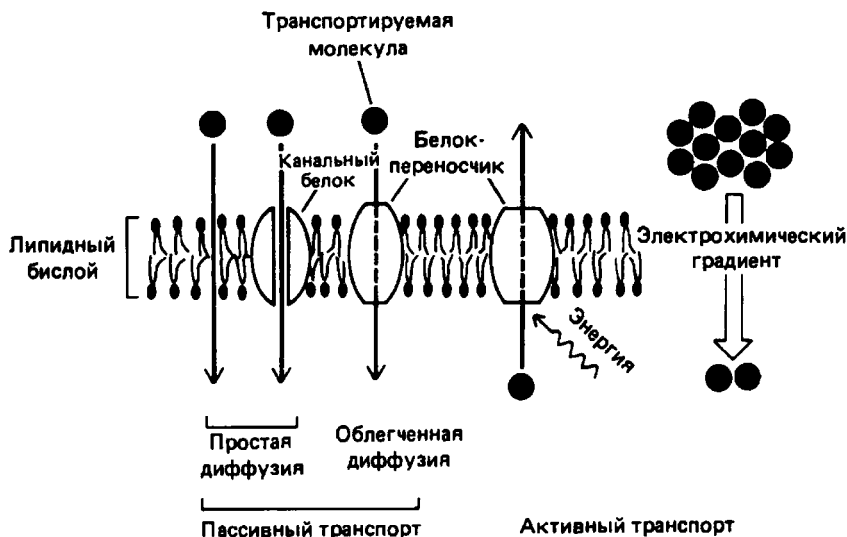


Рис. 40. Виды активного и пассивного транспорта через биологическую мембрану

Перенос веществ через биологические мембраны осуществляется с помощью различных механизмов и протекает в основном без нарушения структурной целостности мембран. Если транспорт сопровождается уменьшением свободной энергии, он протекает самопроизвольно и называется пассивным. *Пассивный транспорт* (пассивная или облегченная диффузия) происходит по направлению градиентов химического электрохимического) потенциала, результатом чего является уменьшение градиентов концентраций, если нет других процессов, которые обеспечивают их поддержание на постоянном уровне.



Кроме указанных видов транспорта в мембране имеют место также процессы, не связанные со специфическими структурами. К таковому относится еще один вид транспорта. *Неспецифическая диффузия* является процессом, не связанным со специфическими структурами – она осуществляется благодаря физико-химическим свойствам липидного бислоя. Объяснение механизма неспецифической диффузии через биологические мембраны малых молекул, таких как диметилформамид, вода или гидрофобные молекулы метанола, основано на представлении о динамических свойствах бислоя. Полагают, что малые молекулы могут достаточно быстро проникать через бислой вместе с кинками, возникающими в области дефектных зон в структуре бислоя. Такие короткоживущие мигрирующие образования нельзя считать порами, поскольку они не требуют специальных белковых образований. Неспецифическая диффузия осуществляется без участия специальных механизмов: вещества проникают через мембрану благодаря наличию *кинков* (от англ. kink – петля) или в области мембранных дефектов. Вследствие теплового движения хвостов молекул фосфолипидов кинки могут перемещаться поперек мембраны и переносить попавшие в них мелкие молекулы, в первую очередь, молекулы воды.

Облегченная диффузия требует для своего протекания наличия белков – порообразователей или переносчиков. Такими переносчиками служат антибиотики-каналоформеры (они различаются по специфичности: валиномицин высокоспецифичен для калия, иономицин – для кальция, грамицидин относительно мало специфичен для натрия) или белки порины, образующие поры для воды в наружной клеточной мембране (аквапорины) или в мембранах митохондрий (через них могут проникать даже низкомолекулярные белки).

*Активным транспортом* называют процесс переноса веществ или ионов против их концентрационных градиентов, который так или иначе обеспечивается энергией метаболических процессов. Активный транспорт бывает первично-активным и вторично-активным. В случае ионного транспорта, обеспечиваемого транспортными АТФазами (их называют также ионными насосами),

энергодающей стадией является гидролиз АТФ. Такой процесс называется *первично-активным транспортом*. Если же энергия обусловлена градиентом ионов, созданным независимо, например, в процессе первично-активного транспорта, этот процесс называется *вторично-активным транспортом*. Специальные мембранные структуры обеспечивают пассивный и активный транспорт, в число которых входят каналы, переносчики и ферменты, осуществляющие перемещение ионов (веществ) против их концентрационного градиента.

Кроме этих основных видов транспорта имеются специальные виды переноса веществ через мембрану, выделяемые в особую группу: они сопряжены с изменением структурной целостности мембран. Сюда относятся процессы высвобождения медиаторов при возбуждении синапсов (происходит слияние синаптических пузырьков с мембраной и высвобождение их содержимого в синаптическую щель), перенос генетического материала через ядерную мембрану, процессы пиноцитоза и экзоцитоза, а также деятельность пермеаз бактерий, обеспечивающих перемещение через клеточную стенку олигопептидов.

Перенос белков от одних органелл к другим происходит с помощью *везикул*. Везикулы отпочковываются от мембран одной органеллы, а затем исчезают, сливаясь с мембраной другой органеллы. Белки при этом находятся в полости пузырька или в составе мембран подобно интегральным белкам. Перенос через биомембраны белков со значительной молекулярной массой осуществляется специальными транспортными системами. Из цитоплазмы в ядро белки попадают через крупный (125000 кДа) заполненный водой *пориновый комплекс*. Транспорт белков через него энергозависим и поэтому может регулироваться. Ядерные белки несут одну или несколько сигнальных последовательностей, с помощью которых они связываются с пориновым комплексом и импортируются с сохранением третичной структуры. Импорт белков из цитоплазмы в органеллы осуществляется белками-переносчиками, которые представляют собой белковые комплексы, переносящие линейные полипептиды через биомембраны также энергозависимым образом. Специфичность процесса обеспечивается за счет связывания сигнальной последовательности с ближай-

шим рецептором. Процессы развертывания и вторичной укладки белков контролируются белками *шаперонами*.

Пассивный и активный виды транспорта ионов обеспечиваются специальными структурами. В их числе *каналы, переносчики и ферменты*, осуществляющие перемещение специфических ионов против их концентрационного градиента за счет энергии АТФ. Зачастую одни и те же механизмы могут использоваться и для пассивного, и для активного переноса, только в последнем случае они соединены с «биологическим трансформатором» энергии (АТФазой), обеспечивающим процесс активного транспорта энергией (рис. 40). Как пассивный, так и активный транспорт, в общем виде, подчиняется кинетике насыщения, что свидетельствует о наличии конечного числа участвующих переноса.

Движущими силами **пассивного транспорта** веществ через биологическую мембрану могут служить следующие градиенты:

- концентрационный – для нейтральных молекул,
- электрохимический – для ионов,
- градиент гидростатического давления и осмотический градиент – для воды.

Трансмембранный градиент концентраций молекул различных веществ периодически возникает (или постоянно существует) на клеточной мембране в процессе жизнедеятельности. При определенных условиях через мембрану клетки осуществляется перемещение этих соединений в направлении их концентрационного градиента.

Следующие отличия характерны для облегченной диффузии:

1) перенос ионов с участием переносчика происходит значительно быстрее по сравнению со свободной диффузией;

2) облегченная диффузия обладает свойством насыщения – при увеличении концентрации с одной стороны мембраны плотность потока вещества возрастает лишь до некоторого предела, когда все молекулы переносчика уже заняты (рис. 41);

3) при облегченной диффузии наблюдается конкуренция переносимых веществ в тех случаях, когда одним переносчиком переносятся разные вещества; при этом одни вещества переносятся

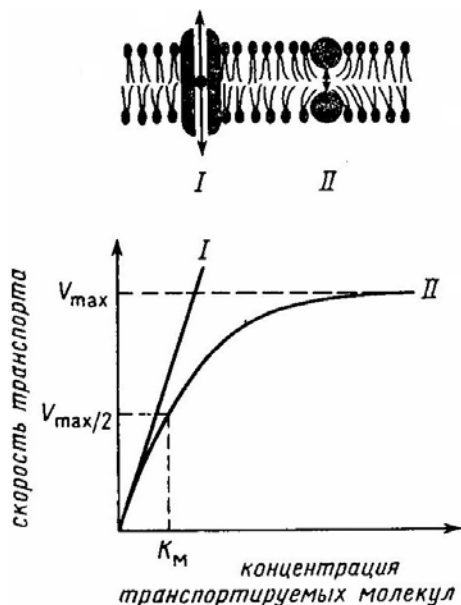


Рис. 41. Зависимость скорости транспорта от концентрации транспортируемых молекул при канальном (I) и переносчиковом (II) механизме

А — схема, Б — кинетическая зависимость.

обладает способностью легко проникать через мембрану. В этом отношении белки-переносчики (транспортные белки, пермеазы) похожи на ферменты. Единственное различие состоит в том, что они «катализируют» направленный транспорт, а не ферментативную реакцию. Они проявляют высокую специфичность — иногда групповую — к субстратам, подлежащим переносу через мембрану. Они характеризуются определенным сродством, выражаемым в виде константы  $K_a$  скоростью транспорта  $V$ .

лучше, чем другие, и добавление одних веществ затрудняет транспорт других;

4) вещества, которые образуют прочный комплекс с молекулами переносчика, препятствуя дальнейшему переносу, блокируют облегченную диффузию

Каналы, сформированные из матричных белков, значительно облегчают процесс переноса, но в отличие от белков-переносчиков, пронизывая мембрану насквозь, являются неподвижными. Канальные белки образуют в мембране заполненные водой поры, проницаемые для определенных ионов. Например, имеются специфические ионные каналы для ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . В отличие от ионных каналов белки-переносчики образуют специфический комплекс с молекулой субстрата, который

Канальный и переносчиковый типы транспорта легко различить по концентрационной зависимости скорости транспортного процесса: канальный тип имеет линейную зависимость, а переносчиковый тип характеризуется кинетикой насыщения (рис. 42).

Ионные каналы играют очень важную роль в функционировании клеток. В частности, они обеспечивают передачу нервного импульса и мышечное сокращение. При исследовании бактерий *Streptomyces lividans* в 1998 г. Р. Маккиннон (лауреат Нобелевской премии по химии за 2003 год) показал, что калиевый канал состоит из белков, образующих тело канала, и «ионного фильтра», который в каждый момент времени занят двумя ионами калия.

Размеры фильтра точно соответствуют размерам ионов калия, вследствие этого происходит их достаточно прочное связывание. Ионы проходят через канал по эстафетному механизму, когда связывание третьего иона в фильтре приводит к высвобождению первого иона с противоположной стороны канала.

Описанный механизм позволяет совместить высокую скорость с высокой избирательностью работы канала. Выявлены структурные особенности регуляции ионных каналов, которые обеспечивают их открывание и закрывание. За это свойство отвечает расположенная на противоположной стороне от ионного фильтра часть молекулы белка, которая имеет возможность осуществлять механические движения в ответ на приложение трансмембранной разности электрических потенциалов или связывание лиганда.



Рис. 42. Структура калиевого канала из *Streptomyces lividans*

Черные кружки – ионы калия, белые – молекулы воды.

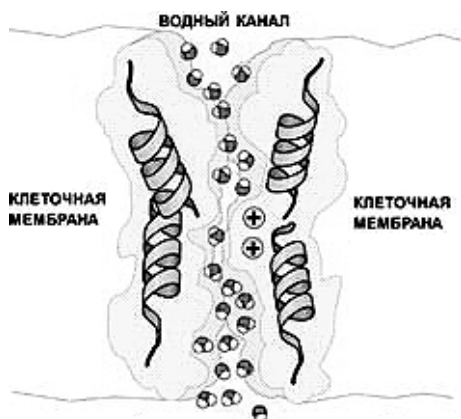


Рис. 43. Прохождение молекул воды через аквапорин

Долгое время считалось, что для диффузии воды через клеточные мембраны достаточно ее естественной проницаемости через липидную часть мембран за счет движения кинков. В 1988 г. в лаборатории П. Агре (лауреата Нобелевской премии по химии за 2003 год) были описаны *аквапорины* – новый класс белков, которые высокоэффективно пропускают молекулы воды, будучи абсолютно непроницаемы ни для каких ионов, включая протоны.

В отличие от ионных каналов, аквапорины осуществляют избирательное пропускание воды через мембраны клеток. Аквапорины имеют молекулярную массу  $\sim 30$  кДа и находятся в мембране в виде тетрамеров (рис. 43). Они встречаются в клетках всех живых организмов и играют особенно важную роль в физиологии почек (у человека через них проходит до 170 л воды в сутки). Нарушения работы аквапоринов (например, в случае генетических дефектов этих белков) приводят к тяжелым патологиям.

Рентгеноструктурный анализ аквапорина показал, что его структура сильно отличается от структуры калиевого канала. В мембране формируется очень узкое отверстие, в центре которого имеются два положительных заряда, расположенных на двух симметричных петлях с характерной последовательностью -N-P-A. Прохождение большинства катионов и анионов через данный канал невозможно из-за его малого размера, а протоны не проходят через него из-за наличия положительного заряда.

Примером канального механизма переноса являются натриевые каналы возбудимых мембран. Иллюстрацией транспорта перенос-

чикового типа является АТФ/АДФ-транслоказа, обеспечивающая перенос нуклеотидов через митохондриальную мембрану. Другой пример мембранных транспортеров представляют *ионофоры* – гидрофобные вещества, образующие с катионами жирорастворимые комплексы, способные встраиваться в мембрану. Эти молекулы могут функционировать по принципу как подвижных переносчиков, так и каналоформеров. Принцип действия ионофоров заключается в том, что они экранируют заряд транспортируемого иона, что позволяет ему пересекать по концентрационному градиенту гидрофобную область липидного бислоя биологической мембраны.

Примером ионофора, работающего как подвижный переносчик, может служить уже упоминавшийся депсипептид (пептид, который наряду с амидными участками содержит также и сложноэфирные связи) – *валиномицин*, продуцируемый одним из штаммов *Streptomyces*. Он способен образовывать комплексы с калием на 3 порядка более активно, чем с натрием. Это позволяет использовать валиномицин как специфический калиевый ионофор.

В липидной фазе молекула валиномицина имеет форму манжетки, устланной изнутри полярными группами, а снаружи – неполярными гидрофобными остатками молекул валина (рис. 44). Образует комплекс с ионами калия, попадающими внутрь молекулы-манжетки, валиномицин приобретает лучшую растворимость в липидной фазе мембраны. Ионы калия удерживаются внутри молекулы за счет межзарядных взаимодействий. Молекулы валиномицина, оказавшиеся у поверхности мембраны, могут захватывать из окружающей среды ионы калия и переносить его через мембрану, возвращаясь обратно с каким-нибудь противоионом (например, протоном). Таким образом, происходит челночный перенос ионов калия через мембрану.

Примером челночного переносчика является ионофор *A23186*, транспортирующий двухвалентные катионы  $\text{Ca}^{2+}$  по принципу ионного обмена: на каждый двухвалентный катион, переносимый в клетку, он «выносит» из клетки  $2 \text{H}^{+}$ . В конечном итоге работа этого переносчика не приводит к деполяризации мембраны. Другими словами, ионофор *A23187* осуществляет электронейтральный

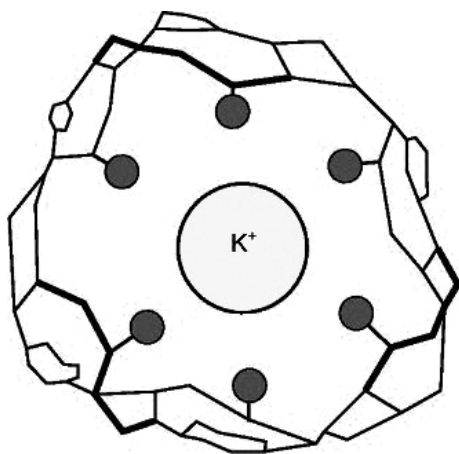


Рис. 44. Валиномицин ([L-лактат-L-валин-D-оксиизовалериановая кислота-D-валин]<sub>3</sub>) – циклический депептид-переносчик иона калия

Ион калия фиксируется в центре за счет межзарядных взаимодействий с участием карбонильных групп пептида (кружки).

антипорт. Этот ионофор часто используется в экспериментах для повышения концентрации свободного кальция в цитозоле.

К образованию каналов в мембране способны антибиотики трех групп: *грамцидины*, *аламетицин* и *полиеновые антибиотики*. Общим для них является то, что их молекулы амфифильны, благодаря чему они способны встраиваться в мембрану и образовывать поры, пронизывая мембрану (в виде одной молекулы или димера). Заряженные или полярные группы размещены в таких молекулах на одном конце молекулы. Таким образом, благодаря внутри- и межмолекулярным связям полярных групп они способны погружаться в мембрану, образуя в ней каналы. Известны и

другие ионофоры, способные переносить как одно-, так и двухвалентные ионы: – *нактины*, *энниатины*, макроциклические полиэферы (*крауны*), жирорастворимые слабые кислоты (*протонофоры*) и др.

Как **простая**, так и **облегченная диффузия** (транспортные процессы, обеспечиваемые ионными каналами и переносчиками), осуществляется по градиенту концентрации или градиенту электрического заряда (объединяемым термином «электрохимический градиент»). Такие механизмы транспорта согласно классификации определяются как пассивный транспорт. Ионные каналы представля-



ют собой сложные гликопротеиновые комплексы, осуществляющие быстрый пассивный транспорт ионов через биологические мембраны. Ионные каналы классифицируются по их проницаемости, селективности к различным ионам и по принципу открывания (закрывания) воротного механизма. Каналы способны избирательно взаимодействовать с определенными ионами ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ) при изменении мембранного потенциала, гормональных, механических и осмотических воздействиях, которые через сенсор внешнего стимула влияют на работу воротного механизма канала.

Наиболее важными свойствами ионных каналов являются селективность, способность к инактивации и величина проводимости, а также фармакологическая характеристика, которые определяют кинетические свойства конкретного ионного канала. Зная проницаемость одиночного канала и суммарную проницаемость мембраны, можно рассчитать плотность ионных каналов. Например, плотность  $K^+$ -каналов на плазмалемме достигает  $5 \cdot 10^{11}$  каналов/ $m^2$ , при этом они занимают 0,01% общей площади мембраны. Открывание и закрывание ионных каналов регулируется мембранным потенциалом, их ионным окружением (особенно ионами  $Ca^{2+}$  и  $pH$ ), фосфорилированием протеинкиназ. Движение иона через пору канала сопряжено с преодолением энергетического барьера, величина которого зависит от диаметра, энергии гидратации иона, величины  $pH$ , ионной силы и других условий, способных изменять энергию активации при прохождении селективного фильтра.

В зависимости от способа управления воротным механизмом канала со стороны сенсора внешнего сигнала каналы делятся на две группы. Первую группу составляют такие типы каналов, у которых сенсор внешнего стимула непосредственно входит в состав молекулы канала. Эта группа включает в себя потенциал- и лиганд-зависимые каналы. Потенциал-зависимые ионные каналы ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ) реагируют на изменение мембранного потенциала, лиганд-зависимые – открываются и закрываются при связывании с рецептором специфических агонистов, участвующих, например, в процессе быстрой передачи сигналов. У каналов второй группы

сенсор внешнего стимула пространственно отделен от канала. В этом случае сигнал от сенсора передается на канал через систему внутриклеточных посредников. Эта группа включает в себя рецептор-зависимые каналы и каналы, управляемые G-белками (подробнее см. раздел о трансдукции).

Ионные каналы делятся на потенциал-зависимые и индифферентные. Все потенциал-зависимые каналы устроены, по-видимому, одинаково. Интегральный белок канальной структуры образует пору в мембране, кроме нее имеется селективный фильтр, обеспечивающий специфичность канала, а также сенсор мембранного потенциала – устройство, управляющее состоянием канала в зависимости от знака и величины потенциала. Известны каналы, обеспечивающие проводимость мембраны для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  – они активируются такими веществами, как гвайанотоксином и вератридином. Действие этих соединений, как и эффект электрического потенциала, устраняется *тетродотоксином*.  $\text{K}^+$ -каналы блокируются *тетраэтиламмонием* и его производными. Известны также  $\text{Ca}$ -зависимые  $\text{K}^+$ -каналы, открывающиеся при существенном возрастании концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы также бывают потенциал-зависимыми и потенциал-индифферентными. Последние чувствительны к целому ряду разнообразных химических веществ, носящих название  $\text{Ca}$ -антагонистов (*верапамил*, *нифедипин* и т.д.). Известны и агонисты  $\text{Ca}$ -каналов. Открывание этих каналов осуществляется в присутствии адениновых нуклеотидов и следовых количеств кальция. Чувствительность  $\text{Ca}$ -каналов к *цАМФ* и *протеинкиназам* объясняется тем, что фосфорилирование регуляторных компонентов канала контролирует длительность его нахождения в открытом состоянии.

Потенциал-зависимые каналы устроены таким образом, что интегральный белок канальной структуры образует пору в мембране. В канале выделяют внутреннее и наружное устья и пору, которая с помощью воротного механизма может открываться и закрываться. Гидрофильные аминокислоты выстилают стенки поры, а гидрофобные – контактируют с липидной фазой мембраны. В канале имеются селективный фильтр, обеспечивающий специфичность канала, и сенсор градиента электрического потенциала на мембра-

не. Открывание и закрывание воротного механизма каналов является результатом конформационных изменений в белке. При открывании ионного канала регистрируется резкое возрастание электрического тока через мембрану.

Проницаемость каналов составляет от  $10^6$  до  $10^8$  ионов в секунду, что на три порядка выше, чем транспорт ионов, осуществляемый ионными насосами или переносчиками, и на 11 порядков выше, чем простая диффузия ионов через мембрану. Отличительной особенностью ионных каналов является то, что в открытом состоянии они обеспечивают относительно постоянный поток ионов в одном направлении при конкретном значении мембранного потенциала и в определенной ионной среде. Односторонняя проницаемость – еще одна особенность транспорта ионов через каналы. В процессе транспорта через канал происходит взаимодействие иона с белком, поэтому передвижение ионов по каналам отличается от их транспорта через водные поры, в которых эти взаимодействия сведены до минимума.

В противоположность вышеописанным процессам **активный транспорт** осуществляется против градиента концентрации или заряда, поэтому он требует притока дополнительной энергии, которая обычно обеспечивается за счет гидролиза АТФ (иногда – за счет мембранного потенциала). Первично-активный транспорт ионов в большинстве случаев осуществляется транспортными АТФазами (ионными насосами), источником энергии для которых является гидролиз АТФ или пирогосфата. В мембранах хлоропластов и митохондрий при работе систем первично-активного ионного транспорта источником энергии является трансмембранный потенциал, создаваемый работой окислительно-восстановительных цепей. Некоторые транспортные процессы осуществляются за счет гидролиза других макроэргических соединений, как, например, фосфоенолпирувата, или же за счет энергии света.

**Первично-активный транспорт** отличается от пассивного тем, что одна из его стадий является энергозависимой. Первично-активный транспорт ионов мембранными ферментами часто демонстрирует отклонения от кинетики Михаэлиса – Ментен,

которые могут быть обусловлены свойствами самой системы переноса.

Типичный пример первично-активного транспорта – активный транспорт ионов. Он осуществляется специальными ионными насосами, которые представляют собой интегральные белки клеточных мембран. Функция ионных насосов заключается в переносе ионов через мембрану против электрохимического градиента за счет энергии гидролиза АТФ. В соответствии с этим ионные насосы обладают аденозинтрифосфат-фосфогидролазной активностью. Последняя специфически контролируется переносимыми насосом ионами и требует для своей работы ионов магния.

Таким образом, ион-транспортирующие системы являются Mg-АТФазами, приобретшими способность дополнительной регуляции переносимыми ионами как кофакторами. В процессе их функционирования энергия химической связи АТФ превращается в энергию электрохимического градиента переносимых этими системами ионов. По этой причине понятно, почему синонимом термина «ионные насосы» стал термин «транспортные АТФазы». Транспортные АТФазы классифицируют по переносимым ими (и активирующим их работу) ионам. Четыре типа АТФаз имеют отношение к транспорту ионов – протонная (К,Н-зависимая)-АТФаза, анионная ( $\text{HCO}_3^-$ )-АТФаза, Са-АТФаза и Na/К-АТФаза.

При работе Na/К–АТФазы за счет энергии высвобождающейся при гидролизе каждой молекулы АТФ в клетку переносятся два иона калия и выкачиваются три иона натрия. Таким образом, создается повышенная (по сравнению с межклеточной средой) концентрация в клетке ионов калия и пониженная концентрация ионов натрия, что имеет важное физиологическое значение. Са-насос обеспечивает активный перенос двух ионов кальция, а протонный насос – двух протонов на одну молекулу АТФ (рис. 45). У растений роль протонного насоса выполняет протонная пирогидрофосфатаза ( $\text{H}^+$ -РРa).

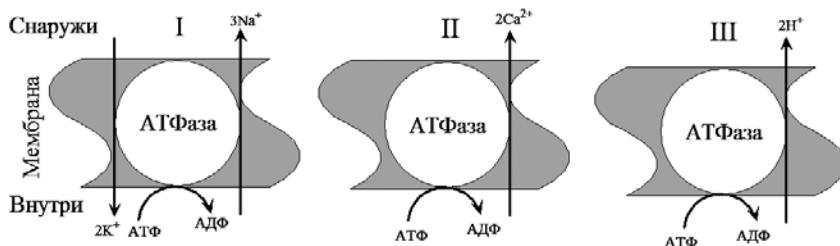


Рис. 45. Активный перенос ионов транспортными АТФазами

I – схема  $K^+$ - $Na^+$ -насоса в клеточной плазматической мембране, II – схема кальциевого насоса в мембране саркоплазматического ретикулума, III – схема протонного насоса во внутренней мембране митохондрий или мембране растительной клетки.

Активный транспорт ионов может быть электронейтральным или электрогенным. Транспортная система электронейтральна, если при ее функционировании происходит обмен внутриклеточных ионов на внеклеточные в эквивалентных (по заряду) количествах. Если транспорт веществ через мембрану не сопровождается накоплением заряда, то такой транспорт называют электронейтральным. Транспорт может быть электронейтральным при соблюдении следующих условий:

- 1) при переносе незаряженного вещества;
- 2) при симпорте катионов и анионов равной валентности;
- 3) при антипорте двух равнозаряженных ионов.

В том случае, когда количество зарядов, переносимых за единицу времени в одном направлении, не компенсируется суммой зарядов, переносимых в противоположном направлении, транспортный механизм генерирует дополнительную разность потенциалов на мембране и называется *электрогенным*. Во время работы электрогенного насоса, например,  $Na/K$ -АТФазы, из клетки выносятся 3 положительных заряда (3 иона  $Na^+$ ), а входят в клетку 2 положительных заряда (2 иона  $K^+$ ), в результате чего в клетке происходит накопление положительных электрических зарядов, и на мембране возникает разность потенциалов. При работе электронейтрального насоса система

активного транспорта является лишь средством поддержания концентрационных градиентов ионов и непосредственно не участвует в создании мембранного потенциала клетки.

Существует классификация способов, которые обеспечивают транспорт веществ через клеточную мембрану (рис. 46).

Транспорт может идти по механизму *унипорта* (облегченной диффузии), согласно которому только одно вещество переносится через биомембрану в одном направлении с помощью канальных или транспортных белков (например, транспорт глюкозы в клетках печени). Примерами унипорта также являются транспорт ионов кальция через внутреннюю мембрану митохондрий.

Транспортный процесс, который требует сопряженного переноса двух или более ионов (веществ) в одном направлении, называют *симпортом*, как, например, активный транспорт аминокислот или глюкозы вместе с ионами натрия в эпителиальных клетках кишечника

протекает по механизму симпорта.

Транспорт ионов (веществ), сопряженный с переносом других ионов (веществ) в противоположном направлении, называют *антипортом*, как, например, обмен ионов  $\text{HCO}_3^-$  на  $\text{Cl}^-$  в мембране эритроцитов. Примером такого транспорта может также служить  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипорт во внутренней мембране митохондрий и

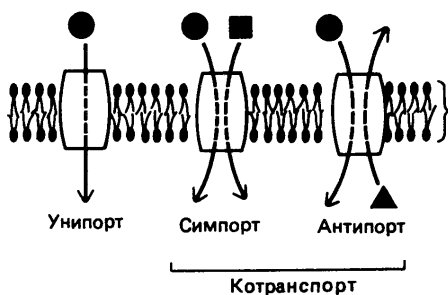


Рис. 46. Классификация способов переноса веществ через биологические мембраны

$\text{K}^+/\text{H}^+$ -антипорт, катализируемый ионофором нигерицином в бислоях. Трансмембранный обмен (антипорт) или односторонний транспорт (симпорт) рассматриваемых ионов осуществляют специфические переносчики.

Таким образом, при симпорте и антипорте белки функционируют в режиме, при котором перенос одного растворенного вещества

зависит от одновременного или последовательного переноса другого вещества. Указанные термины — антипорт и симпорт (котранспорт) — связывают не только с явлениями пассивного транспорта, осуществляющегося с помощью переносчика (например, симпорт анионов, осуществляющийся методом электрофореза), но и в случае, когда процесс сопряжен с энергозависимыми реакциями.

Энергия, запасаемая клеткой в виде ионных градиентов, созданных первично активным транспортом веществ через мембрану, может использоваться другими транспортными процессами, которые в таком случае (по отношению к энергетическому обеспечению процесса) называют **вторично-активным транспортом**. Так, к примеру, происходит при аккумуляции в клетке глюкозы или других метаболитов — они переносятся против концентрационного градиента за счет того, что одновременно с ними в клетку переносятся ионы  $\text{Na}^+$ . В клетках низших эукариот градиент  $\text{Na}^+$  может быть заменен градиентом протонов. Перенос осуществляется с помощью белков-переносчиков, имеющих молекулярную массу 25–40 кДа. Некоторые переносчики сахаров выделены из плазматических мембран слизистой кишечника, эритроцитов, бактерий. Они имеют широко варьирующее сродство ( $K_a$  для переносимых веществ варьирует от  $10^{-7}$  до  $10^{-4}$  М) и различную специфичность к переносимым соединениям. Обнаруживаются случаи переноса одной и той же аминокислоты 3–4 разными переносчиками или, наоборот, выявляется специфичность одного переносчика к 2–3 разным соединениям. Удобным объектом для изучения транспорта метаболитов являются микроорганизмы, дефицитные по конкретным переносчикам. Соответствующие субстраты не попадают внутрь клетки и поэтому не могут утилизироваться.

К вторично-активному транспорту относятся и процессы переноса, сопряженные с ферментативной модификацией переносимых соединений. Например, фосфотрансферазная система бактерий, отсутствующая у эукариот, фосфорилирует сахара в процессе их проникновения через мембрану, вовлекая их тем самым в клеточный метаболизм. У грам-отрицательных бактерий так переносятся D-глюкоза, D-фруктоза и D-глюкозамин.

У грам-положительных бактерий набор переносимых веществ шире: сюда относятся также пентозы, сахароза, трегалоза, лактоза, глицерин. При этом лактоза и фруктоза фосфорилируются по  $C_1$ , остальные вещества – по концевому углероду.

Митохондрии – это пример системы, осуществляющей вторично-активный транспорт  $Ca^{2+}$ . В этом случае перенос иона осуществляется по градиенту потенциала, образованного на мембране за счет метаболических процессов, например, дыхания или гидролиза АТФ. При этом на мембране генерируется потенциал, и транспорт  $Ca^{2+}$  осуществляется по принципу электрофореза.

## **6.2. ТРАНСПОРТ ВОДЫ**

Трансмембранный обмен воды протекает с высокой скоростью. Он является необходимым условием, обеспечивающим осмотическое равновесие клетки со средой. В большинстве случаев перемещение воды через биологические мембраны индуцируется изменением или гидростатического давления, или концентрации растворенного вещества, для которого мембрана менее проницаема, чем для воды. Второй случай известен под названием «уравнивание осмотического давления». *Осмоз* – основная движущая сила при транспорте воды через мембраны клеток животных.

Осмоз – преимущественное движение молекул воды через полупроницаемые мембраны (непроницаемые для растворенного вещества и проницаемые для воды) из областей с меньшей концентрацией растворенного вещества в области с большей его концентрацией. Осмос играет большую роль во многих биологических явлениях. Явление осмоса обуславливает гемолиз эритроцитов в гипотонических растворах и тургор в тканях растений.

## **6.3. ИОННЫЙ ГОМЕОСТАЗ КЛЕТКИ**

Среди неорганических компонентов, в той или иной степени участвующих в метаболизме клеток и тканей, первое по важности место принадлежит ионам металлов (рис. 47). Накапливаемые



Li	Be										
Na	Mg										
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	
Ru	Sr	Y	Hf	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	
Cs	Ba	La	Zr	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	

Для всех перечисленных элементов, по-видимому, существуют способы, благодаря которым клетки регулируют их содержание. Для некоторых элементов системы аккумуляции или выброса из клетки так мощны, что обнаруживается яркая неравномерность в распределении ионов по обе стороны клеточной мембраны (табл. 9). Так, клетки всех тканей животных характеризуются электрохимическим градиентом ионов Na, K и Ca. Ионы Na выбрасываются из клетки, а ионы K накапливаются там, при этом создается трансмембранный потенциал клетки величиной 90–120 мВ. Ионы Ca способны как выбрасываться из клеток, так и аккумулироваться во внутриклеточных депо, благодаря чему концентрация ионизированного  $\text{Ca}^{2+}$  в «покоящейся» клетке составляет  $\sim 10^{-7}$  М.

121

Таблица 9. Содержание основных ионов в клетках и внеклеточной жидкости некоторых животных в сравнении с ионным составом морской воды (мМ)

Объект	Натрий	Калий	Кальций	Магний	Хлор
Крыса					
мышцы	27	101	1,5	11,0	16
плазма крови	145	6,2	3,1	1,6	116
Лягушка					
мышцы	24	85	2,5	11,3	10
плазма крови	104	2,5	8,5	1,2	74
Осьминог					
мышцы	81	101	3,7	12,7	93
жидкость тела	525	12,2	11,6	57,2	480
Морская вода	440	9,5	9,6	56,0	535

Второй потенциал ионизации для этих элементов достаточно высок. По этой причине, трудно предположить существование других окисленных форм этих металлов; в действительности они неизвестны.

В биологических жидкостях натрий и калий представлены преимущественно в ионной форме. В водной фазе рассматриваемые вещества бурно ионизируются с восстановлением водорода воды, а образующиеся ионы легко гидратируются.

Натрий и калий вместе с H, Li, Rb, Cs, Fr входят в состав I группы элементов таблицы Менделеева. Все они (кроме газообразного водорода) – металлы и относятся к группе щелочных металлов. Общим для них является наличие избыточного (сверх конфигурации инертных газов) S-электрона.

Несмотря на высокую подвижность  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , они не распределены в живых системах равномерно. Напротив, как уже отмечалось, существует определенная избирательность в распределении этих ионов между клетками и внеклеточной средой.

Натрий в интерстициальной жидкости регулирует осмотический баланс организма и содержание воды в тканях. Ионы Na участвуют также в поддержании кислотно-щелочного равновесия в организме, а в возбудимых тканях (нервная и мышечная) – участвуют в формировании электрического потенциала.

В последнее время установлены и другие важные для организма функции  $\text{Na}^+$ , направленные на изменение упаковки нуклеиновых кислот и белков, поскольку связывание натрия ионными центрами макромолекул может стабилизировать их в определенных *конформациях*. Способность  $\text{K}^+$  стабилизировать структуру макромолекул резко отличается от таковой у  $\text{Na}^+$ .

Таблица 10. Физико-химические свойства ионов натрия и калия

Ион	Радиус, Å	Координационное число	Равновесный потенциал, мВ	Предельная температура гидратации, °C
$\text{Na}^+$	0,98	6-8	+60	20
$\text{K}^+$	1,33	6	-94	70

Калий также необходим для растений и животных. Поскольку многие его функции аналогичны таковым у  $\text{Na}^+$ , эти ионы до некоторой степени взаимозаменяемы. Однако в большинстве случаев действие  $\text{K}^+$  оказывается противоположным действию  $\text{Na}^+$ . Так, при возбуждении  $\text{Na}^+$  обеспечивает фазу деполяризации клетки, а  $\text{K}^+$  восстанавливает исходный потенциал на мембране. Для ряда ферментов гликолиза  $\text{K}^+$  является активатором, в то время как  $\text{Na}^+$  ингибирует их. По-разному влияют эти ионы и на конформационное состояние макромолекул. В основе их действия, видимо, лежит множественное связывание с анионными центрами крупных молекул, так как оптимальные активирующие концентрации одновалентных катионов очень высоки, они составляют 50–100 мМ.

Кроме того, натрий и калий в ионизированном состоянии не отличаются друг от друга по заряду, размеру и числу создаваемых ими координационных связей, но существенно отличаются по величине предельной температуры, то есть той температуры, выше которой разрешена их гидратация ( $T_{\text{пред}}$ ). Для натрия она составляет +20°C, а для калия +70°C. Таким образом, по крайней мере в диапазоне температур выше +20°C, в котором функционируют большинство живых организмов, натрий легко взаимодействует с молекулами воды, образуя гидратную оболочку, а калий

отталкивает воду (табл. 10). Таким образом, ион калия по своим свойствам является более гидрофобным, чем ион натрия.

Поскольку гидратированный ион натрия близок по размерам к негидратированному иону калия, то ни по заряду, ни по размерам эти ионы не отличаются друг от друга, и наиболее существенным различием для их дискриминации является величина гидрофобности. Количественно эта величина может быть выражена энергией гидратации, которая при комнатной температуре составляет для натрия +1,03 кДж/моль, а для калия – -1,05 кДж/моль. Очевидно, биологические молекулы могут использовать именно этот параметр для отбора и распознавания ионов.

Липиды хорошо различают  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , вероятно, именно благодаря различиям в их гидрофобности. Если приготовить везикулы из смеси природных липидов (такой упрощенный прообраз клеточных структур называют *липосомами*), оказывается, что скорость простой диффузии через их мембраны будет в 3–7 раз выше для калия, чем для натрия (в зависимости от состава липидов, ионной силы и других условий). Таким образом, «неживые» липосомы способны создавать градиент одновалентных ионов на своей мембране, похожий на тот, что создается живыми клетками.

Нуклеиновые кислоты, несущие информацию о синтезе белков и тем самым определяющие белковое «лицо» клетки, тоже реагируют на изменение ионного состава среды, в которой они функционируют. Так, ионы натрия влияют на упаковку и взаимодействие нуклеотидов в двойной спирали, а ионы калия регулируют прочность контактов между рибосомами и РНК, с участием которых происходит синтез полипептидной цепи.

Белковые молекулы также не являются исключением. Они способны различать натрий и калий в водных растворах. Интенсивность многих ферментативных процессов в клетке зависит от ионов натрия и калия: в большинстве случаев ион калия является активатором, а ион натрия – ингибитором клеточных реакций. Исключение составляют процессы синтеза липидов, активируемые натрием.

**Магний и кальций.** Ионы Mg и Ca входят в состав II группы элементов таблицы Менделеева; эта группа открывается берилли-

ем (Be). Бериллий обладает совершенно особыми свойствами, обусловленными малым металлическим радиусом (0,89 Å) и потенциалами ионизации (9,32 и 18,21 эВ). Таким образом, Be значительно менее электроположителен, чем Li. По этим причинам ионных форм Be в растворах не существует.

Несмотря на то что электронное строение элементов группы щелочно-земельных металлов подобно электронному строению Be, больший размер их атомов уменьшает влияние заряда ядра на валентные электроны. Ионная природа их соединений возрастает в ряду  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ; и хотя некоторые соединения  $Mg^{2+}$  еще имеют ковалентный характер, все соединения  $Ca^{2+}$  обладают, по существу, ионными свойствами. Как и в случае элементов I группы, радиусы гидратированных ионов элементов II группы значительно больше их кристаллографических радиусов.  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  образуют ряд, в котором наблюдается систематическое изменение свойств в соответствии с изменением ионной и электроположительной природы элементов. Некоторые примеры этих систематических изменений таковы: изменение тенденции к гидратации кристаллических солей; уменьшение растворимости сульфатов, нитратов, хлоридов (но не фторидов); увеличение способности реагировать с водородом; способность стабилизировать перекисные и надперекисные анионы.

Из всех элементов группы щелочно-земельных металлов лишь  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  широко используются в живых организмах; остальные в большей или меньшей степени токсичны. Главная причина токсичности этих элементов заключается, видимо, в их высокой склонности образовывать ковалентные связи, и способности вытеснять ионы Mg и Ca из биологических структур и необратимым связыванием с этими структурами. Именно по этой причине особенно токсичен Be. Стронций мало распространен в биологических системах, однако его радиоактивный изотоп  $^{90}Sr^{2+}$  достаточно опасен: он накапливается в костях, в результате чего возможно возникновение лейкемии. Барий встречается чаще стронция, его действие на организм не изучено, известно лишь, что соли  $Ba^{2+}$  влияют на обмен  $Ca^{2+}$  в тканях; это не относится лишь к  $BaSO_4$ , имеющему незначительную растворимость.

При обычной диете у людей не бывает дефицита  $Mg^{2+}$ , за исключением случаев резкого снижения содержания белка в пище или хронического алкоголизма. Суточная потребность человека в  $Mg^{2+}$  составляет 200–300 мг, а общее количество  $Mg^{2+}$  в организме взрослого человека составляет около 20 г. Более половины этого количества оседает в костях в виде фосфорных солей. В некоторых случаях фосфат магния может оседать в мочевыводящих каналах. Почти весь остальной  $Mg^{2+}$  является внутриклеточным. Содержание  $Ca^{2+}$  в организме человека и животных определяется соотношением эффективности систем аккумуляции и выброса  $Ca^{2+}$  из организма. Дефицит  $Ca^{2+}$  возникает весьма редко. Он чаще всего может быть вызван дефектом метаболизма, при котором реализуется склонность  $Ca^{2+}$  образовывать нерастворимые соли с анионами, широко распространенными в пище, – оксалатом и фосфатом. Чаще всего встречается *гиперкальциемия*. Нарушения обмена  $Ca^{2+}$ , приводящие к колебаниям его уровня в кровяном русле, вызывают нарушения многих процессов жизнедеятельности, в том числе возбудимости нервной и мышечной тканей.

Значение  $Mg^{2+}$  для метаболизма может объясняться его свойствами как промотора структуры макромолекул, как субстрат-связывающего иона и как переносчика электронов. Последнее качество для  $Mg^{2+}$  мало существенно, так как он не имеет переменной валентности. Первое свойство также не особенно широко распространено, хотя установлена способность  $Mg^{2+}$  связываться с ДНК *in vitro*. Наиболее широко известна роль  $Mg^{2+}$  в образовании комплекса с АТФ – субстратом аденозинтрифосфатазных реакций; в этой роли магний является незаменимым.  $Mg^{2+}$  вступает во взаимодействие с фосфатными заряженными группами АТФ, поляризуя их и повышая реакционную способность системы, облегчая нуклеофильную атаку на терминальный фосфат АТФ. Наконец, есть длинный список Mg-зависимых ферментов, начиная от пируватдекарбоксилазы и кончая ДНКазой, где роль  $Mg^{2+}$  связана с формированием активного (каталитического) центра фермента. Магний как наиболее широко распространенный катион во внутриклеточном пространстве выступает природным активатором большинства ферментов, которые действуют на фосфорилирован-

ные субстраты, гидролизуя ангидриды фосфорной кислоты. Существует более 100 ферментов, для которых необходимы ионы Mg как кофактор катализируемых ими реакций. В большинстве случаев  $\text{Ca}^{2+}$  является его антагонистом. Так, в гладких мышцах ионы магния обеспечивают покоящееся (расслабленное) состояние волокон, а  $\text{Ca}^{2+}$  является активатором их сократительного ответа. По содержанию ионов Na, K, Ca и Mg цитоплазма клеток отличается от интерстициальной жидкости, которая, особенно в случае морских животных, приближается к составу морской воды. Чему служит такое селективное распределение ионов? Перечисленные здесь ионы в большинстве своем участвуют в осуществлении важных пусковых или контрольных механизмов клетки. Так,  $\text{Ca}^{2+}$  запускает работу кальмодулин-зависимых систем, а также сократительный аппарат,  $\text{Na}^+$  может регулировать интенсивность белкового синтеза; градиент одновалентных ионов является источником энергии для процессов возбуждения, а также вторично-активного транспорта субстратов в клетку; вход  $\text{Mg}^{2+}$  в ядро нейтрализует заряд фосфата ДНК и стабилизирует двойную спираль. Эти данные означают, что изменение ионного гомеостаза может вызвать определенные биохимические последствия.

Часто в эксперименте, изучая роль ионов в той или иной ферментативной реакции, исследователи пытаются подменить одни ионы другими. Ферменты «замечают» подмену, причем характер изменения их свойств может дать важную информацию. Так, ионы Mg, которые необходимы для всех ферментативных реакций, включающих перенос фосфатной группы (фосфатазы, киназы, полимеразы), можно заменить ионами  $\text{Mn}^{2+}$  более эффективно, чем ионами  $\text{Ni}^{2+}$ , хотя у последнего ионный радиус ближе к радиусу  $\text{Mg}^{2+}$ . В ряде случаев лантан может заменять кальций, несмотря на разницу в их зарядах. Таллий обладает даже большим сродством к Na/K-АТФазе, чем калий. Железо в дыхательной цепи частично можно заменить на гадолиний. Такой подход перспективен для исследования взаимодействия межбелковых комплексов, поскольку марганец является парамагнитным ионом-тушителем спинового сигнала, гадолиний эффективно тушит белковую флуоресценцию. Связывание  $\text{Mg}^{2+}$  с заряженными группами нуклеиновых кислот

хорошо имитируется ионами  $\text{Cu}^{2+}$ , но с отличным от  $\text{Mg}^{2+}$  результатом: медь дестабилизирует двойную спираль, способствуя ее раскручиванию, так как связывается не только с фосфатными группами, но и с азотистыми основаниями.

Создание ионной асимметрии клетки обеспечивается активным транспортом  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{H}^+$ . Этот процесс осуществляется специальными транспортными системами.

#### **6.4. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПЕРВИЧНО-AКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ИОНОВ**

В большинстве случаев источником энергии для первично-активного транспорта ионов является АТФ. Вот почему большинство ионных насосов одновременно являются ферментами, гидролизующими АТФ, – АТФазами. Все транспортные АТФазы прокариотических и эукариотических клеток делятся на АТФазы Р-, V- и F-типа.

Общим свойством АТФаз Р-типа является способность образовывать ковалентный фосфорилированный интермедиат (Р), участвующий в реакционном цикле. К этим АТФазам относятся Na/K-АТФаза, Са-АТФаза и Н-АТФаза плазматической мембраны эукариотических клеток, а также Са-АТФаза эндо(сарко) плазматического ретикулума и К-АТФаза наружной мембраны прокариот (*E. coli*, *Streptococcus faecalis*). Предполагают, что высокоспецифичное ( $K_m = 10\text{--}30$  мкМ) поглощение ионов калия клетками растений может обеспечиваться  $\text{K}^+, \text{H}^+$ -АТФазой,  $\text{K}^+$ -АТФазой и(или)  $\text{K}^+, \text{H}^+$ -симпортером. Эти переносчики начинают активно действовать при микромолярных концентрациях калия во внешней среде, а насыщение наступает при концентрации ионов  $\text{K}^+$  более 200 мкМ. Скорость обращения этих переносчиков составляет  $10^2$  -  $10^4$  ионов в секунду. Они способны аккумулировать калий клетками при  $10^6$ -кратном градиенте его концентрации на мембране.

В процессе функционирования АТФаз Р-типа при гидролизе АТФ остаток фосфорной кислоты переносится на карбоксильную группу аспартата активного центра и образуется фосфорилированная форма фермента (Е-Р). Эффективным ингибитором АТФаз



P-типа является ванадат-ион, который способен замещать фосфат в активном центре фермента. Различные АТФазы P-типа отличаются друг от друга по чувствительности к любым другим модификаторам, кроме ванадата, который является сильным ингибитором именно этого типа транспортных АТФаз. Например, H<sup>+</sup>-АТФаза плазматических мембран ингибируется *диэтилстильбестролом* (ДЭС) и высокими концентрациями *дициклогексилкарбодиимида* (ДЦКД), Na/K-АТФаза - сердечными гликозидами, Ca<sup>2+</sup>-АТФаза плазмалеммы активируется белком кальмодулином и угнетается рутениевым красным, SH-реагентами (*мерсалил*, *N-этилмалеимид* и др.) и *эритрозином В*, а Ca-АТФаза саркоплазматического ретикулула – *тапсигаргином*.

Ион-транспортирующие АТФазы V-типа относятся к мембраносвязанным структурам, которые отличаются от митохондрий и эндоплазматического ретикулула. Они обнаруживаются в вакуолях дрожжей и тонопластах растений, а также в лизосомах, эндосомах и секреторных гранулах. Большинство этих АТФаз являются переносчиками протонов и участвуют в транспорте анионов, аминокислот, репарации мембран при эндо- и экзоцитозе. Для них не установлено образования ковалентно-связанного интермедиата в ходе каталитического цикла. Кроме ДЦКД, АТФазы V-типа блокируются *нитратом*, хаотропными веществами (KSCN) и SH-реагентами. Ни ванадат (ингибитор P-типа АТФаз), ни *олигомицин* (ингибитор F-АТФаз) не действуют на эти системы.

На рис. 48 приведена схема функционирования электрогенных протонных насосов тонопласта. Транспорт ионов водорода внутрь вакуоли осуществляется двумя ферментами, один из которых использует энергию АТФ (H-АТФаза), а второй – пирофосфата (H-PPаза). Оба фермента катализируют электрогенный транспорт протона из цитозоля в вакуоль, создавая на тонопласте электрический (от +20 до +50 мВ) и химический (от 1,5 до 4,5 единиц pH) градиенты. Эта энергия используется в процессе вторичного активного транспорта ионов в режиме унипорта или антипорта. Ионы Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> и малата (Mal<sup>2-</sup>) входят в вакуоль, а ионы Ca выходят из вакуоли по градиенту электрического потенциала. Ионы Na, Ca и сахара входят внутрь вакуоли в обмен на H<sup>+</sup>. Следует отметить,

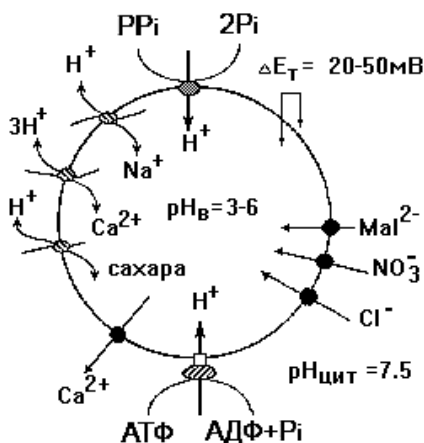


Рис. 48. Электрогенный транспорт ионов водорода  $H^+$ -АТФазой и  $H^+$ -пирофосфатазой ( $H^+$ -РРазой)

что на долю  $H^+$ -РРазы приходится от 1 до 10% белков тонопласта, поэтому она способна создавать почти такой же (если не больший), как и  $H$ -АТФаза, градиент концентрации протонов на мембране тонопласта.

АТФазы F-типа (называемые  $(F_0+F_1)$ -АТФазами) обнаруживаются в мембранах бактерий, в хлоропластах и митохондриях. Они имеют очень сложное устройство: содержат водорастворимую часть  $F_1$ , состоящую из нескольких субъединиц и обладающую каталитической активностью (способна катализировать

как синтез, так и гидролиз АТФ), и гидрофобную часть  $F_0$ , участвующую в транслокации  $H^+$ . Основные различия между этими ферментами обнаруживаются не в структуре  $F_1$ -части, а в гидрофобном  $F_0$ -компоненте, погруженном в мембрану. Число полипептидов в  $F_0$  может колебаться от 3 до 8. Активность F-АТФаз подавляется олигомицином, ДЦКД, *вентурицидином*, ионами кадмия. В клетке ферменты первых двух типов выступают как потребители, а третьего – как продуценты АТФ. Ниже рассмотрены наиболее подробно изученные транспортные АТФ-азы.

#### 6.4.1. Na/K-АТФаза

Na/K-АТФаза представляет собой сложный белок, встроенный в наружную мембрану клетки и имеющий центры связывания для ионов натрия и калия, а также активный центр, где осуществляются связывание и гидролиз АТФ (рис. 49).

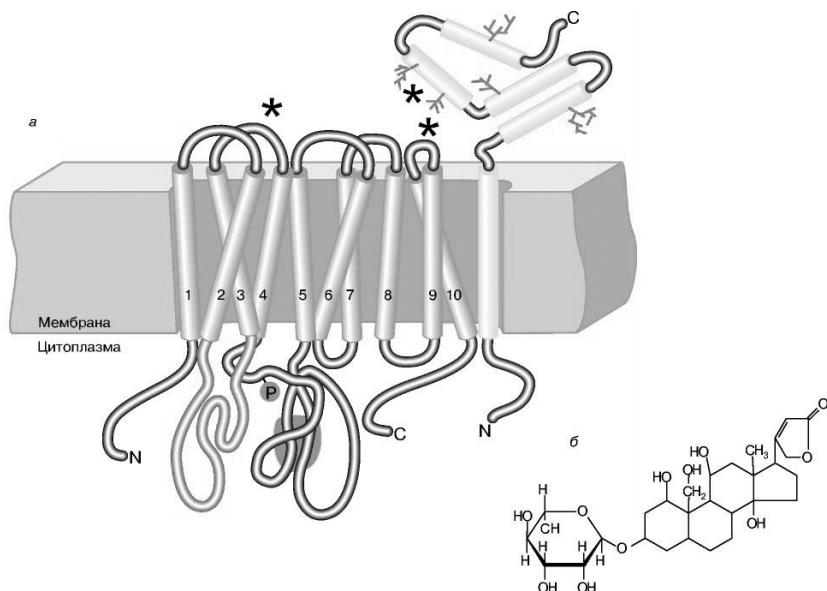


Рис. 49. Схема расположения Na/K-АТФазы в клеточной мембране (а) и структура ее специфического ингибитора уабаина (б)

Расположение N- и C-концов полипептидных цепей указано соответствующими буквами. Мембранная часть  $\alpha$ -субъединицы представлена 10  $\alpha$ -спиралями (колоннами), пересекающими мембрану и образующими несколько петель. Петля между 2 и 3 колоннами принимает участие в формировании центра связывания ионов. На петле между 4 и 5 колоннами локализованы центр связывания АТФ и участок фосфорилирования (Р). К С-концу  $\beta$ -субъединицы присоединены гликозильные радикалы. Звездочками отмечены вероятные участки связывания специфического ингибитора Na/K-АТФазы - уабаина.

Функциональная единица фермента состоит из двух полипептидных цепей: большей ( $\alpha$ -субъединицы) и меньшей ( $\beta$ -субъединицы), входящих в состав ферментного комплекса в соотношении 1:1. Меньшая субъединица пересекает мембрану только один раз, в то время как большая – много раз, образуя 5 двойных петель, при этом оба конца пептидной цепи обращены в

цитоплазму. Активный центр фермента также обращен в цитоплазму и доступен для цитоплазматического АТФ. Центры связывания переносимых ионов локализованы в петле между второй и третьей спиралями, пронизывающими мембрану.

Таким образом,  $\alpha$ -субъединица может выполнять функцию насоса независимо от  $\beta$ -субъединицы. Однако оба полипептида образуют компактную глобулу, насквозь пронизывающую мембрану. Та часть  $\beta$ -субъединицы, которая обращена во внеклеточную среду, несет на себе ковалентно присоединенные углеводные фрагменты.

По массе и наличию углеводов этот полипептид можно отнести к лектинам – мембранным гликопротеинам, которые отвечают за межклеточное узнавание и адгезию. В процессе белкового синтеза обе субъединицы встраиваются в мембрану одновременно. Существуют данные, согласно которым  $\beta$ -субъединица обеспечивает правильную ориентацию  $\alpha$ -субъединицы в мембране.

Гидролизует АТФ, чтобы обеспечить энергией активный транспорт ионов, Na/K-АТФаза осуществляет сложную многостадийную реакцию, в которой участвуют ионы натрия, калия и магния, а также АТФ. Фермент имеет лабильную структуру. Он легко изменяет свою конформацию (так называют взаимное расположение и упаковку отдельных частей молекулы белка в пространстве, см. выше) в зависимости от того, какой ион к нему присоединяется.

Уже в ранних исследованиях было показано, что в присутствии натрия фермент легко взаимодействует с АТФ, в результате чего терминальный фосфат АТФ переносится на карбоксил аспарагиновой кислоты белковой цепи, образуя фосфорилированный фермент (E-P, где E обозначает молекулу белка-фермента, а P – фосфорильный остаток). Фосфофермент является промежуточным продуктом АТФазной реакции. Он может находиться в двух конформационных состояниях, условно обозначаемых как E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub>. Первая форма обладает повышенным сродством к ионам натрия, а вторая – к ионам калия. Переход между ними сопровождается изменением сродства белковой молекулы к переносимым катионам. В настоящее время цикл Na/K-АТФазы охарактеризован более подробно. Основные стадии можно описать следующим образом (рис. 50).

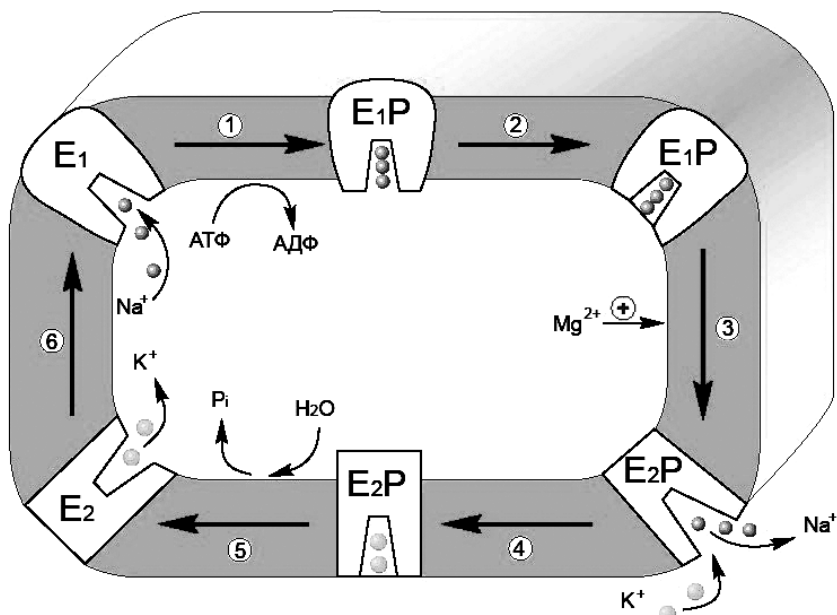


Рис. 50. Реакционный цикл Na/K-АТФазы

Когда фермент находится в состоянии  $E_1$ , он способен взаимодействовать с ионами натрия и АТФ с внутренней стороны мембраны. В результате фосфорилирования молекулы образуется  $E_1P$ , а АДФ высвобождается из активного центра и возвращается в цитоплазму.

Фосфорилированный белок переходит в состояние, при котором ионы натрия не способны высвободиться ни по внутреннюю, ни по внешнюю стороны мембраны – они недоступны для обмена, окклюдируются.

Переход фермента в следующую стадию активируется ионами магния. Хотя специальных центров связывания магния на молекуле фермента не обнаружено, его эффект очень важен – он заключается в ускорении перехода фосфорилированного фермента из конформации  $E_1$  в конформацию  $E_2$ . Эта стадия отражает молекулярные перемещения отдельных частей белковой глобулы, связанные с непосредственным переносом

ионов натрия через мембрану. Таким образом, этот процесс осуществляется синхронно с конформационным переходом  $E_1 - E_2$ . Вследствие этого окружение центра связывания ионов становится более гидрофобным, и ионы натрия диссоциируют от фермента по другую сторону мембраны, где с этим же центром связываются ионы калия. Калий подвергается такой же окклюзии, что и натрий, и в ходе этого процесса осуществляется перенос ионов калия через мембрану.

Конформационная перестройка, претерпеваемая белком при переходе  $E_1 - E_2$ , обеспечивает перестройку ионных центров и последующее перемещение петли, содержащей центр связывания ионов, внутрь мембраны. Это приводит к изменению сродства к переносимым ионам и одновременно делает ионный центр доступным для внешней или внутренней среды.

Комплекс  $E_2P$  отличается от своего предшественника тем, что окружение фосфатной группировки становится более гидрофильным и фосфат оказывается доступным для атаки молекулой воды. Происходит водный гидролиз  $E-P$  (дефосфорилирование фосфофермента) и высвобождение неорганического фосфата во внутриклеточную среду. После этого ионы калия также диссоциируют от центра связывания, высвобождаясь в цитоплазму. Последняя стадия цикла одновременно подготавливает фермент для начала нового цикла – конформер  $E_2$  превращается в конформер  $E_1$ , вновь приобретающий способность взаимодействовать с ионами натрия. Этот процесс ускоряется АТФ, повышающим сродство фермента к натрию и понижающим его сродство к калию.

Таким образом, за полный гидролитический цикл происходят выброс из клетки трех ионов натрия, обогащение цитоплазмы двумя ионами калия и гидролиз одной молекулы АТФ. Так происходит активный транспорт ионов натрия из клетки и калия в клетку, а энергия АТФ тратится на оплату перехода фермента из одной конформации в другую. Таким образом, в ходе ферментативного процесса перенос ионов натрия и калия осуществляется одним и тем же ионным центром фермента, последовательно изменяющим

свое сродство к переносимым ионам при изменении конформации Na/K-АТФазы.

Ионные центры фермента расположены в петле между 2 и 3  $\alpha$ -спиральными участками фермента, пересекающими мембрану. Взаимодействие ионов с этими центрами обеспечивается благодаря координационным связям с атомами кислорода, принадлежащими дикарбоновым аминокислотам белка – аспарагиновой и глутаминовой. В образовании координационных связей с ионами должны принимать участие 12 атомов кислорода карбоксильных групп дикарбоновых аминокислот белка. Точная упаковка этой петли не установлена, однако в ее состав входят 15 дикарбоновых аминокислот, так что выбор групп для образования центра связывания ионов вполне достаточен.

Кислород способен осуществлять координационные взаимодействия с лигандами, образуя решетку одного из двух типов. В одном случае получается рыхлая и доступная для молекул воды структура, а в другом атомы упакованы более плотно и не доступны для гидрофильных группировок. В первом случае ионный центр может связать три иона натрия, а во втором – два иона калия. Этим и объясняется тот факт, что при гидролизе одной молекулы АТФ фермент обменивает три иона натрия на два иона калия (рис. 51).

Оценивая размеры белковых глобул Na/K-АТФазы на электронно-микроскопических фотографиях, исследователи обнаружили, что размеры фермента превышают молекулярную массу протомера, рассчитанную из его первичной структуры. Это противоречие можно было объяснить таким образом, что отдельные функциональные единицы фермента в мембране (протомеры) «сплываются», образуя более крупные ансамбли из нескольких молекул, называемые *олигомерами*. Если допустить в первом приближении, что каждая функциональная единица Na/K-АТФазы представляет собой пронизывающий мембрану цилиндр, то электронно-микроскопические размеры белковых глобул соответствуют тому, что в состав белкового олигомера входят четыре таких цилиндра – ( $\alpha + \beta$ )-протомера.

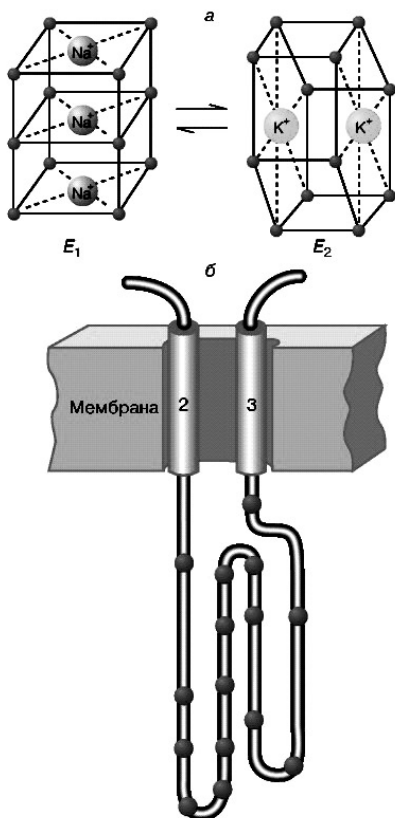


Рис. 51. Связывание ионов натрия и калия в ионных центрах фермента

а – кристаллическая решетка, создаваемая 12 кислородными атомами дикарбоновых аминокислот в конформации, соответствующей связыванию трех ионов Натрия ( $E_1$ ) или двух ионов калия ( $E_2$ ); б – петля между 2 и 3 колоннами пептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы, участвующая в формировании ионного центра (точками указана локализация дикарбоновых аминокислот). Вдвигание петли между 2 и 3 колоннами при конформационном переходе фермента обеспечивает изменение доступности для ионов ионного центра с наружной или внутренней стороны мембраны.

Сопоставление скоростей реакции, катализируемой ферментом, работающим в виде олигомерного ансамбля (при гидролизе АТФ) или в виде независимых протомеров (при гидролизе других субстратов, например, ГТФ), показывает, что, объединяясь в ансамбли, молекулы фермента демонстрируют большую скорость функционирования. В этом и заключается биологическое значение олигомерной структуры фермента. Интересно, что олигомеры образуются лишь в случае использования АТФ. Это показывает, что кроме роли источника энергии АТФ может выполнять в клетке дополнительную регулирующую роль, которая заключается в синхронизации



зации работы отдельных протомеров Na/K-АТФазы в виде олигомерного ансамбля.

Активность Na/K-АТФазы в клетке регулируется многими факторами. На первом месте стоят соотношение Na/K и доступность АТФ – это факторы так называемой краткосрочной регуляции активности. Содержание АТФ в клетке, как правило, мало изменяется в нормальных условиях, хотя может резко снижаться при патологических нарушениях. В таком случае снижение уровня АТФ будет критическим для поддержания достаточной активности Na/K-насоса. Соотношение Na/K в клетках зависит от многих факторов и, в свою очередь, является фактором, регулирующим функционирование Na/K-насоса.

В клетке Na/K-АТФаза подвергается фосфорилированию рядом протеинкиназ (ферментов, которые переносят терминальный фосфат АТФ на белки-мишени и тем самым модифицируют их активность). Установлено, что в молекуле Na/K-АТФазы протеинкиназы могут фосфорилировать остатки *треонина* или *серина*. Эти фосфорилирующиеся участки расположены вне активного центра; функциональное значение данного явления окончательно не установлено. Показано, что фосфорилирование Na/K-АТФазы протеинкиназами уменьшает ее активность. Возможно, что механизм подавления активности вызывается стерическим препятствованием фосфорилированного протомера образовать олигомерный ансамбль. Таким образом, этот пример можно считать иллюстрацией долгосрочной регуляции активности. Восстановить свою активность после атаки протеинкиназ Na/K-АТФаза может при помощи других регуляторных ферментов – фосфатаз, которые обеспечивают дефосфорилирование белков. К долгосрочным механизмам можно отнести и гормональную регуляцию синтеза Na/K-АТФазы, осуществляющуюся на уровне генетического аппарата (например, активацию синтеза фермента гормоном, регулирующим минеральный обмен, – *альдостероном*).

Интересную проблему представляет ингибирование Na/K-АТФазы сердца *убаином* и другими сердечными гликозидами. Механизм действия убаина и родственных ему алкалоидов

растительного происхождения на организм человека и животных был долгое время неясным, хотя их длительное применение в медицине в качестве кардиотонических препаратов оправдывало присвоение им названия сердечных гликозидов. Изоформа Na/K-АТФазы, обнаруживаемая в клетках сердца, гораздо более чувствительна к убаину, чем, например, изоформа фермента, обнаруживаемая в почечной ткани. Причины различий сродства к убаину разных изоформ фермента кроется в первичной структуре – точечные замены делают  $\alpha 1$ -субъединицу резистентной, а  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  – чувствительными к нему. Благодаря этому ткани, содержащие убаин-чувствительные формы фермента (сердечная мышца, мозг) приобретают способность реагировать как на экзогенные, так и на эндогенные гликозиды, избирательно понижающие насосные функции клеток.

Биологическое значение наличия убаин-чувствительных форм Na-насоса разнообразно. Одна из форм участия этого фермента в передаче внутриклеточных сигналов будет рассмотрена ниже. Здесь мы обратим внимание на то обстоятельство, что, как правило, убаин-чувствительная АТФаза экспрессируется в тех же клетках, в которых имеется Na/Ca-обменник. Частичное ингибирование Na-насоса приводит к росту внутриклеточного уровня натрия и позволяет восстановить уровень внутриклеточного кальция с помощью этого механизма. Вот почему применение убаин-подобных лекарственных препаратов (например, экстракта наперстянки) устраняет сердечную недостаточность.

#### 6.4.2. $H^+$ -АТФаза

$H^+$ -АТФаза использует энергию, освобождающуюся при гидролизе АТФ для того, чтобы переносить через клеточную мембрану ионы водорода. Особая роль  $H^+$ -АТФазы у растений заключается в том, что, выкачивая протоны из клетки наружу, она не только поддерживает рН цитоплазмы близкий к нейтральному (что очень важно для протекания многих ферментативных процессов), но и создает на мембране разность потенциалов, во многом определяя электрические свойства высших растений. В отличие от этого  $H^+$ -АТФаза лизосом

животных и вакуоли растений выкачивает протоны из цитоплазмы, но не наружу, а в эти компартменты клетки.

$H^+$ -АТФаза – это интегральный белок, полипептидная цепь которого так же, как и  $Na/K$ -АТФаза, десять раз пересекает поверхность (плазматическую) мембрану. Молекулярная масса одной субъединицы фермента – 104 кД. Полагают, что в мембране  $H^+$ -АТФаза функционирует в виде олигомера и состоит из двух субъединиц. В молекуле  $H^+$ -АТФазы различают несколько доменов, из которых основные – это домен, связывающий АТФ

четырьмя местами связывания, и домен, имеющий отношение к переносу протона (включающий протонный канал). Истинным субстратом  $H^+$ -АТФазы, как и для  $Na/K$ -АТФазы, является не сама АТФ, а ее комплекс с магнием ( $Mg$ -АТФ). В процессе работы  $H^+$ -АТФаза подвергается фосфорилированию – дефосфорилированию и обратимо меняет свою конформацию:

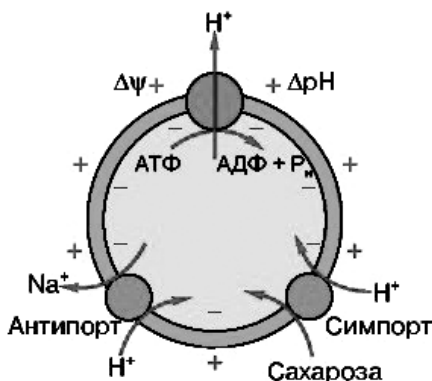
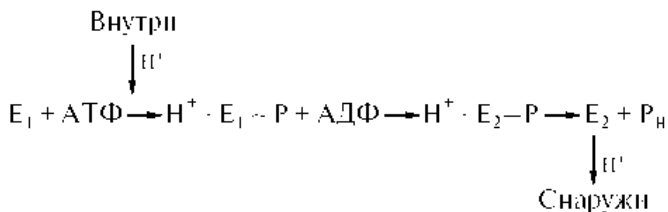


Рис. 52. Роль  $H^+$ -АТФазы во вторично активном транспорте

$H^+$ -АТФаза создает на мембране градиенты. Системы вторично активного транспорта используют их для переноса внутрь клетки протона и веществ (симпорт) или протона внутрь и веществ наружу (антипорт).



При этом она переходит из формы  $E_1$  в форму  $E_2$ . В форме  $E_1$  она связывает протон на внутренней стороне мембраны, а в форме  $E_2$  освобождает его на наружной стороне. На  $1 \text{ мкм}^2$  поверхности мембраны приходится  $10^4$  молекул  $H^+$ -АТФазы. Каждая молекула работает со скоростью от 20 до 100 оборотов в секунду и переносит от  $10^5$  до  $10^6$  протонов в секунду на  $1 \text{ мкм}^2$ . Как правило, отношение количества перенесенных протонов к количеству гидролизованных молекул АТФ равно 1.

С функционированием  $H^+$ -АТФазы в растительной клетке связана работа вторичных систем активного транспорта (рис. 52).  $H^+$ -АТФаза путем генерации электрического и концентрационного градиентов обеспечивает энергией работу самых разнообразных систем вторичного активного транспорта, находящихся в клеточной и вакуолярной мембранах.

#### 6.4.3. *Ca-АТФазы*

Кальциевые АТФазы, входящие в состав цитоплазматических или внутриклеточных мембран, различаются по ряду свойств. Все они представляют собой мономерные белки, то есть состоят из единственной полипептидной цепи, хотя несколько различаются по молекулярной массе. Так,  $Ca$ -АТФаза саркоплазматического ретикулума имеет молекулярную массу 108 кД, а  $Ca$ -АТФаза плазматической мембраны – 120 кД. Хотя они имеют определенную гомологию в структуре и безусловно близки по функциональным свойствам, интересно отметить, что они образуются при участии различных генов. И в каждом случае в образование молекулы насоса вовлекается несколько генов.

Лучше всего изучена  $Ca$ -АТФаза саркоплазматического ретикулума поперечнополосатых мышц. В общих чертах расшифрована последовательность стадий при работе  $Ca$ -АТФазы (рис. 53).

Работа насоса замечательна тем, что стадии гидролиза АТФ чередуются со стадиями переноса  $Ca^{2+}$ : связывание двух ионов кальция на поверхности АТФазы, обращенной в цитоплазму; связывание на той же поверхности молекулы АТФ; фосфорилирование белка (образование EP) и высвобождение АДФ; высвобождение ионов кальция с поверхности АТФазы, происходя-

щее во внутреннюю полость СР; гидролиз фосфатной связи; переход молекулы фермента в исходное состояние (центры связывания кальция оказываются опять на цитоплазматической стороне СР).

Са-АТФаза саркоплазматического ретикулула скелетных мышц пронизывает мембрану (рис. 54). Более короткая петля расположена между 2 и 3, более длинная – между 4 и 5  $\alpha$ -спиралями. Длинная петля содержит АТФ-связывающий участок, включающий остаток аспарагиновой кислоты, к которому присоединяется фосфат. Связывание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  происходит на участке, образованном малой петлей (между 2 и 3  $\alpha$ -спиралями), возможно, с участием аминокислотных остатков, прилежащих к 1 и 4 спиралям. В местах связывания собрано несколько остатков аспарагиновой кислоты, несущих отрицательные заряды.

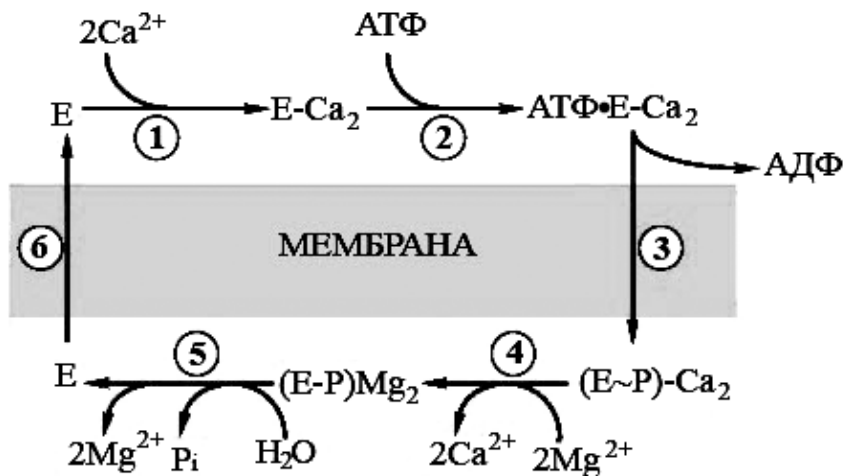


Рис. 53. Цикл работы Са-АТФазы

1 – связывание ионов кальция, 2 – связывание АТФ, 3 – образование фосфофермента, 4 – отщепление ионов кальция, 5 – гидролиз фосфофермента, 6 – возвращение фермента в исходное состояние.

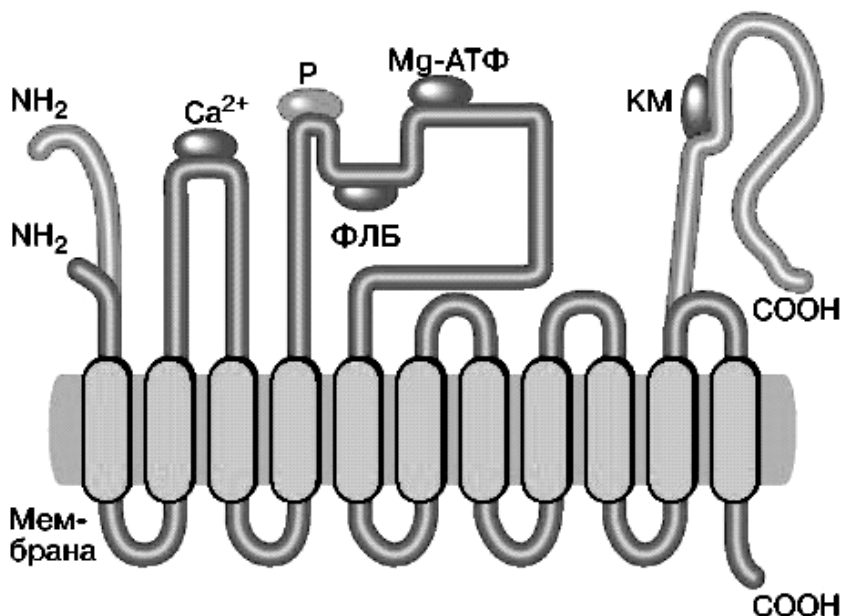


Рис. 54. Общая схема строения Са - АТФазы

Белая линия – полипептидная цепь Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума, серая – участки цепи Са-АТФазы цитоплазматической мембраны. Цилиндры –  $\alpha$ -спиральные участки, пронизывающие мембрану,  $\text{NH}_2$  – N-конец полипептидной цепи,  $\text{COOH}$  – С-конец. Овалы обозначают участки связывания:  $\text{Ca}^{2+}$  – ионов кальция,  $\text{Mg-АТФ}$  – молекулы АТФ,  $\text{ФЛБ}$  – фосфоламбана (у Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума),  $\text{КМ}$  – кальмодулина (у Са-АТФазы плазматической мембраны),  $\text{Р}$  – участок фосфорилирования.

Са-АТФаза плазматических мембран в отличие от АТФазы СР содержит дополнительную полипептидную петлю, экспонированную в цитоплазму и образуемой С-концом. На этом домене имеется центр связывания *кальмодулина* – регуляторного белка, который помимо других функций регулирует активность Са-АТФазы плазматической мембраны. Белком-регулятором Са-АТФаз эндоплазматических мембран (в частности, СР) является *фосфоламбан*, который присоединяется к Са-АТФазе неподалеку от места фосфори-

лирования и тормозит работу фермента за счет уменьшения сродства участков связывания к  $\text{Ca}^{2+}$ .

Специальные внутриклеточные регуляторные системы контролируют связь фосфоламбана с АТФазой за счет фосфорилирования фосфоламбана специфическими протеинкиназами. Фосфорилированный фосфоламбан не обладает способностью связываться с Са-АТФазой и снижать ее активность. Таким образом, Са-насос в клетке находится под множественным контролем.

Несмотря на противоположное действие, кальмодулин и фосфоламбан имеют схожую структуру – сравнение аминокислотных последовательностей показывает, что многие участки полипептидной цепи у них совпадают.

Обращает на себя внимание, что для всех известных транспортных АТФаз, переносимые ими ионы могут рассматриваться как субстрат наряду с Mg-АТФ. При этом переносимый ион должен рассматриваться с одной стороны мембраны как субстрат, а с другой стороны – как продукт транспортного процесса. Однако такие представления требуют привлечения кинетики двух-субстратных реакций и оказываются слишком сложны для анализа.

## **7. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**

Активные формы кислорода (АФК), накапливающиеся в ходе клеточного метаболизма, исторически привыкли считать вредными веществами, поскольку их чрезмерное накопление приводит к окислительному повреждению клеточных структур и гибели клеток. Таким образом, было постулировано, что как в норме, так и при патологических процессах необходимо ингибировать выработку АФК и снижать активность ПОЛ. Применяемые для этой цели разнообразные антиоксиданты стали усиленно рекомендовать клиницистам. Более того, современные производители разнообразных пищевых добавок особенно подчеркивают, что эти добавки являются сильными антиоксидантами.

Исследования последних лет выявили важное регуляторное участие АФК во многих физиологических и биохимических процессах – регуляции тонуса сосудов, клеточной пролиферации, синтезе простагландинов, в регуляции метаболических процессов в качестве внутриклеточных мессенджеров, а также, конечно, и в микробицидном действии фагоцитов. Неумеренное применение антиоксидантов, в том числе витаминов Е, С, и  $\beta$ -каротина будет затруднять выполнение клеточными АФК вышеуказанных функций.

### ***7.1. СИСТЕМЫ ГЕНЕРАЦИИ И УТИЛИЗАЦИИ АФК И ПРОДУКТОВ ПОЛ***

В основе современных представлений о механизме перекисного окисления липидов лежит выдвинутая в 1887 г. гипотеза А.Н. Баха о возможности непосредственного присоединения молекулярного кислорода к органическим молекулам с образованием гидроперекисей. Субстратом окисления в биологических мембранах являются полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов.



Перекисное окисление липидов (ПОЛ) – сложный процесс, протекающий как в животных, так и в растительных тканях. Он включает в себя активацию и деградацию липидных радикалов, встраивание в липиды предварительного активированного молекулярного кислорода, реорганизацию двойных связей в сопряженных двойных связях и, как следствие, деструкцию мембранных липидов и самих биомембран. В результате развития свободнорадикальных реакций перекисного окисления липидов образуется разнообразных продукты, в том числе спирты, кетоны, альдегиды и эфиры.

Перекисное окисление мембранных фосфолипидов является одним из наиболее распространенных механизмов деструкции мембранных структур, оно регистрируется при развитии целого ряда патологических состояний. Тем не менее, эти процессы протекают и в нормальной клетке и регулируются целым рядом ферментов: НАДФ(Н)-зависимыми микросомальными оксигеназами, циклооксигеназами и липоксигеназами. Продукты перекисного окисления липидов – предшественники синтеза простагландинов, тромбоксанов, простациклина, лейкотриенов и липоксинов.

Схематически процесс перекисного окисления липидов можно представить следующим образом. Атака молекулярного кислорода приводит к образованию перекисного радикала, который может взаимодействовать с другой молекулой липида, разрушает ее с образованием нового липидного радикала. Одним из продуктов этой реакции является гидроперекись липида – сравнительно устойчивое соединение. Кроме этого из перекисного радикала может образовываться эндоперекисный радикал липида, распад которого приводит к формированию ряда продуктов, в том числе малонового диальдегида.

Полиненасыщенные жирные кислоты как в свободном виде, так и в составе липидов могут претерпевать спонтанное перекисное окисление в липидных пленках и в истинных растворах, гомогенных системах, и даже в водных средах, в которых липиды образуют липосомы и монослои, то есть в системах с различными фазами. Скорость липоперекисления зависит от природы субстрата (от ненасыщенности жирных кислот, расположения двойных

связей и т.д.), от температуры, а также от присутствия в системе катализаторов. Наиболее активными катализаторами липопереокисления являются  $\text{Fe}^{2+}$  и аскорбиновая кислота, – природные соединения, присутствующие в клетках и тканях.

Реакции неферментативного свободнорадикального липопереокисления идут по кинетике цепных процессов. Эти свободнорадикальные реакции эффективно ингибируются антиоксидантами – веществами, способными служить ловушками радикалов. К таким соединениям относятся токоферолы, таурин, мелатонин, мочевая кислота, карнозин и некоторые другие природные вещества. Существуют и синтетические соединения, также обладающие мощными антиоксидантными свойствами, среди них наиболее широко известны ионол, пробукол, мексидол и другие. Некоторые из них используются в качестве лекарственных препаратов.

Фосфолипиды в нативных мембранах эффективно защищены от неферментативного перекисного окисления самой структурной организацией мембран, а также специальными антиоксидантными системами, регулирующими концентрации активных форм кислорода в клетке. По этой причине скорость неферментативного липопереокисления в биологических мембранах не коррелирует с насыщенностью фосфолипидов и определяется особенностями структуры окисляемых мембран, наличием в них антиоксидантов и рядом других факторов.

По-видимому, в нативных мембранах неферментативное перекисное окисление не играет существенной физиологической роли. Тем не менее, продукты ПОЛ регистрируются в тканях при ряде патологических процессов. При этом введение в организм антиоксидантов существенно снижает уровень липопереокисления. Однако возможно, что антиоксиданты могут влиять не только на ферментативные системы, связанные с образованием перекисей, но и на ферменты, участвующие в их нейтрализации.

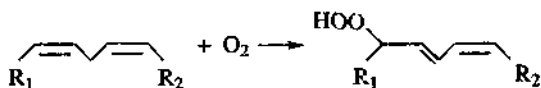
Сравнительно недавно были открыты специфические ферменты, осуществляющие ферментативное перекисное окисление липидов. Сначала эти ферменты были обнаружены в растениях, а затем в некоторых животных тканях. Липоксигеназы животных (впервые обнаруженные в ретикулоцитах), в отличие от растительных ли-

поксигеназ, окисляют не только неэстерифицированные полиненасыщенные жирные кислоты, но и полиеновые кислоты, входящие в состав фосфолипидов. При этом добавление к мембранным препаратам фосфолипазы  $A_2$  резко усиливает липопереокисление. По-видимому, активация эндогенных фосфолипаз является одним из механизмов регуляции липопереокисления *in vivo*.

В микросомах печени существует ферментативная НАДФ(Н)-зависимая система липопереокисления. В этих же мембранных фракциях в опытах *in vitro* легко запускается неферментативное липопереокисление, индуцируемое присутствием ионов  $Fe^{2+}$  и аскорбиновой кислоты.

Известно, что окисление липопротеинов низкой плотности (ЛНП) может индуцироваться металлами переменной валентности (как в свободном так и в связанном состоянии). Однако, влияние металла на интенсивность окисления в значительной степени зависит от того с каким лигандом он связан. Так, белки-транспортеры железа – трансферрин и лактоферрин содержат его в форме, препятствующей взаимодействию с АФК. Среди других белков, являющихся хелаторами железа – гемосидерина, ферредоксина и ферритина, только последний связывает железо недостаточно прочно и может частично предоставлять его для взаимодействия с радикалами кислорода. В этот процесс могут быть вовлечены ферментативные механизмы генерации активированных кислородных метаболитов в клетке: НАДФН-оксидаза, миелопероксидаза, NO-синтаза, липоксигеназы и др. Выявляемые в нативных ЛНП сыворотки крови гидроперекиси свидетельствуют о возможности сорбции последних из клеток тканей. При этом в ЛНП содержится более 65% всех гидроперекисей сыворотки крови, в организме человека они являются главными переносчиками гидроперекисей.

*Липоксигеназы* (КФ 1.13.11.12) катализируют окисление полиненасыщенных жирных кислот с образованием гидропероксидов:



Свободные (неэстерифицированные) жирные кислоты являются предпочтительным субстратом для липоксигеназ. В клетках животных эти ферменты отвечают за синтез лейкотриенов, образующихся при окислении арахидоновой кислоты. Так как субстратом для липоксигеназ являются ненасыщенные жирные кислоты, высвобождающиеся из мембран в результате действия фосфолипазы  $A_2$ , то ингибирование этого фермента снижает окислительную модификацию ЛНП эндотелиоцитами.

Ферментативное перекисное окисление липидов протекает в мембранах эндоплазматического ретикулума и инициируется НАДФ(Н). В реконструированных системах удалось индуцировать ферментативное липопереокисление встроенным в липосомы *флавопротеином* – первым компонентом микросомной цепи окисления. В основе инициации ферментативного липопереокисления лежит активация кислорода в ходе переноса электронов от НАДФ(Н) к флавопротеину. Тем не менее активные формы кислорода могут в определенных условиях образовываться при участии цитохрома  $P_{450}$ . В процессе его функционирования могут образовываться не только перекиси липидов, но и перекись водорода, которая способна инактивировать цитохром  $P_{450}$ . По этой причине семейство цитохрома  $P_{450}$  получило название «ферментов-самоубийц». Такой пример обратной регуляции работы микросомальных ферментов лишний раз подтверждает, что АФК в клетках выполняют сигнальные функции.

Между *липооксигеназной* и *циклооксигеназной* системами существует определенная связь. Эти ферменты обнаруживаются в одних и тех же тканях, имеют общие специфические ингибиторы (например, *эйкозатетраеновую кислоту*), а их селективные ингибиторы, как правило, угнетают обе реакции, но действуют в различных концентрациях.

Неконтролируемое усиление процесса липопереокисления может представлять опасность для клетки, так как может привести к патологии мембран. Поэтому кроме антиоксидантов (регулирующих стационарный уровень АФК) в клетке имеются специальные ферментативные системы, регулирующие уровень липопереокисления. Так, цитохром  $P_{450}$  может выступать в клетке в роли пероксидазы. Глутатионтрансферазы могут восстанавливать органические гидроперекиси, в том числе гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот.

Кроме того, в цитозоле клеток содержатся восстанавливающие перекиси липидов глутатионпероксидазные системы. Существуют ферментативные системы, нейтрализующие АФК, а есть те, что инактивируют перекисные радикалы (рис. 55). В нормально функционирующей клетке уровень утилизации липопероксидов значительно превышает уровень активности систем, генерирующих липоперекисление, поэтому в норме липоперекиси в заметных количествах не накапливаются.

Активность циклооксигеназ и липооксигеназ регулируется продуктами их реакции; небольшие количества перекисей активируют эти ферменты, в то время как накопление продуктов перекисного окисления в значительных количествах может приводить к необратимому ингибированию как циклооксигеназ, так и липооксигеназ. Таким образом, в клетке существует авторегуляция ферментативного ПОЛ. Однако уровень ПОЛ в тканях *in vivo* в определенных условиях может становиться значительным, и начать играть существенную физиологическую роль. Так, ферментативное перекисное окисление липидов запускает механизм «разборки» старых и ненужных мембранных структур.

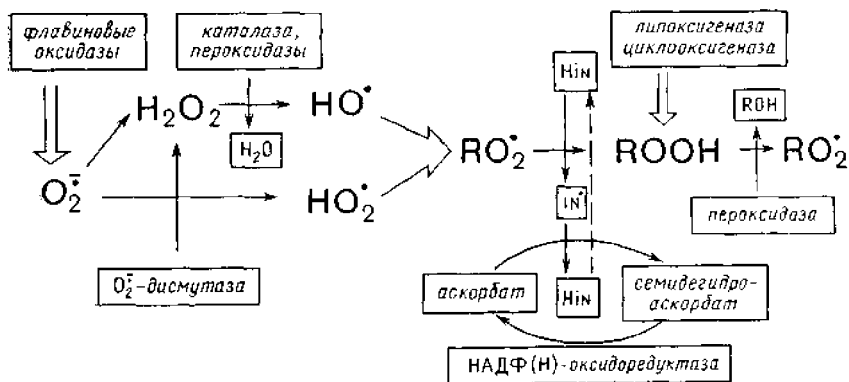


Рис. 55. Схема генерирования и утилизации активных форм кислорода и перекисей липидов ферментативными системами тканей млекопитающих (Зенков и др., 2001)

В живых организмах представлены различные механизмы активации молекулярного кислорода, посредством которых образуется гетерогенный по своим физико-химическим свойствам класс АФК. Общая особенность АФК – высокая реакционная способность и малые значения времен жизни в биологических субстратах (табл.11), что делает их незаменимым инструментом передачи информации на короткие дистанции.

Таблица 11. Характерные значения времен жизни и радиусов диффузии АФК в биологических субстратах

Форма АФК	Время жизни, с	Радиус диффузии, мкм
$O_2^1(\Sigma)$ – синглетный кислород в ( $\Sigma$ ) состоянии	$10^{-12}$	$\sim 0$
$OH^\bullet$ – гидроксильный радикал	$10^{-9}$	$< 0.01$
$O_2^\bullet$ – супероксидный анион-радикал	$10^{-6}$	0.3
$O_2^1$ – синглетный кислород	$10^{-6}$	0.3
$RO^\bullet$ – алкоксильный радикал	$10^{-6}$	Зависит от R
$HO_2^\bullet$ – пергидроксильный радикал	$10^{-3}$	10
$NO_2^\bullet$ – нитроксильный радикал	$10^{-1}$	100
$RO_2^\bullet$ – перекисный радикал	$10^{-2}-10^1$	Зависит от R
$H_2O_2$ – перекись водорода	Зависит от каталазы и глутатионпероксидазы	
$\left. \begin{array}{l} HOCl \\ HOI \\ HOBr \\ HOCN \end{array} \right\}$ галогеновые производные	Зависит от субстрата	

Так, дальное действие  $OH^\bullet$ -радикала (радиус диффузии 23 Å) ограничено размером средней органической молекулы. Анион-радикал  $O_2^\bullet$  и синглетный кислород обладают большим радиусом действия, сравнимым с размером клетки, однако даже на клеточном уровне их эффект строго локализован наличием высокоэффективного ферментативного антиоксиданта – супероксиддисмутазы (СОД), а также таких антиоксидантов, как витамин Е, который «улавливает»  $O_2^\bullet$  на расстоянии  $\sim 50$  Å. Сфера влияния радикалов NO распространяется на соседние клеточные структуры, такие как гладкомышечные стенки сосудов, вызывая их релаксацию, при этом оксид азота принципиально не отличается от гормональных мессенджеров и имеет свой

«рецептор» – растворимую гуанилатциклазу. Хорошим дальнедействием обладает перекись водорода – малореакционная, незаряженная молекула. Однако наибольшим дальнедействием, проявляющимся на тканевом и организменном уровне, обладают продукты радикальных реакций; так, процессы ПОЛ приводят к образованию альдегидов, эпоксидов, липидных перекисей, которые ингибируют синтез ДНК и деление клеток и в то же время индуцируют развитие опухолей. По-видимому, ПОЛ и его продукты, выступая в роли «первичного медиатора» стресса, представляют один из наиболее ранних регуляторных механизмов, который в процессе эволюции трансформировался в ферментативную эйкозаноидную регуляцию.

Супероксид образуется при взаимодействии молекул кислорода с НАДФН-оксидазной системой, а также с восстановленными флавинами, хинонами, тиолами, и в ходе реакции, катализируемой флавин-содержащим ферментом ксантиноксидазой. Супероксид-радикал и образующиеся из него другие формы активированного кислорода, вызывают перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот, окисление SH-групп, разрушение триптофановых остатков в белках, повреждение ДНК, деполимеризацию кислых полисахаридов и другие реакции. Перекись водорода вызывает окисление SH-групп в белках, перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот, однако скорость этих реакций относительно невелика, и главная опасность перекиси водорода для клетки заключается в ее способности генерировать гидроксильный радикал. В клетках супероксидный анион является промежуточным продуктом многих биохимических реакций – таких, как окисление тиолов, флавинов, хинонов, катехоламинов, птеринов, а также метаболизма ксенобиотиков. Однако основные источники его образования – ферментативные системы: НАДФН-оксидаза фагоцитирующих клеток, ксантиноксидаза, митохондриальная цитохром *c* оксидаза и микросомальные монооксигеназы. Наибольшей способностью продуцировать  $O_2^{\cdot -}$  в животных организмах обладают фагоцитирующие клетки.

АФК легко превращаются друг в друга.  $O_2^{\cdot -}$  – малоактивный радикал и не влияет на функционирование большинства ферментов, хотя и может инактивировать некоторые из них. Будучи нуклеофильным соединением,  $O_2^{\cdot -}$  окисляет липопротеины сыворотки и фосфолипиды мембран, что приводит к разрушению эритроцитов, выходу лизосомальных ферментов и образованию цитотоксинов.

Токсичность  $O_2^{\cdot -}$  в отношении клеток и микроорганизмов не вызывает сомнения, ярким примером тому могут служить фагоциты, полученные от больных хроническим гранулематозом. Они не могут восстанавливать кислород и вследствие этого обладают слабой микробицидной активностью. В нейтрофилах больных с синдромом Дауна (трисомия по 21 хромосоме) на 50% повышено содержание Cu,Zn-СОД, в результате чего у них снижен стационарный уровень  $O_2^{\cdot -}$  и, соответственно, микробицидная активность. Вместе с тем, молекулярные механизмы цитотоксичности  $O_2^{\cdot -}$  неясны. Возможно, что сам супероксид-анион не обладает микробицидной активностью, а служит пусковым звеном каскада реакций, приводящих к образованию других форм АФК. В частности, СОД превращает его в  $H_2O_2$ , а миелопероксидаза трансформирует перекись в сильный окислитель гипохлорит (в некотором роде, активную форму хлора). В реакции Габера–Вейса из него образуется гидроксильный радикал, а взаимодействие  $O_2^{\cdot -}$  с оксидом азота ( $NO^{\cdot}$ ) приводит к образованию высокореакционного пероксинитрита ( $ONOO^{\cdot}$ ).

Защита живых организмов от окислительных повреждений не ограничивается ферментативными антиоксидантными системами, а осуществляется также большим количеством репарационных систем, специфическими протеолитическими ферментами, макрофагами и гепатоцитами, эффективно захватывающими окисленные липопротеины через специальные «скэвенджер»-рецепторы. Действие репарационных ферментов направлено на удаление и восстановление поврежденных молекул и структур, иногда их называют вторичной антиоксидантной системой. Как правило, с возрастом активность репарационных систем снижается, что является одной из причин накопления поломок биологических структур в пожилом возрасте. Свободнорадикальная теория старения имеет много веских аргументов.



Клетки снабжены рядом ферментов, осуществляющих реконструкцию поврежденных или измененных под действием АФК составных элементов мембраны. Опосредованное фосфолипазами удаление из мембраны поврежденных фосфолипидов – эффективный способ поддержания ее динамической целостности, позволяющий регулировать оборот мембранных липидов. Перекисное окисление липидов стимулирует липолитическую активность мембранной фосфолипазы  $A_2$ , так как окисленные фосфолипиды являются для нее более предпочтительным субстратом, чем нативные. Такая избирательность фосфолипазы  $A_2$  имеет важное физиологическое значение для процессов репарации и детоксикации мембран.

В организме  $\alpha$ -токоферол защищает липопротеины от окисления совместно с водорастворимыми антиоксидантами: витамином С и мочевой кислотой. Липофильный  $\alpha$ -токоферол эффективно взаимодействует с перекисными радикалами липидов и образует  $\alpha$ -токоферильный радикал. Витамин С может восстанавливать  $\alpha$ -токоферильный радикал, возвращая ему антиоксидантные свойства, при этом пара аскорбат/ $\alpha$ -токоферол позволяет выводить радикалы из липидной фазы в водную фазу.

Следует обратить внимание, что в организм животных и человека токоферолы попадают только с растительной пищей – существенный регулятор метаболизма, выполняющий функции не только антиоксиданта, получается из растительной пищи. Многие животные и человек не в состоянии синтезировать аскорбиновую кислоту. Через такие ключевые метаболиты мир растений и мир животных демонстрирует взаимозависимость.

Среди водорастворимых антиоксидантов (аскорбиновая и мочевая кислоты, билирубин, тиоловые белки) наиболее выраженным защитным эффектом против окисления ЛНП обладала аскорбиновая кислота.

Сходным по свойствам с  $\alpha$ -токоферолом является убихинол или коэнзим Q. Хотя содержание убихинола в ниже, чем содержание токоферола, и скорость его взаимодействия с перекисными радикалами меньше, чем у  $\alpha$ -токоферола, однако он может перехватывать радикалы  $\alpha$ -токоферола и эффективно

переводить радикалы из липидной фазы в водную, взаимодействуя непосредственно с молекулярным кислородом.

## 7.2. УЧАСТИЕ АФК В ЛЕЙКОЦИТАРНОМ ВЗРЫВЕ И СИНТЕЗЕ ПРОСТАГЛАНДИНОВ

Как уже отмечалось выше, в ряде случаев усиление генерации АФК является физиологически нормальной реакцией. Для объяснения прямой зависимости микробицидного, цитотоксического и мутагенного действия фагоцитов от активности ферментативных систем образования АФК предложено несколько механизмов (рис. 56).

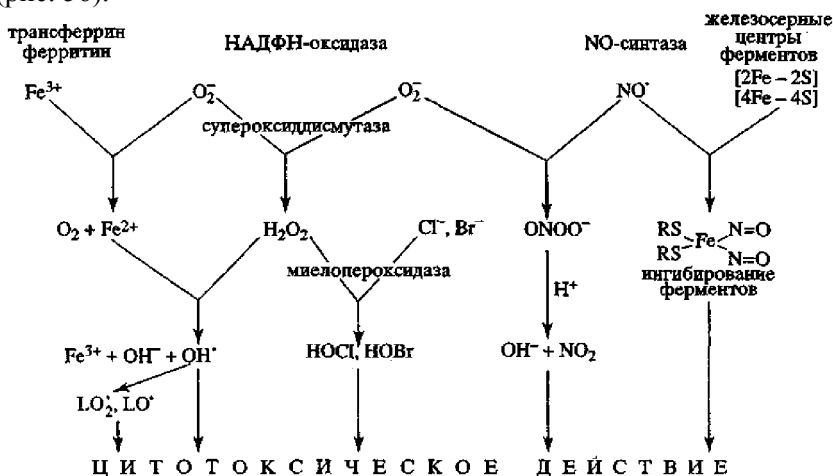


Рис. 56. Механизмы цитотоксического действия АФК

При стимуляции фагоцитирующих клеток в результате активации НАДФН-оксидазы наблюдается резкое усиление продукции  $\text{O}_2^-$  (так,  $10^4$  гранулоцитов могут синтезировать 10 нмоль/час радикалов или около 200 миллионов молекул  $\text{O}_2^-$  в секунду на клетку). Мы отмечали, что супероксид-анион не обладает непосредственной микробицидной активностью, а является триггером каскада реакций, приводящих к образованию

других более реакционно способных форм АФК и пероксинитрита. В присутствии СОД  $O_2^{\cdot -}$  быстро переходит в  $H_2O_2$ , а в реакциях с металлами переменной валентности из  $O_2^{\cdot -}$  образуются синглетный кислород и гидроксильный радикал. Гидроксильные радикалы вызывают повреждение нуклеиновых кислот, белков (прежде всего мембранных) и индуцируют образование органических радикалов.

НАДФН-оксидаза (КФ 1.6.99.6) фагоцитирующих клеток является ферментативным комплексом, специализированным на восстановлении молекулярного кислорода с образованием  $O_2^{\cdot -}$  (при стимуляции нейтрофилов около 90% потребляемого  $O_2$  идет на образование супероксидного аниона). Фермент представляет собой многокомпонентную систему, состоящую из мембрансвязанных и цитозольных компонентов. Мембрансвязанный низкопотенциальный цитохром  $b_{558}$  состоит из 2 субъединиц  $\alpha$  и  $\beta$  с молекулярными массами 22 кДа и 91 кДа ( $p22^{phox}$  и  $gp91^{phox}$ , соответственно;  $phox$  – от *phagocyte oxidase*); их стехиометрическое соотношение составляет 1:1.  $\alpha$ -Субъединица содержит гем,  $\beta$ -субъединица, по последним данным, представляет собой ФАД-содержащий флавопротеин. В нестимулированных нейтрофилах человека 85% цитохрома  $b_{558}$  локализовано на мембранах специфических гранул и около 5% – на цитоплазматической мембране, остальные 10% связаны с секреторными везикулами. Для генерации  $O_2^{\cdot -}$  также необходимы два цитозольных белка с молекулярными массами 47 и 67 кДа ( $p47^{phox}$  и  $p67^{phox}$  соответственно), которые в покоящейся клетке находятся в виде комплекса с третьим 40 кДа цитоплазматическим белком ( $p40^{phox}$ ); молекулярная масса комплекса составляет 240–250 кДа. Генетически обусловленное отсутствие или дисфункция любого из компонентов  $p22^{phox}$ ,  $gp91^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  и  $p67^{phox}$  приводит к потере способности НАДФН-оксидазы генерировать  $O_2^{\cdot -}$  и лежит в основе хронического гранулематоза. В активации НАДФН-оксидазы участвуют мембранный ГТФ-связывающий белок (G-белок)  $Rap-1A$  и цитозольные белки из семейства малых цитозольных G-белков  $p21^{rac1}$  и  $p21^{rac2}$ ; последний в покоящейся клетке

комплексируется с ингибитором диссоциации Rho ГДФ (GDI) в гетеродимер с молекулярной массой 45–50 кДа и у человека представляет собой преобладающую форму ГТФаз, связывающихся с  $p40^{\text{phox}}$ . В то же время не выявлено случаев хронического гранулематоза, обусловленного отсутствием или аномальной функцией G-белков, также как и цитозольного компонента  $p40^{\text{phox}}$ .

При стимуляции фагоцитов происходит быстрая самосборка из мембранных и цитозольных компонентов НАДФН-оксидазного комплекса (рис. 57), осуществляющего перенос электрона с цитозольного НАДФН на  $O_2$  с образованием  $O_2^-$ . Индукция хемотаксическими пептидами происходит в течение 2 с. Цитохимическое изучение клеточных компартментов, в которых в нейтрофилах осуществляется продукция  $O_2^-$  показало, что уже через 1 мин после стимуляции большая часть НАДФН-оксидазной активности обнаруживается на внутриклеточных цилиндрических гранулах, содержащих также щелочную фосфатазу; в последующем (через 5 мин) основная активность НАДФН-оксидазы локализуется на внешней стороне цитоплазматической мембраны, попадая туда в результате экзоцитоза  $O_2^-$ -продуцирующих гранул.

Как уже упоминалось выше, ферментативный синтез перекисей липидов играет важную роль, поскольку предшествует образованию биологически активных соединений. Свободные полиненасыщенные жирные кислоты могут окисляться по двум независимым путям: циклогеназному и липоксигеназному. Так, например, при циклогеназном окислении арахидоновой кислоты образуются циклические эндоперекиси – *простагландины*  $G_2$  и  $H_2$ , служащие метаболитами предшественниками различных классов простагландинов ( $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGD_2$ ), *тромбоксанов* ( $TXA_2$ ,  $TXB_2$ ) и *простаглина* ( $PGI_2$ ). При липоксигеназном окислении арахидоновой кислоты образуются алифатические гидроперекиси – гидропероксиэйкозатетраеновые кислоты – промежуточные продукты биосинтеза *лейкотриенов*.

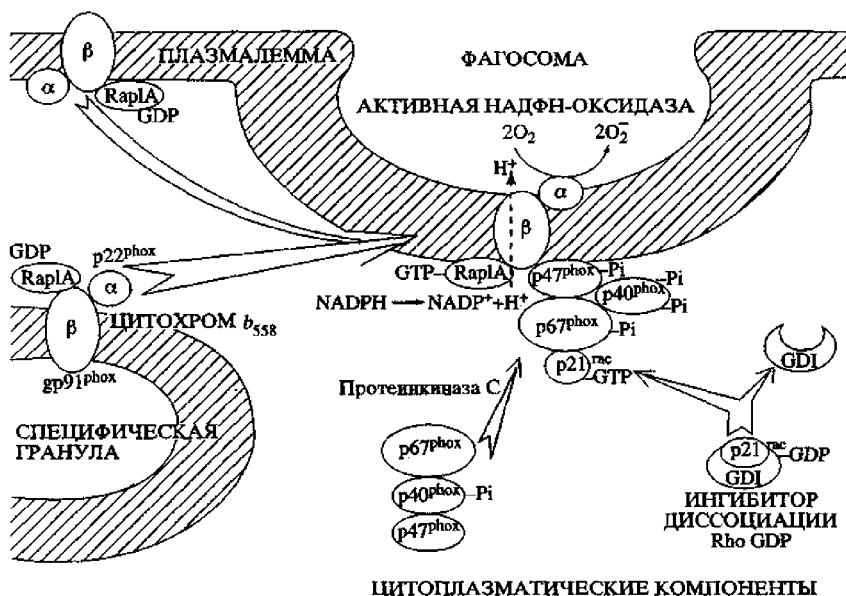


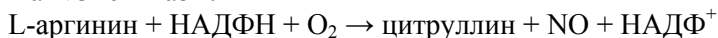
Рис. 57. Самосборка НАДФН-оксидазного комплекса при активации фагоцитов (Зенков и др., 2001)

В ходе эволюции аэробных организмов выработалась регуляторная система, обеспечивающая связь между ферментативными и неферментативными механизмами утилизации кислорода, защиты от вредного действия его высокореакционных форм и продуктов свободнорадикальной и перекисной природы, а также способами восстановления поврежденных биомолекул (ДНК, белков, липидов) и клеточных структур. Динамический баланс между этими процессами позволяет нормально функционировать биологическим системам, а его нарушение, приводящее к усилению синтеза АФК и/или антиоксидантной недостаточности, ведет к окислительному стрессу.

### **7.3. АФК И ПРОДУКТЫ ПОЛ КАК СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ**

В последние годы выявлен широкий спектр физиологических эффектов АФК, к которым, прежде всего, относятся регуляция клеточной пролиферации и тонуса сосудов, индукция транскрипции определенных генов. Показано функционирование АФК в качестве вторичных внутриклеточных мессенджеров. Так, АФК непосредственно участвуют в активации онкогенов, а также гена, кодирующего главную форму фактора транскрипции AP-1, в ответ на ионизирующую радиацию.  $O_2^{\cdot -}$  и  $H_2O_2$  активируют фактор транскрипции NFκB, который вызывает экспрессию генов, кодирующих ряд цитокинов и вирусов, в том числе ВИЧ, а NO<sup>•</sup> подавляет активацию NFκB, увеличивая индукцию ингибитора фактора транскрипции NFκB и стабилизируя его. В индукции синтеза белков теплового шока, повышающих резистентность клеток к высоким температурам, радиации, токсическому действию ионов тяжелых металлов и лекарственных препаратов, основная роль отводится перекиси водорода. NO\* и CO\* связываются с гемовой частью гуанилатциклазы и обратимо изменяют синтез цГМФ, тем самым управляя работой этих важных внутриклеточных регуляторов внутриклеточной коммуникации.

Одним из наиболее изученных факторов межклеточных сигнализации является оксид азота (нитроксид, NO-радикал), образующийся из L-аргинина и молекулярного кислорода с помощью фермента NO-синтазы:



Радикал NO является важнейшим нейромедиатором, интермедиатом иммунной системы и регулятором сердечно-сосудистой системы человека. В животном организме NO работает как вторичный мессенджер и в периферической, и центральной нервной системе.

Существуют две основные формы NO-синтазы – конституционная, выделенная главным образом из эндотелия и нейронов, и индуцибельная, выделенная из макрофагов, гладких мышц и печени. Они отличаются по структуре и способу регуляции. Конституционная NO-синтаза постоянно присутствует в клетках и ее актив-

ность находится в прямой зависимости от уровня ионов  $\text{Ca}$ , а регуляция осуществляется через кальмодулин, являющийся кофактором этого фермента. Индуцибельная форма не зависит от содержания кальция и транскрипционно регулируется. Эта форма индуцируется в макрофагах, гладких мышцах, гепатоцитах, нейтрофилах и других клетках под действием эндо- и экзотоксинов, цитокининов и продуцирует большое количество  $\text{NO}^{\bullet}$  в течение длительного времени. Последнее свойство важно, как основа адаптации клеток к изменяющимся условиям функционирования.

В результате повышения концентрации  $\text{NO}$  активируется цитозольная гуанилатциклаза, катализирующая превращение ГТФ в цГМФ, который активирует специфическую протеинкиназу (G-киназу) или непосредственно, или с помощью дополнительного сигнального пути, включающего еще один вторичный мессенджер – аденозиндифосфатрибозу. Последняя открывает  $\text{Ca}$ -каналы внутриклеточных  $\text{Ca}$ -депо, в результате чего повышается концентрация кальция в цитозоле, активируются  $\text{Ca}$ -зависимые протеинкиназы, фосфорилируется белковый фактор регуляции транскрипции и начинается синтез белков теплового шока, обеспечивающих клеточную защиту.

Оксид азота обладает широким спектром биологического действия. Он участвует в межклеточной сигнализации в центральной и периферической нервных систем. Его идентифицируют с эндотелиальным фактором релаксации, расслабляющим гладкие мышцы и предотвращающим агрегацию тромбоцитов и адгезию нейтрофилов к эндотелию. Его синтез фагоцитирующими клетками регулирует пролиферацию лимфоцитов. Он вносит вклад в, микробицидное и противоопухолевое действие фагоцитов.

Более того нитроксид является регулятором внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и, соответственно, активности ряда  $\text{Ca}$ -зависимых ферментов.

Источником  $\text{NO}$  в центральной и периферической нервной системе являются эндотелиоциты сосудов, клетки микроглии и астроциты, неадренергические нервные волокна и глутаматэргические нейроны (рис. 58).

Функции нейронального NO чрезвычайно разнообразны: он контролирует осцилляторную активность нейронов, является медиатором *ноцицепции*, участвует в формировании циркадных ритмов процессах термогенеза, обоняния, принятия пищи и воды, снижает тревожность, регулирует выход нейромедиаторов; играет существенную роль в процессах потенциации и, соответственно, долговременной памяти. Нейрональный NO является важнейшим вторичным мессенджером, с помощью которых нервная система управляет тонусом сосудов, снабжающих кровью все системы ор-

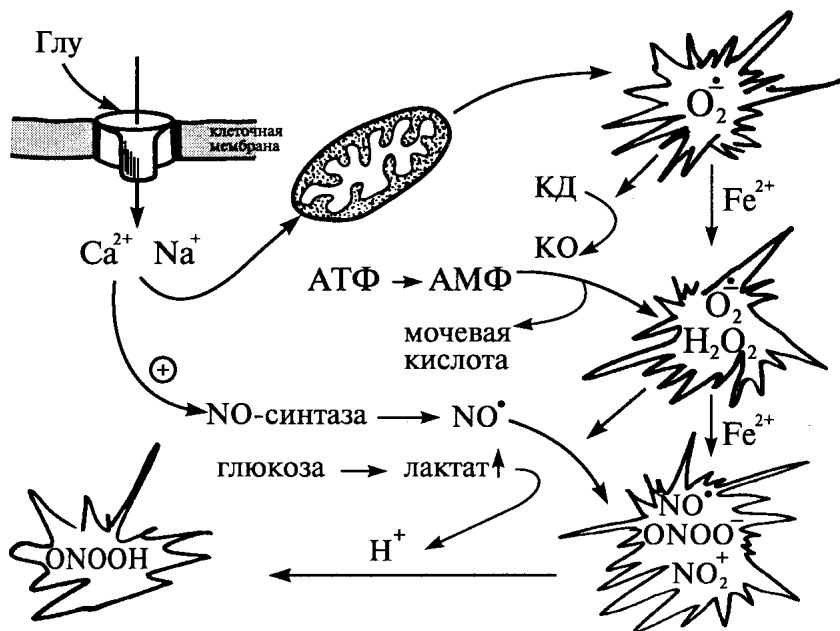


Рис. 58. Увеличению концентрации АФК в результате активации глутаматных рецепторов нейронов (Болдырев, 1998)

АФК генерируются митохондриями (дыхательная цепь), цитоплазматическими ферментами (ксантинооксидаза), а также в результате их взаимопревращений в условиях ацидоза и высвобождения ионов железа из связанного состояния.



ганизма, причем он может действовать как непосредственно, так и опосредованно (например, стимулируя высвобождение вазопрессина). Показано участие оксида азота, выделяющегося в синоатриальном узле, в автономном контроле сердцебиения.

Снижение содержания цитоплазматического цГМФ при активации клеточных рецепторов L-глутаматом и его производными является NO-зависимым процессом. В зависимости от уровня NO он может или ингибировать, или потенцировать высвобождение глутамата и аспартата, тем самым защищая нейроны от *эксайтотоксических эффектов* медиатора. Избыточная продукция или недостаточно быстрая нейтрализация глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, выполняющих роль возбуждающих медиаторов в нейронах, приводит к нейротоксическим эффектам. В основе токсического действия лежит стимуляция АФК, способная приводить к окислительному повреждению тканей. Кроме того, NO защищает головной мозг от ишемических и нейротоксических инсультов, контролирует осцилляторную активность нейронов.

#### **7.4. НАРУШЕНИЯ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР, СВЯЗАННЫЕ С ПОВЫШЕНИЕМ КОНЦЕНТРАЦИИ АФК**

Все формы АФК при повышении их стационарного уровня проявляют высокую цитотоксичность в отношении любых типов клеток. Можно выделить четыре наиболее вероятных мишени окислительной цитотоксической атаки АФК: повреждение мембраносвязанных белков, индукция процессов ПОЛ в биологических мембранах, инактивация цитозольных ферментов и повреждение митохондриальной и ядерной ДНК (первая является более уязвимой, поскольку лишена гистонов, проявляющих стабилизирующее действие). Действие АФК на любой из перечисленных видов макромолекул может стать критическим для жизнедеятельности клетки.

Окислению АФК в первую очередь подвергаются SH-содержащие группы белков. Основную опасность АФК представляют для транспортных АТФаз, содержащих SH-группы -  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы (ее повреждение приводит к нарушению транспорта ионов кальция

через мембрану) и Na/K-АТФазы (ее подавление губительно сказывается на гомеостазе одновалентных катионов клетки).

Массированное окисление мембранных липидов приводит к необратимому повреждению мембранных структур, нарушению их проницаемости для ионов. Наиболее подвержены перекисно-му окислению входящие в состав мембран ненасыщенные жирные кислоты: линолевая, арахидоновая, докозагексаеновая. Окисление липидов приводит к образованию их гидроперекисей и вызывает приток молекул воды в поврежденные зоны бислоя. В числе продуктов ПОЛ – токсичные и мутагенные альдегиды (рис. 59). Так, главный продукт окисления арахидоновой кислоты, 4-гидроксинаоненаль может сшивать белковые молекулы, на-

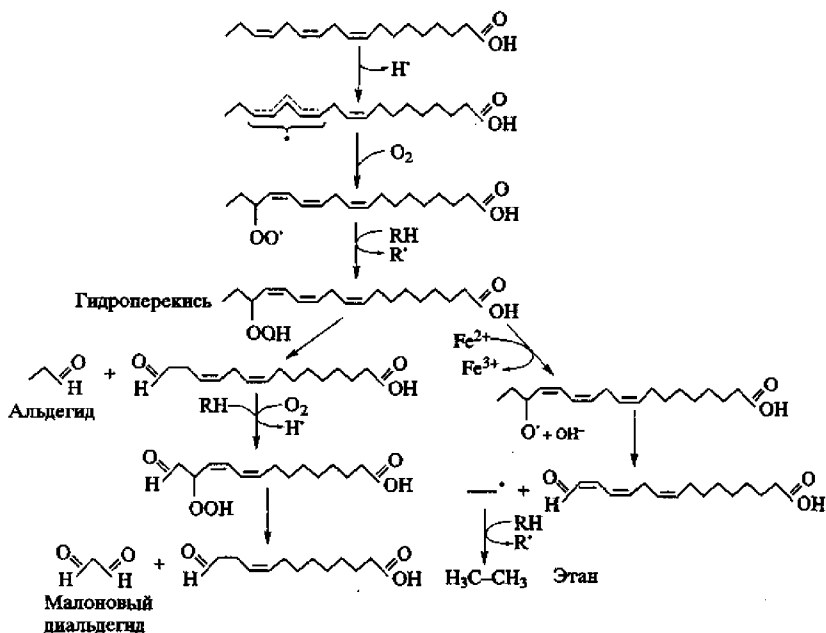


Рис. 59. Схематическое изображение свободнорадикального окисления линолевой кислоты и образующихся при окислении продуктов

рушая их структуру и функционирование. Он обладает цитотоксическим и мутагенным действием.

При изучении свободнорадикального окисления особое внимание уделяется липопротеинам низкой плотности (ЛНП, см. ниже), ибо эти частицы в отличие от липопротеинов высокой плотности, при окислительной модификации могут становиться цитотоксичными. Повышение уровня АФК в плазме крови вызывает окислительную модификацию ЛНП, и создавать потенциальную угрозу организму. На страже этого процесса стоят макрофаги, улавливающие такие опасные ЛНП своими рецепторами и нейтрализующие их.

Одним из заболеваний, начинающихся при недостаточной защитной деятельности макрофагов, является атеросклероз – хроническое заболевание артерий, сопровождающееся образованием утолщений стенки артерий (бляшек), суживающих просвет сосудов и способствующих тромбообразованию. Это – широко распространенное заболевание: около половины всех людей, живущих в цивилизованных странах, умирают от осложнений атеросклеротического процесса в сосудах различных органов (инфарктов, инсультов и др.).

Начинается атеросклероз в результате структурных изменений в интиме (внутреннем слое) и в меди (мышечном слое) сосудистой выстилки артерий, которые на первом этапе характеризуются накоплением холестерина в составе внеклеточных липидных частиц и массивных отложений эстерифицированного холестерина в составе пенистых клеток, имеющих в цитоплазме массивные липидные включения, в большинстве представленные эфирами холестерина. Появление в интиме пенистых клеток является маркером начала атеросклеротического процесса. На последующих стадиях наблюдается разрастание соединительной ткани и увеличением холестерино–фиброзных и кальциевых отложений. Основная масса эфиров холестерина в этих отложениях происходит из циркулирующих в крови ЛНП. Показано, что пенистые клетки являются в основном макрофагами моноцитарного происхождения и частично – пролиферирующими гладкомышечными клетками.

Стимулом к изучению роли окисленных ЛНП в атерогенезе послужило открытие в макрофагах специальных скэвенджер-рецепторов (рецепторов-«мусорщиков») распознающих окисленные ЛНП. Первоначально они были описаны как рецепторы к ацетилированным ЛНП, однако дальнейшие исследования показали их высокое сродство к ацетоацетилированным, карбамилированным, сукцинилированным, и окисленным ЛНП, а также к определенным полирибонуклеотидам (политимин), полисахарам (декстрансульфат, каррагенан), некоторым фосфолипидам и бактериальным липополисахаридам. Общим признаком всех лигандов для скэвенджер-рецепторов является наличие полианионных комплексов. В отличие от рецепторов для нативных ЛНП, скэвенджер-рецепторы связывают только модифицированные ЛНП, и их экспрессия не регулируется внутриклеточным содержанием холестерина. Больше всего скэвенджер-рецепторов выявляется в моноцитах/макрофагах и в клетках печени, где они представлены даже в большем количестве. Надо указать, что наличие этих рецепторов в печени имеет функциональное значение в защите от атеросклероза, позволяя печени нейтрализовать избыток пенистых клеток.

Захват макрофагами окисленных ЛНП, имеющих высокое сродство к скэвенджер-рецепторам, приводит к накоплению в них эфиров холестерина и формированию пенистых клеток, во многом идентичных клеткам атеросклеротической бляшки. Тот факт, что формирование пенистых клеток происходит при инкубации макрофагов только с окисленными или модифицированными («атерогенными»), но не с нативными ЛНП, послужил основой концепции, согласно которой начальным этапом атерогенеза является возникновение окисленных ЛНП, цитотоксичных для эндотелиоцитов и усиливающих адгезию нейтрофилов, что вызывает повреждение эндотелия; захват окисленных ЛНП макрофагами и приводит к образованию пенистых клеток, их накоплению в интиме сосудов и в последующем – к формированию атеросклеротической бляшки.

После приема пищи в кишечнике образуются хиломикроны, которые из кровотока быстро поглощаются печенью. В печени синтезируются богатые триглицеридами липопротеины очень низкой

плотности, основной функцией которых является снабжение периферических тканей жирными кислотами. В результате действия липопротеинлипаз, находящихся на поверхности эндотелиоцитов, происходит гидролиз триглицеридов липопротеинов очень низкой плотности, которые превращаются вначале в липопротеины промежуточной плотности, а затем в богатые холестерином ЛНП. В процессе деградации липопротеинов очень низкой плотности образуются также липопротеины высокой плотности, одновременно этот класс липопротеинов может синтезироваться в печени. Формирование ЛНП сопровождается переносом эфиров холестерина с липопротеинов высокой плотности с помощью специального переносящего эфиры холестерина белка. Если липопротеины очень низкой плотности удаляются из циркуляции через несколько часов, то время полувыведения ЛНП – 2 дня. Средняя концентрация ЛНП в сыворотке нормолипидемических пациентов составляет около 3 мг/мл, при этом в данных частицах содержится около 60% всего сывороточного холестерина. Удаление ЛНП из циркуляции происходит посредством эндоцитоза через рецепторы к апопротеинам В и Е (В/Е рецепторы), а также рецептор-независимым путем. Нарушение рецепторного связывания ЛНП в результате повреждения гена, кодирующего В/Е-рецептор, приводит к аномально высокому уровню ЛНП и холестерина в крови (семейная гиперхолестеринемия).

На каждую частицу ЛНП (рис. 60) приходится около 1600 молекул эфиров холестерина и 200 молекул триглицеридов, которые организуют центральное липофильное ядро; это ядро окружено монослоем из 700 молекул фосфолипидов и 600 молекул свободного холестерина; в монослой встроен апопротеин В (апо-В) – белок с молекулярной массой около 500 кДа, служащий для рецепторного связывания ЛНП с клетками. Имеются данные, что на поверхности частиц ЛНП апо-В располагается тонким слоем (толщиной около 10 Å) и покрывает площадь около 480 нм<sup>2</sup>. Основным субстратом свободнорадикального окисления в ЛНП служат ненасыщенные жирные кислоты, среди которых главной (около 90% общего состава) является линолевая.

Выделенные из атеросклеротических бляшек ЛНП по сравнению с нативными имеют повышенное содержание перекисей липидов, сниженное содержание ненасыщенных жирных кислот, фрагментированный апо-В, несут отрицательный заряд и обладают высоким сродством к скэвенджер-рецепторам макрофагов. Аналогичные изменения в ЛНП наблюдаются при их длительном (несколько месяцев) хранении, при инкубации с ионами железа или меди (создающим условия для их окисления). Вместе с тем, различий в содержании жирорастворимых антиоксидантов ( $\alpha$ -токоферол,  $\beta$ -каротин) в липопротеинах атеросклеротических бляшек и сыворотки крови не выявлено, хотя окисление *in vitro* приводит к снижению содержания этих соединений в ЛНП.

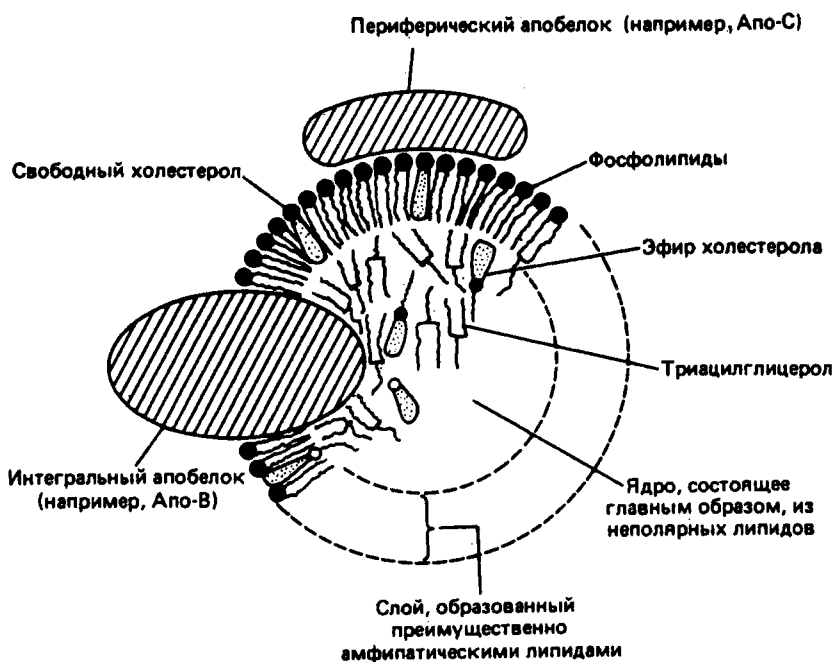


Рис. 60. Схема строения липопротеина плазмы крови

Увеличение отрицательного заряда в окисленных ЛНП является результатом накопления продуктов ПОЛ и окисления положительно заряженных лизиновых остатков апо-В. Свободнорадикальное окисление ЛНП, индуцированное ионами металлов переменной валентности ( $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Fe}^{2+}$ ), приводит к изменению их химического состава, что характеризуется снижением содержания свободных жирных кислот, полным исчезновением антиоксидантов и значительным повышением содержания продуктов окисления (гидроперекисей, оксистеролов, диенов), которых в свежевыделенных ЛНП мало (рис. 61). Окисление ЛНП приводит также к изменению их физических и биологических свойств.

Перекисное окисление липидов может приводить к повреждению или модификации всех основных функций биологических мембран: барьерной, рецепторной, каталитической. Известно по крайней мере 3 первичных механизма повреждения биомембран в результате инициации перекисного окисления липидов.

В результате появления гидрофильной гидроперекисной группировки в полиненасыщенной жирной кислоте, входящей в состав мембранного фосфолипида, нарушается гидрофобность фосфолипидного бислоя, при этом резко увеличивается его пассивная проницаемость для ионов.

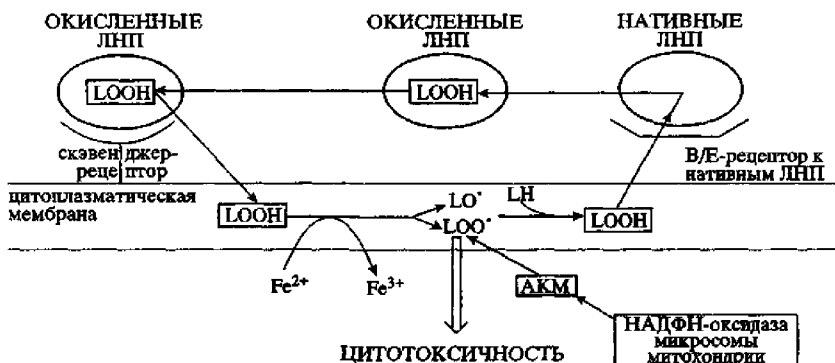


Рис. 61. Механизмы цитотоксического действия окисленных ЛНП (Зенков и др., 2001)

Образующиеся в ходе липоперекисления диальдегиды типа МДА обладают свойствами поперечносшивающих бифункциональных реагентов. Они способны приводить к полимеризации и агрегации биомолекул (белков и липидов в мембранах), накоплению липофусциновых бляшек.

Перекисные радикалы осуществляют окисление аминокислотных остатков (в первую очередь SH-содержащих: гистидина, триптофана и др.) мембранных белков, в том числе остатков, локализованных в активном центре ферментов, что приводит к утрате ферментативной активности.

Эти три первичных модифицирующих эффекта АФК и липидных радикалов, образующихся в результате ПОЛ, обуславливают многообразные проявления перекисного окисления как на уровне молекулярной организации биомембран, так и в отношении их функциональных характеристик. Наиболее типичными из них являются: ограничение молекулярной подвижности фосфолипидов; появление «перекисных кластеров» в липидном бислое, уменьшение количества жидких липидов в микроокружении мембранных белков и нарушение липид-белковых взаимодействий, устранение характерной для нативных мембран трансбислойной асимметрии липидов, уменьшение толщины гидрофобной зоны мембран и усиление трансмембранной миграции интегральных белков, появление каналов проницаемости для ионов, снижение каталитической активности и термостабильности мембранных белков, снижение электрической прочности мембран (уменьшение потенциала пробоя), их дезинтеграция и фрагментация. Наиболее наглядно все изменения проявляются на примере саркоплазматического ретикулула миоцитов.

При индукции перекисного окисления липидов в саркоплазматическом ретикулуме мышечных клеток нарушается транспортная функция кальциевого насоса. Коэффициент  $\text{Ca}^{2+}/\text{АТФ}$ , в нормальных условиях составляющий величину, равную 2, снижается по мере накопления в мембранах продуктов липоперекисления. В основе этого эффекта лежит увеличение проницаемости для ионов мембран саркоплазматического ретикулума. Каталитическая активность Са-АТФазы более устойчива к индукции липоперекисления, но на более поздних стадиях



ПОЛ проявляется и ее ингибирование. По-видимому, этот процесс обусловлен накоплением межмолекулярных белковых сшивок. Кроме этого наблюдаются и прямое окисление молекул Са-АТФазы поскольку она содержит легко окисляемые SH-группы в составе активного центра. При окислении Са-АТФазы она превращается в нерегулируемый канал для кальция, через который эти ионы начинают выходить из полостей ретикулума в цитоплазму, нарушая кальциевый гомеостаз и тем самым работу Са-контролируемых систем клетки (рис. 62).

Активность многих мембранных ферментов существенно зависит от микровязкости мембран и химической природы окружающих белки липидов. Так, например, меняя фосфолипидный состав везикул, в которые встроена Са-АТФаза, можно заметно влиять на активность фермента, причем, чем меньше микровязкость липидного бислоя, тем выше скорость работы насоса. При изменении температуры в эксперименте микровязкость липидного бислоя и активность Са-АТФазы изменяются синхронно. Увеличение микровязкости липидного слоя вызванное окислением фосфолипидов, также приводит к снижению активности фермента.

Эти данные говорят, что хотя присоединение субстрата и его превращения на теле АТФазы происходят, в основном, в гидрофильном окружении, реакции, сопряженные с переносом ионов, затрагивают белковые домены, погруженные внутрь бислоя. Они то и определяют чувствительность транспортного

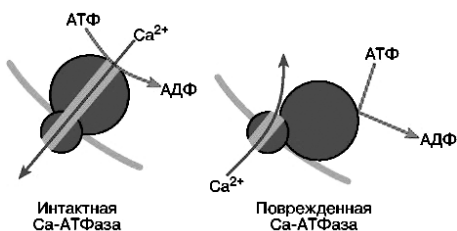


Рис. 62. Нарушение работы Са-АТФазы после повреждения фермента под действием процесса перекисного окисления липидов мембран

Способность АТФазы гидролизовать АТФ сохраняется, но кальций не накачивается, а, наоборот, начинает выходить из ретикулума. Ионный насос превратился в ионный канал.

белка к состоянию липидного окружения. По-видимому, к упаковке липидного окружения чувствительны те мембранные ферменты, при работе которых происходит изменение их конформации и, соответственно, конформационно-активные процессы и будут зависеть от микровязкости мембранных липидов. Действительно, было показано, что скорость распада фермент-фосфатного комплекса Са-АТФазы уменьшается с ростом микровязкости. Это подтверждает, что на этой стадии происходит конформационный сдвиг, связанный с переносом ионов через мембрану. Повышение микровязкости клеточных мембран вследствие избытка холестерина или перекисного окисления мембранных липидов может привести к ухудшению работы ферментных систем, осуществляющих выкачивание  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки, и в результате к нарушению кальциевого гомеостаза клетки.

## **8. ПЕРЕДАЧА (ТРАНСДУКЦИЯ) ИНФОРМАЦИИ ЧЕРЕЗ КЛЕТОЧНУЮ МЕМБРАНУ**

Важное свойство всех живых существ – способность воспринимать, перерабатывать и передавать информацию. Несмотря на громадное разнообразие систем получения и переработки информации, функционирующих в животных и растительных организмах, все они основаны на едином принципе. Процесс получения информации, как правило, начинается с взаимодействия сигнала (химического агента, кванта света, механического воздействия и т.п.) с рецептором – мембранным белком. Следующий этап – передача информации в центр переработки информации, находящийся внутри клетки. Этот процесс происходит с помощью вторичных мессенджеров (посредников).

В ответ на получение сигнала вторичного мессенджера в клетке происходит биохимическая модификация специализированных молекул-эффекторов, через которые и формируется ответ биологической системы (рис. 63).

Именно по такому принципу функционируют нервная, гормональная и иммунная системы животных, на такие же стадии могут быть разложены и фотобиологические процессы, протекающие в организмах как животных, так и в растений. Общий принцип действия всех систем приема и передачи информации связан не только с химической модификацией мембранных белков, но и с изменением концентрации заряженных ионов внутри и вне клетки, формирование трансмембранного потенциала. В последнее время выяснилось, что этот процесс играет важную физиологическую роль не только в нервной ткани, но и при переработке информации в тромбоцитах, лимфоцитах, тучных клетках.

Сигнальные молекулы, включая молекулы большинства гормонов, как правило, не проникают внутрь клетки, а специфически взаимодействуют с рецепторами, локализованными во внешней клеточной мембране и представляющими собой интегральные мембранные белки, полипептидная цепь которых пронизывает толщу мембраны несколько раз и которые могут быть выделены из

мембраны только после ее разрушения, например, с помощью детергента. Стероидные и тиреоидные гормоны, будучи гидрофобными по своей природе, способны проникать через плазматическую мембрану внутрь клетки, где они взаимодействуют с растворимыми рецепторными белками, локализованными в цито- и (или) нуклеоплазме. Они представляют, по-видимому, эволюционно более примитивный (но и более гарантированный) способ передачи информации.

Разнообразные молекулы, инициирующие трансмембранную передачу сигналов, активируют рецепторы, действуя на них обычно при очень низких концентрациях, порядка  $10^{-8-9}$  М.



Рис. 63. Три основных механизма нейроэндокринной регуляции клеток

Важно помнить, что поверхность животной клетки очень динамична. Внутриклеточные везикулы часто сливаются с плазматической мембраной, а участки плазматической мембраны, в свою очередь, могут отшнуровываться с образованием внутриклеточных везикул. Эти процессы составляют часть эндоцитозного и экзоцитозного путей, в которых рецепторы также играют важную роль.

### ***8.1. ТИПЫ РЕЦЕПТОРОВ***

Рецепторные белки делятся на два класса: глобулярные и мембранные. Первые представляют собой свободно плавающие в цитоплазме клетки высоко афинные к определенным типам молекул соединения. Появление лигандов для этих рецепторов в цитоплазме приводит к изменению свойств этих рецепторов и выполнению ими своих функций. Например, солубилизированная протеинкиназа С, связывая ионы кальция, присоединяется к мембране и начинает атаковать мембранные субстраты. Другим примером такого способа управления является регуляция синтеза некоторых клеточных белков альдостероном – появляясь в крови, этот гидрофобный гормон легко проникает через клеточную мембрану, находит в цитоплазме свой рецептор и образует с ним комплекс, способный проникать в ядро. Так комплекс распадается и высвобождающийся рецептор служит фактором инициации экспрессии соответствующих генов.

Другой пример передачи информации – это интегральные белки, которые связывают сигнальные вещества на внешней стороне мембраны и за счет изменения своей конформации генерируют новый сигнал на внутренней стороне мембраны.

Рецептор, вне зависимости от природы связывающегося с ним эффектора, имеет общий план строения: участок, расположенный вне клетки, внутримембранный участок и участок, погруженный в цитоплазму. Внешний и внутренний участки рецептора являются переменными, его срединная часть – константной. N-конец рецептора (внешний) специфичен к внешнему сигналу, тогда как внутренний С-конец – к ассоциированному с рецептором внутри-

клеточному белку. Свойства последнего и определяет, с какой из внутриклеточных сигнальных систем будет осуществляться взаимодействие.

В рассматриваемом случае сам сигнал, будь это химическое вещество, квант света, или даже механическое воздействие, обычно не проникает внутрь клетки, а преобразуется в результате модификации мембранных белков, которая приводит к образованию (высвобождению) молекул посредников – вторичных мессенджеров.

В общем виде передача сигнала через мембрану может быть сведена к трем основным стадиям: I – взаимодействие сигнальной молекулы с рецептором, II – конформационная перестройка рецепторной молекулы и изменение функции специализированных мембранных белков – посредников, III – образование «вторичных мессенджеров» – сравнительно небольших молекул (ионов), диффузия которых в клетке к определенным субклеточным структурам обеспечивает стремительное распространение сигнала. Механизмы передачи информации в живых системах универсальны – все громадное разнообразие сигналов, полученное различными рецепторами, преобразуется по единому принципу за счет идентичности II и III стадий передачи информации через мембрану.

Различают три типа рецепторов (рис.). 1. Рецепторы первого типа являются белками, имеющими одну трансмембранную полипептидную цепь. Это аллостерические ферменты, активный центр которых расположен на внутренней стороне мембраны. Многие из них являются тирозиновыми протеинкиназами. К этому типу принадлежат рецепторы инсулина, ростовых факторов и цитокинов.

Связывание сигнального вещества ведет к димеризации рецептора. При этом происходит активация фермента и фосфорилирование остатков тирозина в ряде белков. В первую очередь фосфорилируется молекула рецептора (автофосфорилирование).

2. Ансамбли рецепторов с ионными каналами. Эти рецепторы являются олигомерными мембранными белками, образующими лиганд-активируемый ионный канал. Связывание лиганда ведет к открыванию канала для ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  или  $\text{Cl}^-$ . По такому механизму осуществляется действие нейромедиаторов, таких, как ацетилхо-

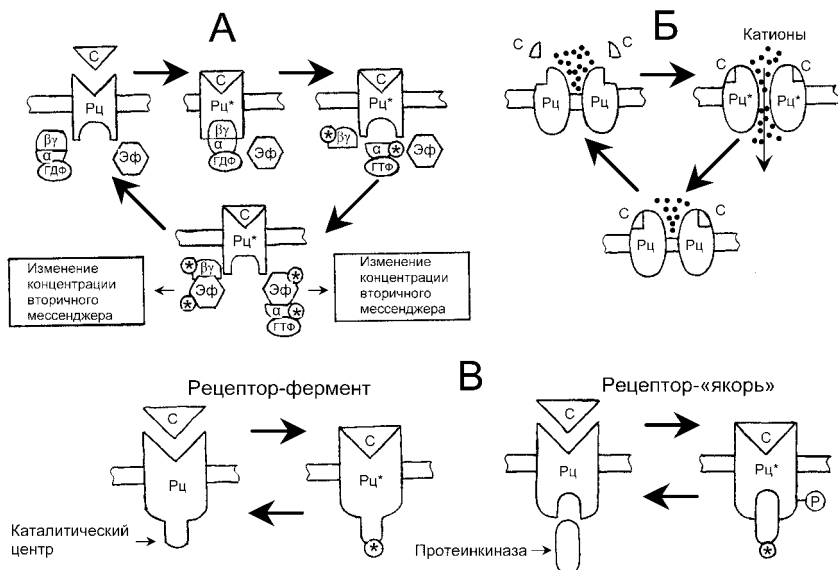


Рис. 64. Основные типы мембранных рецепторов

С – внешний сигнал; Рц – рецепторный белок; индекс \* при компоненте сигнальной системы означает, что он находится в состоянии «включено», α – α-субъединица G-белка, которая может находиться в связанной с гуанозиндифосфатом (ГДФ) или гуанозинтрифосфатом (ГТФ) форме; βγ – функционирующий как единое целое комплекс β- и γ-субъединиц G-белка; Р – фосфатный остаток (остатки), ковалентно связанный с рецептором; Эф – эффекторы. А – рецепторы, сопряженные с G-белками; Б – рецепторы–ионные каналы; В – рецепторы, ассоциированные с ферментативной активностью.

лин (никотиновые рецепторы:  $\text{Na}^+$  - и  $\text{K}^+$  -каналы) и γ-аминомасляная кислота (ГАМК А-рецептор, являющийся  $\text{Cl}^-$  каналом).

Ансамбли рецепторов с ионными каналами – это интегральные мембранные олигомерные белки, состоящие из нескольких субъединиц, полипептидная цепь которых неоднократно пересекает наружную клеточную мембрану. Кроме канальных структур они одновременно содержат белковые рецепторы, которые способны специфически связывать с внешней стороны мембраны лиганды,

изменяющие ионную проводимость канала. Рецепторы данного типа используют в качестве первичных сигналов некоторые нейротрансмиттеры, отвечающие за синаптическую передачу в электрически возбудимых клетках. Классические примеры такого рода – это катионные ацетилхолиновые рецепторы. Ионные каналы этих рецепторов могут находиться в трех основных состояниях: 1) закрытое состояние (в отсутствие внешнего сигнала); 2) активированное (открытое) состояние (первичный мессенджер связан с рецептором); 3) инактивированное (закрытое) состояние – может наступать, когда первичный мессенджер еще связан с рецептором.

3. Рецепторы третьего типа, сопряженные с ГТФ-связывающими белками (ГТФазами). Полипептидная цепь этих белков включает семь трансмембранных тяжей. Такие рецепторы передают сигнал с помощью ГТФ-связывающих белков на белки-эффекторы, расположенные на соседних участках мембраны или в цитоплазме. Функция этих белков заключается в тонкой модификации клеточного метаболизма.

Таким образом, связывание сигнальной молекулы с мембранным рецептором влечет за собой какой-либо из трех видов внутриклеточного ответа, которые и будут рассмотрены ниже.

Рецепторы, ассоциированные с ферментативной активностью, по своей субъединичной структуре весьма разнообразны. Как правило, они представлены мономерными белками, но могут легко объединяться в олигомерные мембранные ансамбли в зависимости от присутствия первичного мессенджера. Практически у всех этих рецепторов полипептидная цепь пересекает клеточную мембрану единственный раз. Общим у них является также то, что участок для восприятия первичного сигнала локализован на стороне, обращенной во внеклеточное пространство. По механизму взаимодействия с цитоплазматическими мишенями рецепторы данного типа разделяются на две группы.

Первая группа включает рецепторы-ферменты, с цитоплазматической стороны которых находится каталитический участок, активируемый при действии на рецептор внешнего сигнала (рис. 65). К ним относится обширное семейство рецепторных тирозиновых протеинкиназ, способных к аутофосфорилированию по тирозино-



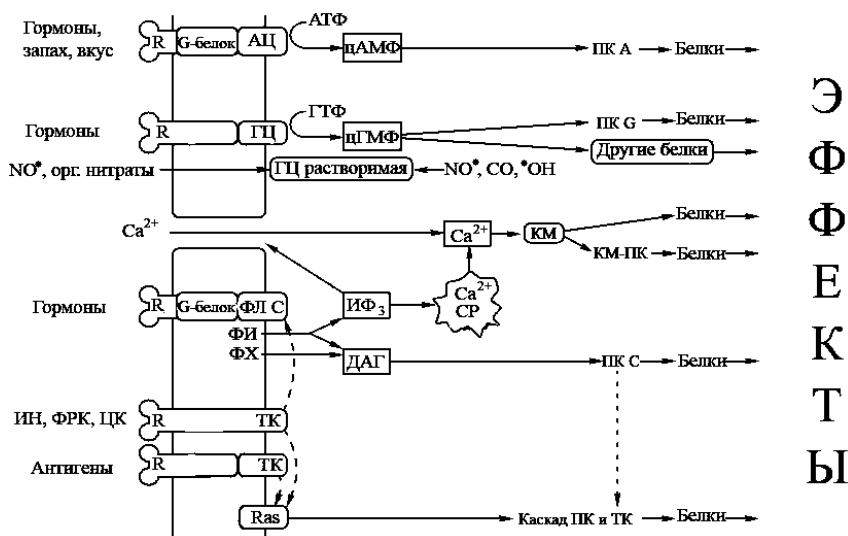


Рис. 65. Основные сигнал-трансдукторные системы клетки

АЦ – аденилициклаза, ГЦ – гуанилициклаза, КМ – кальмодулин, КМ-ПК – кальмодулиновая ПК, ФЛ С – фосфолипаза С, ФИ – фосфоинозитиды, ФХ – фосфатидил-холин, ИФ<sub>3</sub> – инозитолтрифосфат, ДАГ – диацилглицерид, ИН – инсулин, ФРК – факторы роста клеток, ЦК – цитокины, ТК – тирозинкиназа

вым остаткам, а также к фосфорилированию тирозиновые остатки других белков-мишеней. К этой же группе относятся рецепторы, обладающие протеинфосфатазной активностью, которые дефосфорилируют фосфотирозиновые остатки белков-мишеней. Как киназы, так и фосфатазы вовлекаются в регуляцию таких важнейших событий, как клеточное деление, дифференцировка, развитие иммунного ответа.

Вторая группа рассматриваемых рецепторов собственной ферментативной активностью не обладает. Однако в присутствии внешнего сигнала они приобретают способность связывать цитоплазматические (не рецепторные) протеинтирозинкиназы, которые в свободном состоянии неактивны, но в комплексе с рецептором активируются и фосфорилируют его. Включение фосфатных остатков в такой рецептор-«якорь» создает условия для связывания с

ним других белков-мишеней, которые также фосфорилируются и тем самым передают сигнал. В эту группу входят рецепторы, участвующие в развитии иммунного ответа, а именно: рецепторы антигенов и рецепторы цитокинов, или интерлейкинов.

Ряд белков (эффекторов) осуществляет свои функции в результате фосфорилирования цАМФ-зависимыми протеинкиназами. Молекула протеинкиназы состоит из двух субъединиц: регуляторной и каталитической. цАМФ связывается с регуляторной субъединицей, что приводит к отделению каталитической субъединицы (она становится активной) и фосфорилированию соответствующего белка. Большое семейство протеинкиназ подразделяется на группы по механизму активации и по типу субстрата. ПК-А активируются цАМФ, ПК-G – цГМФ, ПК-C – диацилглицеролом,  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулин-зависимые киназы – ионами кальция. Классификация по типу субстрата зависит от того, какая аминокислота фосфорилируется данным ферментом – известны тирозинкиназы и серин/треонинкиназы. Многие протеинкиназы являются растворимыми белками, другие относятся к мембранным белкам, имеющим трансмембранные домены или заякоренным на мембране с помощью жирных кислот.

### *8.1.1. G-БЕЛКИ И ВТОРИЧНЫЕ МЕССЕНЖЕРЫ*

В настоящее время в основу классификации клеточных сигнальных систем положены вторичные мессенджеры и регулируемые ими клеточные реакции. Таким образом, к числу основных сигнальных систем относятся: циклоаденилатная;  $\text{Ca}^{2+}$ -фосфоинозитолтрифосфат-зависимая; липоксигеназная; НАДФН-оксидазная (супероксид-синтазная); NO-синтазная. В последнее время особое внимание привлекает MAP-киназная система (Mitogen Aktivated Protein kinase), регулирующая клеточный цикл. В большинстве из них в качестве промежуточного звена вовлекаются так называемые G-белки.

Рецепторы, сопряженные с G-белками (G-protein coupled receptors, GPCR), передают сигнал от первичных мессенджеров к внутриклеточным мишеням с помощью цепи GPCR => G-белок => эффекторный белок (рис. 66). Первичными сигналами

для этих рецепторов служат разнообразные молекулы, среди которых низкомолекулярные гормоны и нейромедиаторы (например, адреналин, норадреналин, ацетилхолин, серотонин, гистамин), опиоиды, гормоны пептидной и белковой природы (адренокортикотропин, соматостатин, вазопрессин, ангиотензин, гонадотропин, эпидермальный фактор роста), некоторые нейропептиды. В этот же ряд попадают множество химических сигналов, воспринимаемых обонятельными и вкусовыми сенсорными клетками, а также свет, рецептором для которого служит пигмент фоторецепторных клеток родопсин (см. раздел 8.3).

Один и тот же первичный сигнал может передавать информацию через несколько разных GPCR, так что если число внешних сигналов для GPCR составляет несколько десятков, то самих рецепторов известно более 200.

Следующий за рецептором компонент сигнального каскада представлен G-белком. Идентифицировано около 20 различных G-белков, наиболее распространенные -  $G_s$  и  $G_i$ , которые соответственно стимулируют и ингибируют аденилатциклазу;  $G_q$ , активирующий фосфолипазу C; G-белки сенсорных клеток: фоторецепторных -  $G_t$ , (трансдуцин), обонятельных -  $G_{olf}$  и

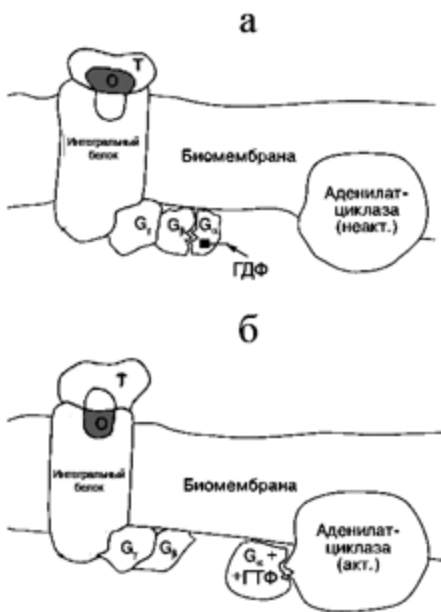


Рис. 66. Схема строения адренинового и обонятельного рецепторов

а – состояние «выключено», б – состояние «включено». Т – транспортный белок, О – одорант.

вкусовых –  $G_{\text{в}}$ . G-белки – это гетеротримеры, которые состоят из субъединиц трех типов:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . В естественных условиях последние две субъединицы функционируют как единый  $\beta\gamma$ -комплекс.

Важнейшая характеристика G-белков – присутствие на их  $\alpha$ -субъединице центра связывания гуаниловых нуклеотидов: ГДФ и ГТФ. Если с G-белком связан ГТФ, то это соответствует его активированному состоянию (другими словами, G-белок находится в положении «включено»). Если в нуклеотидсвязывающем центре присутствует ГДФ, это соответствует выключенному состоянию. Центральное событие при передаче сигнала от рецептора, на который подействовал первичный сигнал, к G-белку состоит в том, что активированный рецептор катализирует обмен ГДФ, связанного с G-белком, на присутствующий в среде ГТФ. Это событие, обозначаемое как ГДФ/ГТФ-обмен, сопровождается диссоциацией тримерной молекулы G-белка на две функциональные субъединицы:  $\alpha$ -субъединицу, содержащую ГТФ, и  $\beta\gamma$ -комплекс. Далее одна из этих функциональных субъединиц, какая именно – зависит от типа сигнальной системы, взаимодействует с эффекторным белком, представленным ферментом или катионным каналом. Как следствие, функциональная активность эффектора меняется, что, в свою очередь, приводит к изменению цитоплазматической обстановки и в конечном счете инициирует тот или иной клеточный ответ. Эффекторными белками в сигнальных системах типа GPCR => G-белок => эффекторный белок могут быть аденилатциклаза, катализирующая синтез цАМФ из АТФ; фосфолипаза C, гидролизующая фосфатидилинозитол с образованием ДАГ и  $IP_3$ ; фосфодиэстераза, расщепляющая цГМФ до ГМФ; некоторые типы калиевых и кальциевых каналов.

Весьма важно, что при передаче сигнала в каскаде рецептор => G-белок => эффекторный белок исходный внешний сигнал может многократно усиливаться. Это происходит благодаря тому, что одна молекула рецептора за время пребывания в активированном состоянии ( $R^*$ ) успевает перевести в активированную форму ( $G^*$ ) несколько молекул G-белка. Например, в

зрительном каскаде родопсин  $\Rightarrow$  Gt  $\Rightarrow$  цГМФ-фосфодиэстераза на каждую молекулу  $R^*$  может образоваться несколько сот или даже тысяч молекул  $G^*$ , а это означает, что на первой стадии каскада  $R^* \Rightarrow G^*$  коэффициент усиления внешнего сигнала составляет  $10^2$ – $10^3$ . Хотя на следующей стадии каскада ( $G^* \Rightarrow$  эффекторный белок) каждая молекула  $G^*$  взаимодействует только с одной молекулой эффекторного белка, сигнал здесь также амплифицируется, поскольку на каждую молекулу  $G^*$  и соответственно активированного эффекторного белка в цитоплазме появляется (исчезает) большое число молекул вторичного сигнала. Так, в зрительном каскаде на второй его стадии одна молекула активированной цГМФ-фосфодиэстеразы способна расщепить в секунду до 3 тыс. молекул цГМФ, служащего в фоторецепторных клетках вторичным мессенджером. Поскольку усиление внешнего сигнала на обеих стадиях суммируется, в конечном счете коэффициент амплификации сигнала при его прохождении через каскад может достигать весьма высоких значений: в зрительных клетках усиление составляет величину порядка  $10^5$ – $10^6$ .

Ясно, что прекращение действия внешнего стимула должно сопровождаться «выключением» всех компонентов сигнальной системы. На уровне рецепторов это достигается, во-первых, в результате диссоциации первичного сигнала из комплекса с GPCR, во-вторых, путем фосфорилирования рецепторов под действием специальных протеинкиназ и последующего связывания с модифицированным рецептором специального белка (например,  $\beta$ -аррестина). G-белки обладают способностью гидролизовать связанный с ними ГТФ до ГДФ, что обеспечивает их инактивацию. И наконец, чтобы переход клетки к исходному (до действия внешнего стимула) состоянию завершился, специальные механизмы восстанавливают исходный уровень вторичного мессенджера или катиона в ее цитоплазме. Например, цАМФ, цитоплазматическая концентрация которого повышается при передаче сигнала в каскаде  $\beta$ -адренорецептор  $\Rightarrow$  Gs-белок  $\Rightarrow$  аденилатциклаза, гидролизуется затем цАМФ-фосфодиэстеразой до нециклического (линейного) АМФ, который свойствами вторичного мессенджера не обладает.

G-белки ответственны за трансмембранную передачу сигналов множества гормонов или нейромедиаторов к разнообразным мишеням клетки. Четыре G-белка к настоящему времени очищены до гомогенного состояния и биохимически охарактеризованы: Gt (трансдуцин), Gs, Gi и Go. Оказалось, что каждый из них имеет уникальные мишени (эффекторные белки). Gt активирует цГМФ-специфичную фосфодиэстеразу в наружных сегментах палочек сетчатки; Gs и Gi, соответственно, стимулируют и ингибируют аденилатциклазу и присутствуют во всех клетках; Go представлен в большом количестве в клетках мозга и, по-видимому, ингибирует электрочувствительный  $\text{Ca}^{2+}$ -канал в нейронах.

Ряд существенных G-белков пока не очищен. Так, Gp, который использует в качестве мишени фосфатидилинозитолспецифичную фосфолипазу C, инициирует быстрый распад фосфатидилинозитола в плазматической мембране и образование нескольких вторичных посредников. Другой G-белок, Gk, по-видимому, открывает  $\text{K}^{+}$ -специфичные каналы в сердечной мышце и других клетках; Ge-белки участвуют в регуляции экзоцитоза. В некоторых случаях один G-белок внутри клетки может реагировать на связывание лиганда с одним из нескольких разных рецепторов. Такая ситуация имеет место, например, для белка Gk из ганглионарных клеток *Aplysia*. Кроме того, G-белки могут иметь больше одной мишени. В качестве примера можно привести белок Gt, который активирует как цГМФ-фосфодиэстеразу, так и фосфолипазу  $\text{A}_2$  в наружных сегментах палочек сетчатки быка. По-видимому, в этих процессах участвуют различные субъединицы Gt.

Все G-белки прочно связаны с плазматической мембраной, за исключением трансдуцина, который может диссоциировать от мембраны. Ни одна из субъединиц не является трансмембранным белком. Однако по меньшей мере в некоторых случаях  $\gamma$ -субъединица ацилирована и может присоединяться к мембране с помощью ковалентно связанной жирной кислоты. В качестве такого якоря для закрепления в мембране G-белков часто используется мирисатат.

Наиболее распространенными мишенями G-белков являются аденилатциклаза (для Gs и Go) и фосфолипаза C, ответст-

венная за гидролиз фосфатидилинозитола (для Gr). Модуляция аденилатциклазы приводит к изменению внутриклеточной концентрации цАМФ, который, как известно, влияет на множество внутриклеточных процессов. Одним из последствий увеличения содержания цАМФ является, например, стимуляция цАМФ-зависимой протеинкиназы (протеинкиназа А), которая в свою очередь фосфорилирует специфические белковые субстраты. Клетки содержат также два типа  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеинкиназ, активируемых, соответственно,  $\text{Ca}^{2+}$ +кальмодулином и  $\text{Ca}^{2+}$ +диацилглицеролом и фосфатидилсерином (протеинкиназа С). Активность обеих этих киназ регулируется вторичными посредниками, образующимися при обмене фосфатидилинозитола, которая во многих клетках инициируется путем G-белок зависимой активации специфической фосфолипазы С.

Молекулярные машины, обеспечивающие передачу сигнала от рецепторов к внутриклеточным мишеням, состоят, как правило, из нескольких белковых компонентов, совокупность которых обычно именуют каскадом передачи сигнала или сигнальным каскадом.

Как мы видели, помимо белковых посредников в передачу сигнала внутри клетки вовлекаются относительно небольшие молекулы, служащие вторичными посредниками, или мессенджерами (от англ. messenger – посыльный). В содержание данного понятия вкладывается смысл «следующий по цепочке передачи сигнала», а не вторичность или меньшую значимость данного соединения. Для обозначения сигнальных молекул повсеместно используется термин «мессенджер», а не «посредник». Дело в том, что в цитоплазме в передачу сигнала вовлечены как разнообразные белки, так и малые молекулы, причем функционально все они являются посредниками между рецептором, на который действовал внешний стимул, и клеточным ответом. Однако между ними есть и принципиальное различие: белки образуют своеобразную молекулярную машину, которая, с одной стороны, чувствует внешний сигнал, а с другой – обладает ферментативной или иной активностью, модулируемой этим сигналом, в то время как малые молекулы действительно служат посыльными (мессенджерами) между

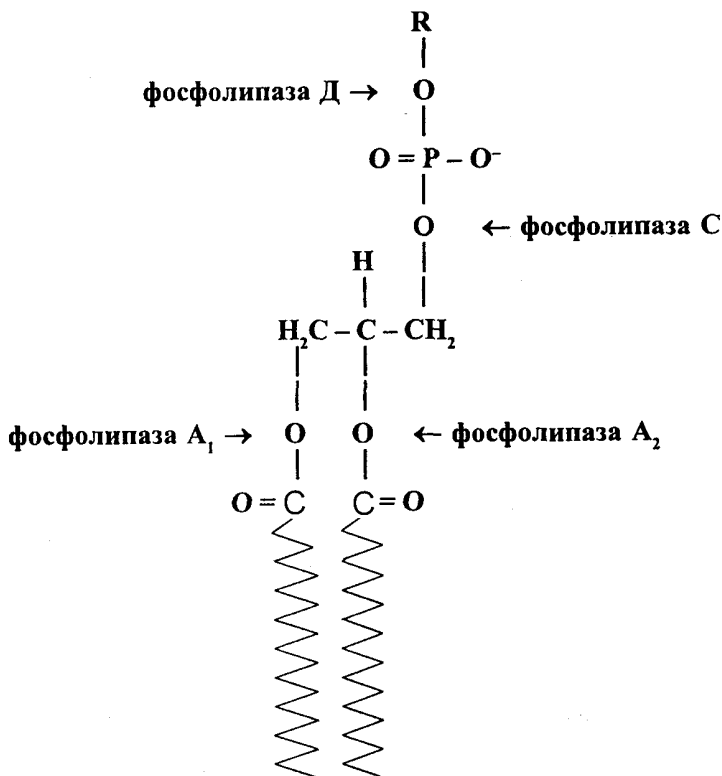
различными белками, полиферментными комплексами или даже клеточными структурами. Самый известный пример такого посыльного – это уже упоминавшийся выше цАМФ, среди других наиболее важных вторичных мессенджеров следует упомянуть циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (цГМФ), инозитол-1,4,5-трисфосфат (обозначаемый как ИФ<sub>3</sub>), диацилглицерол (ДАГ), ион кальция.

Наиболее характерные свойства вторичного мессенджера, во-первых, его относительно небольшая по сравнению с биополимерами молекулярная масса (понятно, что посыльный должен с высокой скоростью диффундировать в цитоплазме), во-вторых, он обязан быстро (по сравнению со временем передачи сигнала) расщепляться (в случае Ca<sup>2+</sup> – откачиваться). В противном случае сигнальная система останется во включенном состоянии и после того, как действие внешнего сигнала уже прекратилось. Подобные ошибки могут оказаться в прямом смысле фатальными. Так, например, форболовые эфиры, которые представляют собой структурные аналоги диацилглицерола, но в отличие от него в организме не расщепляемые, способствуют развитию злокачественных опухолей. Это происходит потому, что форболовые эфиры вовлекаются в работу некоторых сигнальных систем, которые регулируют клеточное деление с помощью диацилглицерола как вторичного мессенджера. Однако, имитируя действие диацилглицерола и обеспечивая передачу пролиферативного сигнала, они вовремя не расщепляются. В результате сигнальная система перестает чувствовать внешний сигнал и оказывается в перманентно включенном состоянии, а значит, пролиферация клеток перестает быть контролируемой.

### *8.1.2. РОЛЬ МЕМБРАННЫХ ФОСФОИНОЗИТИДОВ В ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛА*

Для того, чтобы представить механизм действия фосфоинозитидов в качестве вторичных мессенджеров, необходимо более подробно рассмотреть цикл их метаболических превращений в мембране.





**R:** Холин — фосфатидилхолдин;  
 Этанолламин — фосфатидилэтанолламин;  
 Инозитол (P) — фосфатидилинозитол (P);  
**H** — фосфатидная кислота.

Рис. 67. Структура фосфолипидов и их гидролиз фосфолипазами

Внешний сигнал после взаимодействия с рецептором через G-белок (рис. 67) активирует фосфодиэстеразу (фосфолипазу С), которая гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (ИФ<sub>2</sub>) с образованием диацилглицерола и инозитолтрифосфата (рис. 68). Диацилглицерол фосфорилируется диацилглицеролкиназой в

фосфатидную кислоту (реакция требует присутствия АТФ). Фосфатидная кислота взаимодействует с цитидинтрифосфатом и образует цитидиндиацилглицеролдифосфат. Это соединение после рекомбинации с инозитом восстанавливает гидролизуемые фосфодиэстеразой фосфоинозитиды. Инозит, необходимый для этой реакции, образуется из инозитолмонофосфата. Реакция катализируется инозитол-1-монофосфатазой, активность которой блокируется ионами лития.

Именно этим процессом объясняется эффективное лечение ионами лития маниакально-депрессивных психозов и некоторых других заболеваний нервной системы. Блокада литием инозитол-1-монофосфатазы замедляет синтез в организме инозита и ослабляет протекающие в нейронах процессы, зависящие от метаболизма фосфоинозитидов.

Инозитолтрифосфат вызывает освобождение кальция из мембран эндоплазматического ретикулума, по-видимому, связываясь со специальным рецептором. Несмотря на то, что процесс выброса кальция из внутриклеточных депо под действием фосфоинозитидов обнаружен в целом ряде клеток, механизм, с помощью которого он открывает внутриклеточные кальциевые каналы, окончательно не выяснен.

По мнению ряда исследователей, в результате передачи сигнала с помощью фосфоинозитидов пути передачи информации могут раздваиваться. Это происходит в результате того, что гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата приводит к образованию двух вторичных мессенджеров: инозитолтрифосфата и диацилглицерола.

Диацилглицерол (ДАГ) выступает в качестве вторичного мессенджера, так как он инициирует механизмы, в результате которых активируются два типа протеинкиназ: протеинкиназа С и цГМФ-зависимая киназа. При этом фосфолипаза С играет ключевую роль в процессе переноса сигналов с рецепторов, которые непосредственно не связаны с аденилатциклазой, но регулируют скорость метаболизма фосфоинозитидов.

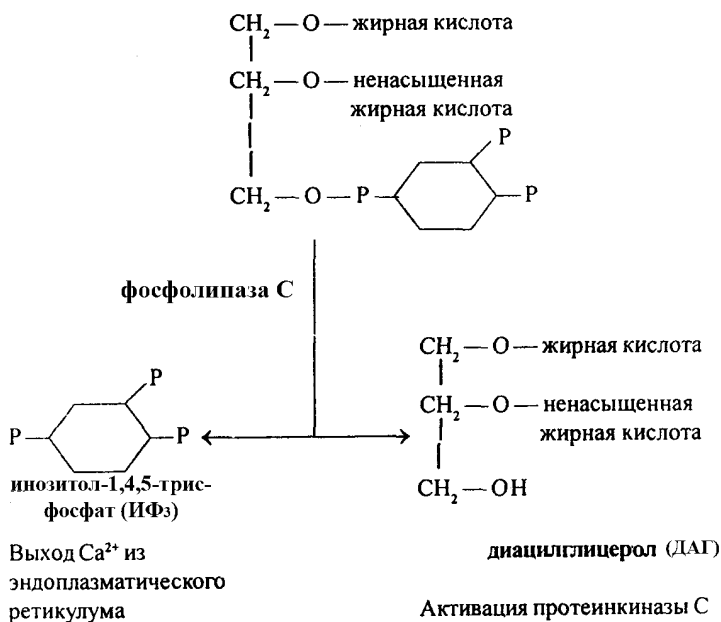
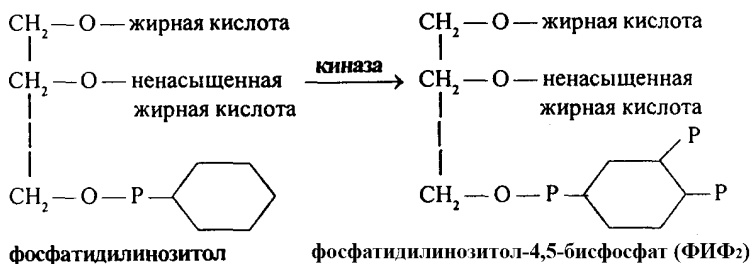


Рис. 68. Фосфоинозитольный путь передачи сигнала

Вклад каждой из ветвей инозитидного пути передачи сигнала может быть исследован с помощью химических соединений, имитирующих действие одного из двух вторичных мессенджеров, образующихся в результате гидролиза фосфоинозитидов и,

следовательно, активирующих эти пути регуляции по отдельности. Действие ДАГ имитируется форболовыми эфирами, так как эти соединения вызывают активацию протеинкиназы С. Форболовые эфиры – это соединения растительной природы, их выделяют из семян восточноазиатского растения *Croton tigtium*. Они резко ускоряют инициацию опухолей канцерогенами. Действие инозитолтрисфосфата имитируется кальциевыми ионофорами, среди которых уже упоминавшийся А 23187.

Между двумя путями передачи сигнала через фосфоинозитидный цикл существует синергизм. Так, например, в тромбоцитах форболовый эфир и кальциевый ионофор совместно вызывают такую мощную секрецию серотонина, какую ни одно из этих соединений по отдельности вызывать не может. Форболовый эфир и кальциевый ионофор могут инициировать деление некоторых клеток. Это позволило предположить, что сигнальные пути, связанные с обменом фосфоинозитидов, могут контролировать не только секрецию гормонов, транспорт ионов, но и пролиферацию клеток. Появились экспериментальные доказательства того, что форболовые эфиры способствуют опухолевому росту через активацию «диацилглицерольной ветви» фосфоинозитидного сигнального пути.

Диацилглицерол может подвергаться дальнейшей деградации под действием диацилглицероллипазы до арахидоновой кислоты, которая превращается в разнообразные биологически активных метаболиты, в том числе эйкозаноиды и простагландины.

Суммируя сказанное выше, можно утверждать, что при функционировании рассмотренной регуляторной системы образуются по меньшей мере три вторичных посредника: диацилглицерол, ИФ<sub>3</sub> и арахидоновая кислота. Каждый из них выполняет специфические функции, включая увеличение содержания внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и активацию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеинкиназ. Эта сигнальная система распространена весьма широко, хотя в деталях механизм регуляции ею специфических клеточных функций пока не ясны.

### *8.1.3. МЕТАБОЛИЗМ ФОСФОИНОЗИТИДОВ И РЕГУЛЯЦИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН ДЛЯ ИОНОВ $\text{Ca}^{2+}$*

Каков же механизм увеличения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , вызываемой инозитолтрифосфатом и диацилглицеролом, появляющимися при гидролизе фосфатидилинозит-4,5-дифосфата? Следует иметь в виду, что, во-первых, для работы фосфолипазы С необходим ГТФ, то есть активация рецептора реализуется через G-белок, а во-вторых, метаболизм фосфолипидов обеспечивает, по крайней мере, два процесса: индукцию входа кальция в клетку из внешней среды по градиенту концентрации и выход ионов кальция в цитозоль из внутриклеточных депо.

В модельных системах было показано, что фосфатидная кислота способна транспортировать через искусственные мембраны двухвалентные катионы с эффективностью, близкой к действию кальциевого ионофора А 23187. При этом ионы магния транспортировались значительно медленнее, чем кальция, что говорит о селективности фосфатидной кислоты в качестве кальциевого ионофора.

Относительно механизма ионофорного действия фосфатидной кислоты существует ряд гипотез, ни одна из которых в настоящее время не может быть признана достаточно доказательной. По-видимому, фосфатидная кислота каким-то образом модифицирует структуру липидного бислоя, образуя участки с небислойной упаковкой молекул. При этом на границе бислоя и монослоя образуются «каналы» для ионов кальция.

Хотя имеется громадное количество факторов, указывающих на то, что под действием фоинозитол-трисфосфата происходит освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  в физиологических условиях, механизм его участия в открывании Са-канала не ясен. Он вызывает освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках поджелудочной железы, стимулирует мобилизацию запасаемого кальция в процессе индуцируемого гормоном поступления глюкозы из печени в кровь. В ооцитах лягушки поток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивается вдвое в ответ на стимуляцию трифосфоинозитолом. Секреция гранул, осуществляющаяся яйцеклеткой сразу после оплодотворения (в результате чего образуется так называемая оболочка оплодотворения), также вызывается ионами кальция,

концентрация которых в яйцеклетке резко увеличивается в ответ на внутриклеточную инъекцию трифосфоинозитидов.

На долю фосфатидилинозитола приходится лишь 2–8% всех фосфолипидов, содержащихся в клеточных мембранах эукариот. Структура его полярной головки представлена в таблице 1. Этот фосфолипид называют миоинозитолом, поскольку впервые он был выделен из мышечного гомогената. Небольшая часть фосфатидилинозитола фосфорилирована в положении 4 или в положениях 4 и 5. От 1 до 10% фосфатидилинозитола, присутствующего в мембране, приходится на долю ФИФ<sub>2</sub>. Этот компонент является, вероятно, первой мишенью для фосфатидилинозитол специфичной фосфолипазы C, которая активируется во многих клетках G-белками.

Последующий гидролиз молекулы в плазматической мембране приводит к быстрому распаду фосфатидилинозитола и кратковременному возрастанию продуктов распада. Например, во время активации тромбоцитов за 90 с деградирует половина общего пула фосфатидилинозитола. Продукты распада участвуют как вторичные мессенджеры во многих клеточных процессах. Исследование этой системы в деталях еще не закончено, но самая общая схема может быть представлена на рис. 68. Последовательность событий такова.

Начальными продуктами гидролиза ФИФ<sub>2</sub> являются диацилглицерол и ИФ<sub>3</sub>. Диацилглицерол остается связан с мембраной, а ИФ<sub>3</sub> высвобождается в цитоплазму. Обычно жирные кислоты фосфатидилинозитола представлены стеариновой кислотой в положении 1 и арахидоновой кислотой в положении 2.

ИФ<sub>3</sub> служит вторичным посредником, и его основной функцией, по-видимому, является мобилизация Ca<sup>2+</sup>, аккумулированного в эндоплазматическом ретикулуме. Возможно, этот компонент путем прямого связывания открывает Ca<sup>2+</sup>-специфичные каналы в эндоплазматическом ретикулуме, что приводит к выходу ионов кальция из ретикулума в цитоплазму, где его уровень возрастает в несколько раз (от 0,1 мкМ до 5-10 мкМ).

Одним из ферментов, регулируемых Ca<sup>2+</sup>, является фосфолипаза C, которая при низкой концентрации Ca<sup>2+</sup> использует в качестве

субстрата преимущественно ФИФ<sub>2</sub>, но при более высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , по крайней мере *in vitro*, использует нефосфорилированный фосфатидилинозитол.

Наиболее важным ферментом, активируемым  $\text{Ca}^{2+}$ , является протеинкиназа С. Этот фермент локализован преимущественно в цитозоле до момента появления там диацилглицерола и  $\text{Ca}^{2+}$ . В присутствии обоих агентов протеинкиназа С приобретает способность связываться с мембраной, выбирая для этого кластеры, обогащенные фосфатидилсерином. В этих условиях наблюдается активация протеинкиназы С, причем она оказывается в непосредственной близости к мембранным субстратам, которые она готова фосфорилировать.

Эффекты, сходные с действием диацилглицерола, оказывают протеинкиназу С и форболовые эфиры, в связи с чем ее часто рассматривают как внутриклеточный рецептор этих соединений.

В активированном состоянии протеинкиназа С эффективно фосфорилирует белки-мишени по серину и треонину.

#### 8.1.4. ДРУГИЕ ТИПЫ ВТОРИЧНЫХ ПОСРЕДНИКОВ

Наиболее важными вторичными мессенджерами являются цАМФ, цГМФ,  $\text{Ca}^{2+}$ , ИФ<sub>3</sub>, диацилглицерол и монооксид азота (NO).

ГТФ превращается в цГМФ с помощью фермента гуанилатциклазы. В отличие от аденилатциклазы гуанилатциклаза не связана с мембранными рецепторами. Однако образование цГМФ частично сопровождается активацией трифосфоинозитидного цикла, поскольку некоторые его компоненты, по-видимому, вызывают активацию гуанилатциклазы. Известно, что цГМФ активирует специальные G-киназы, вызывающие фосфорилирование определенных белков, физиологическая роль которых пока не установлена. По-видимому, цГМФ может играть роль вторичного мессенджера в клетках нервной ткани. Под действием гормона, выделяемого специальными клетками мозга, в нервных клетках повышается уровень цГМФ, который инициирует сложный комплекс действий, приводящий к освобождению бабочки из куколки.

цГМФ образуется двумя гуанилилциклазами – мембраносвязанной и цитозольной формами. Мембранный фермент активируется натрийуретическими гормонами (G-белки при этом не принимают участия), а растворимый (цитозольный) – радикалами NO', CO и •ОН. Последние представляют собой новый класс неорганических регуляторов, проявляющих свойства иногда межклеточных, в иногда внутриклеточных регуляторов. цГМФ активирует ПК G, но, кроме того, изменяет активность и других белков, включая ионные каналы (как в случае реализации светового сигнала).

Нет сомнений, что существует гораздо больше сигнал-трансдукторных систем, чем описано в настоящее время. В конце прошлого века были описаны сигнальные функции церамида, фосфатидной кислоты, циклоаденозиндифосфат-рибозы и даже 5'-АМФ (аденозинмонофосфата). Сейчас интенсивно изучаются связанные с ними сигнал-передающие пути.

## ***8.2. ПЕРЕДАЧА ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ***

Гормоны – сигнальные вещества, образующиеся в клетках эндокринных желез. После синтеза гормоны поступают в кровь и переносятся к органам-мишеням, где выполняют определенные регуляторные функции. Границы между гормонами и другими сигнальными веществами, такими, как медиаторы, нейромедиаторы и ростовые факторы, довольно условны. Часто эти сигнальные вещества имеют общие закономерности биосинтеза, метаболизма и механизма действия.

В органах-мишенях имеются клетки, несущие рецепторы, способные связывать гормоны и тем самым воспринимать гормональный сигнал. После связывания гормонов рецепторы передают информацию клетке и запускают цепь биохимических реакций, определяющих клеточный ответ на действие гормона.

Существуют два основных механизма трансдукции гормонального сигнала в клетку. В первом случае гидрофобный гормон (стероидный, иодтиронин, активированные витамины А и D) проника-



ет через плазматическую мембрану в цитозоль, а затем и в ядро (последнему, очевидно, способствуют растворимые цитозольные белки-рецепторы). Во втором случае гормон-рецепторный комплекс образуется на наружной поверхности плазматической мембраны. Это вызывает либо быстрое открытие ионного канала и вход ионов в клетку и в результате нервный импульс, либо включение систем вторичных посредников, приводящее к более медленным изменениям метаболизма и функций клеток. Эти механизмы могут приводить к отсроченным эффектам – изменениям процессов, которые регулируются ядром клетки.

Липофильные гормоны проникают в клетку, а затем поступают в ядро. Гидрофильные гормоны оказывают действие на уровне клеточной мембраны. Таким образом, подразделение гормонов на липофильные и гидрофильные имеет определенный биохимический смысл, поскольку оно отражает различные принципы действия этих биорегуляторов.

Четыре основные и наиболее изученные системы передачи гормонального сигнала в цитозоль представлены на рис. 65. Многие гормоны (амины, пептиды, белки, простагландины I и E), а также сигналы осязания и обоняния действуют через систему цАМФ. Образование гормон-рецепторного комплекса через G-белки активирует или ингибирует аденилилциклазу, которая из АТФ образует цАМФ. Этот вторичный посредник вызывает диссоциацию зависимой от него ПК А на регуляторную и каталитическую субъединицы. В результате последняя активируется и фосфорилирует многочисленные белки-мишени. Это увеличивает, например, распад гликогена и жира, синтез катехоламинов и глюкокортикоидов, сокращения сердечной мышцы и расслабление гладких мышц. цАМФ часто рассматривают как сигнал голода и стресса.

Многие гормоны (амины, пептиды, белки, простагландины F и тромбоксаны) через G-белок включают систему фосфолипаз C, которые из фосфатидилинозитидов образуют два вторичных посредника: инозитолтрисфосфат и диацилглицерол, а из фосфатидилхолина – только один (последний). Инозитолтрифосфат увеличивает в цитозоле концентрацию ионизированного кальция.

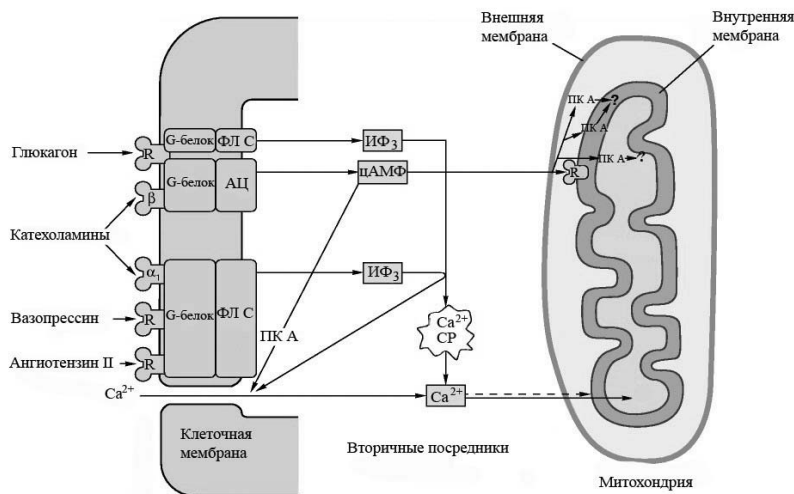


Рис. 69. Передача гормонального сигнала в митохондрии

Комплекс  $\text{Ca}^{2+}$  с его рецептором кальмодулином активирует многие цитозольные ферменты либо прямо, либо через соответствующую протеинкиназу.

Тирозинкиназы (ТК) – это ПК, фосфорилирующие в белках остатки тирозина (а не серина или треонина, как другие ПК). Эта система включается в действие факторов роста клеток (ФРК), цитокинов и инсулина, опосредуя большинство его цитозольных эффектов. Образование гормон-рецепторного комплекса, а также специфические антигены активируют ТК, вследствие чего они фосфорилируют различные белки-мишени.

В каждой клетке существует комплекс сигнал-трансдукторных систем, преобразующих все внешние сигналы во внутриклеточные, а затем трансформирующие эти сигналы во внутриклеточные функции.

В ядро сигнал обычно передается путем транслокации в него цитозольной протеинкиназы или активированного транскрипционного фактора (фосфорилированного ею или освобожденного из комплекса с другим белком). В митохондрии сигнал передается

иначе – путем транслокации из цитозоля вторичных посредников:  $\text{Ca}^{2+}$  или цАМФ.

Механизмы передачи информации в органеллах отличаются от цитозольных механизмов, но они обеспечивают столь же эффективный контроль гормонами ядерных и митохондриальных процессов. Схема передачи гормонального сигнала в митохондрии представлена на рис. 69. Регуляция осуществляется двумя группами гормонов:  $\text{Ca}^{2+}$ -мобилизующими (катехоламины через  $\alpha 1$ -рецепторы, вазопрессин, ангиотензин) и цАМФ-зависимыми (глюкагон и катехоламины через  $\beta$ -рецепторы). Общее для обоих механизмов – первичный регуляторный сигнал в клетке возникает в рецепторах плазматической мембраны и затем трансформируется в увеличение цитозольной концентрации вторичных посредников –  $\text{Ca}^{2+}$  и/или цАМФ. Их влияние на митохондрии является вторичным – в результате воздействия на наружную сторону внутренней мембраны митохондрии или проникновения через нее в матрикс (внутренняя растворимая часть митохондрии).

Конкретные механизмы этих процессов различны. Для  $\text{Ca}^{2+}$  существует постоянный обмен через внутреннюю мембрану митохондрии: вход в матрикс за счет энергии мембранного потенциала (в направлении электрохимического градиента) и выход в цитоплазму в обмен на  $\text{Na}^+$  или  $\text{H}^+$  за счет энергии, связанной с потенциалом  $\Delta\mu\text{H}$ . Расход энергии на этот процесс вполне оправдан, так как является основой для кальциевой регуляции функций митохондрии. Кроме того,  $\text{Ca}^{2+}$  активирует, как минимум, один фермент наружной стороны внутренней мембраны митохондрии (глицерофосфатдегидрогеназу).

цАМФ взаимодействует с рецепторным белком внутренней мембраны митохондрии, что, очевидно, и приводит к активации их функций. Кроме того, цАМФ проникает во все компартменты митохондрии, где обнаруживается ПК А, хотя ее роль в функциях митохондрии еще не вполне ясна. В результате описанных процессов цитозольный сигнал – увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и/или цАМФ – трансформируется в митохондриальный, что и вызывает множественные изменения функций этих субклеточных частиц.

Необходимо обратить внимание на две важные особенности: 1) ионы  $\text{Ca}^{2+}$  действуют не только через специализированные рецепторные белки типа кальмодулина, но прямо на многочисленные митохондриальные белки, обладающие чувствительностью к кальцию; 2) эффекты цАМФ могут реализовываться не только через ПК А, но и путем связывания с белками внешней стороны внутренней мембраны митохондрии, что изменяет ее свойства и в результате приводит к изменениям функций митохондрии. Это существенно отличается от классических представлений, характерных для цитозоля эукариот. В то же время, у прокариот для этих вторичных посредников нет обычных рецепторных белков (кальмодулина и ПК А), и цАМФ действует на них через внутриклеточный цАМФ-рецепторный белок.

В каждой клетке функционирует специальная биохимическая надстройка, регулирующая чувствительность клеток к сигналу. Проиллюстрируем ее на примере рецептора, сопряженного с G-белками. Обычно уровень сигналов, действующих через систему трансмембранной сигнализации (к их числу помимо названных выше относятся простагландины, гормоны гипофиза, ангиотензин II, брадикинин, вазопрессин, окситоцин, гистамин, дофамин, энкефалин, эндорфин, серотонин, эндотелин, холецистокинин, гастрин, паратиреоидный гормон), повышается на несколько минут. Этого времени достаточно, чтобы произошло образование нужного количества вторичных посредников (цАМФ,  $\text{Ca}^{2+}$ , диацилглицерол), которые вызовут активацию соответствующих протеинкиназ и последующее за этим фосфорилирование белков-мишеней. Если же уровень сигнала сохраняется повышенным в течение десятков минут или даже часов (из-за гиперфункции эндокринной железы или фармакологического вмешательства), то происходит десенситилизация соответствующего рецептора. Мембранные протеинкиназы, присутствующие в плазматической мембране практически всех клеток, фосфорилируют рецептор, десенситилизуя его к присутствию лиганда. Такие киназы могут фосфорилировать только гормон-рецепторный комплекс, поэтому чем дольше гормон связан с рецептором, тем больше вероятность того, что рецептор будет уз-

нан и помечен киназой. Если такое фосфорилирование не в состоянии погасить гормональный сигнал, то спустя 15–30 мин происходит фосфорилирование рецептора второй протеинкиназой, которая активируется соответствующим вторичным посредником (например, в случае  $\beta$ -адренергических рецепторов, активирующих аденилатциклазу, – цАМФ-зависимой протеинкиназой; в случае  $\alpha$ 1-адренергических или  $M_1$  и  $M_3$ -холинергических рецепторов, активирующих фосфолипазу C, – протеинкиназой C). Вторичное фосфорилирование рецепторов нарушает их связь с G-белками, вследствие чего влияние гормонов ослабляется. Если высокий уровень гормона сохраняется в течение нескольких часов, и перечисленные выше механизмы десенсибилизации не в состоянии погасить регуляторный сигнал, происходит эндоцитоз гормон-рецепторных комплексов и внутри клетки появляются рецепторосомы, изолирующие рецепторные молекулы от сигнальных путей. Они могут вновь встроиться в плазматическую мембрану, если в последующем уровень гормона понизится. Если этого не происходит, они сливаются с лизосомами, после чего рецепторы разрушаются. Очевидно, что восстановление чувствительности клетки к этому гормону потребует нового синтеза рецепторов.

### **8.3. ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА В ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ КЛЕТКАХ СЕТЧАТКИ**

Фоторецепторные молекулы воспринимают в качестве сигнала квант света. Тем не менее, принципы передачи сигнала через мембрану у фоторецепторов и рецепторов гормонов весьма сходны. Зрительный *родопсин* локализован у большинства позвоночных в специализированных фоторецепторных клетках двух типов – палочках и колбочках, которые выстилают внутреннюю сторону сетчатки глаза (рис. 70). Палочки функционируют в условиях слабого освещения. Они очень чувствительны к световым сигналам и при сильном освещении десенсибилизируются. При ярком свете зрительный процесс обеспечивается колбочками. По-видимому, именно колбочки отвечают за объемное изображение, реагируют на перемещение предметов. Колбочки передают цветовую гамму изображения.

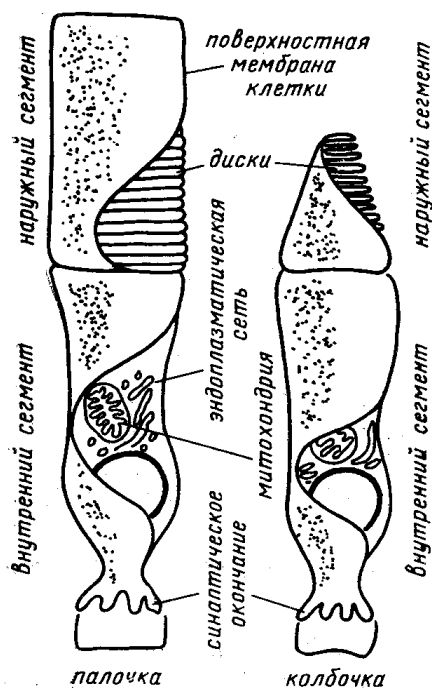


Рис. 70. Строение палочки и колбочки

В колбочках содержатся пигменты, поглощающие в различных областях спектра. У человека различают три вида колбочек, поглощающих свет в коротковолновой, средней и длинноволновой областях видимого спектра. Именно эти различия в свойствах пигментов колбочек лежат в основе цветового зрения. При слабом освещении колбочки не принимают сигнала, и глаз не воспринимает цвет объектов.

Рецепторная мембрана палочек состоит из замкнутых дисков, не соприкасающихся с цитоплазматической мембраной, в то время как в колбочках она образует систему складок. Таким образом, для передачи сигнала в палочках от диска к плазматической мембране необходим гидрофильный посредник.

Как палочки, так и колбочки условно делят на два сегмента: наружный и внутренний. Наружный сегмент содержит фоторецепторные мембраны, а внутренний – специализируется на генерации энергии и содержит аппарат, синтезирующий молекулы вторичных посредников, участвующих в передаче сигнала. Из внутреннего сегмента формируется синаптическое окончание, осуществляющее передачу сигнала к нервным волокнам. Наружный сегмент легко отделяется от внутреннего при мягкой гомогенизации мембран, что позволяет с помощью дифференциального центрифугирования выделять фоторецепторные мембраны в чистом виде.

Зрительный родопсин (как и бактериородопсин), содержит в активном центре 11-*цис*-ретиаль. Белковая часть родопсина без ретиналя называется *опсином* и функционирует как фермент. Первичные структуры зрительного родопсина и бактериородопсина различны. Полипептидная цепь родопсина состоит из 348 аминокислот. К молекуле белка присоединены две олигосахаридные цепи, присоединенные к остаткам аспарагина в положении 2 и 15. Как и у бактериородопсина, молекула зрительного родопсина пересекает мембрану 7 раз, используя участки первичной структуры, состоящих из гидрофобных аминокислот. Между собою они соединены короткими цепями гидрофильных аминокислотных последовательностей. Ретиаль расположен ближе к С-концу белка. Пигменты из колбочек сетчатки глаза человека, условно названные по области поглощаемого ими света «красный», «голубой» и «зеленый», обнаруживают в своей структуре чередование гидрофобных и гидрофильных участков, при этом «красный» и «зеленый» пигменты обладают высокой степенью гомологии с родопсином из палочек, а «голубой» значительно отличается от него.

Бактериородопсин и родопсин из палочек сетчатки практически не имеют гомологичных участков, однако они формируют сходные структуры в мембране, состоящие в каждом случае из 7 гидрофобных колонн. Вряд ли эти два пигмента имеют либо прямую эволюционную связь. По-видимому, упаковка молекулы ретиналя в 7  $\alpha$ -спиральных колонн является оптимальным способом обеспечения его функционирования в мембране в качестве первичного акцептора кванта света. Родопсин обладает характерным спектром поглощения в областях 280 и 500 нм (рис. 71).

В основе функционирования как родопсина, так и бактериородопсина лежит светозависимая изомеризация ретиналя. При поглощении кванта света 11-*цис*-ретиаль родопсина переходит полностью в *транс*-форму. Эта изомеризация запускает каскад реакций, сопровождающихся изменением спектра поглощения молекулы родопсина.

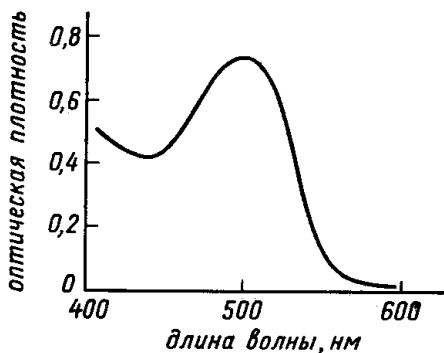


Рис. 71. Спектр поглощения зрительного родопсина

Таким образом, в результате поглощения фотона родопсином происходит образование опсина и свободного ретиналя. Другой результат этого процесса – гиперполяризация мембраны палочек. В норме на мембране палочек регистрируется так называемый «темновой ток», обеспечиваемый входом в клетку натрия и выходом калия за счет работы Na/K-АТ-Фазы (см. раздел 6.4.1). Трансмембранный потенциал при этом составляет

20 мВ. Вспышка света вызывает гиперполяризацию мембраны до 70 мВ. При этом ее величина пропорциональна интенсивности освещения.

Гиперполяризация мембран измеряется с помощью микроэлектродной техники и может быть создана в эксперименте приложением потенциала к самой мембране. С помощью этого метода было доказано, что гиперполяризация мембраны палочки является необходимым и достаточным условием передачи светового сигнала через синапсы к зрительным нейронам.

Таким образом, поглощение кванта света ретиномом родопсина, локализованным в диске, должно привести к гиперполяризации плазматической мембраны палочек, непосредственно не связанной с мембраной фоторецепторного диска. Наличие вторичного мессенджера (цГМФ) предполагало участие специального белка-посредника между ГТФ и родопсином, регулирующего процесс образования цГМФ. Этот белок был назван *трансдуцином*, так как он участвует в трансдукции (преобразовании) светового сигнала в электрический. Оказалось, что трансдуцин состоит из трех субъединиц –  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , способных к обратимой диссоциации.



Активированная светом молекула родопсина – *метародопсин-II* – образует специфический комплекс с трансдуцином, находящимся в комплексе с ГДФ, которая связывается с  $\alpha$ -субъединицей трансдуцина (рис. 72). Взаимодействие родопсина с трансдуцином катализирует обмен на  $\alpha$ -субъединице ГДФ на ГТФ. После этого комплекс трансдуцина с родопсином диссоциирует, и практически одновременно происходит диссоциация трансдуцина на  $\alpha$ -субъединицу, связанную с ГТФ, и на комплекс, состоящий из  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц.  $\alpha$ -субъединица трансдуцина в ГТФ-связанной форме активирует цГМФ-зависимую фосфодиэстеразу. Этот фермент имеет аналогичное строение (состоит из трех субъединиц,  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ). Ингибирование осуществляется за счет связывания связанной с ГТФ  $\alpha$ -субъединицы с  $\gamma$ -субъединицей фосфодиэстеразы. При этом  $\gamma$ -субъединица отделяется, а свободные  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы осуществляют гидролиз ГТФ. Этот процесс протекает с очень большой скоростью (до 4000 молекул в секунду).

Активирующее влияние трансдуцина на фосфодиэстеразу прекращается после гидролиза ГТФ. В дальнейшем комплекс  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц трансдуцина ассоциирует с ГДФ-связанной формой  $\alpha$ -субъединицы, и молекула трансдуцина снова приобретает способность взаимодействовать с фотоактивированным родопсином и весь цикл повторяется.

В результате активации одной молекулы родопсина образуется несколько сотен активных комплексов  $\alpha$ -субъединицы трансдуцина с ГТФ. Это первая стадия усиления. Затем  $\alpha$ -субъединица активирует фосфодиэстеразу. На этой стадии усиления сигнала нет, так как каждой субъединицей активируется только одна молекула фосфодиэстеразы. Затем комплекс  $\alpha$ -субъединицы с фосфодиэстеразой (который не диссоциирует, пока не пройдет гидролиз ГТФ) осуществляет превращение нескольких тысяч молекул цГМФ. В этот период происходит более чем тысячекратное усиление. Далее механизм усиления работает на мембранном уровне, регулируя натриевые каналы и генерируя электрический импульс. Подробное описание участия трансдуцина в передаче зрительного сигнала обнаруживает до малых

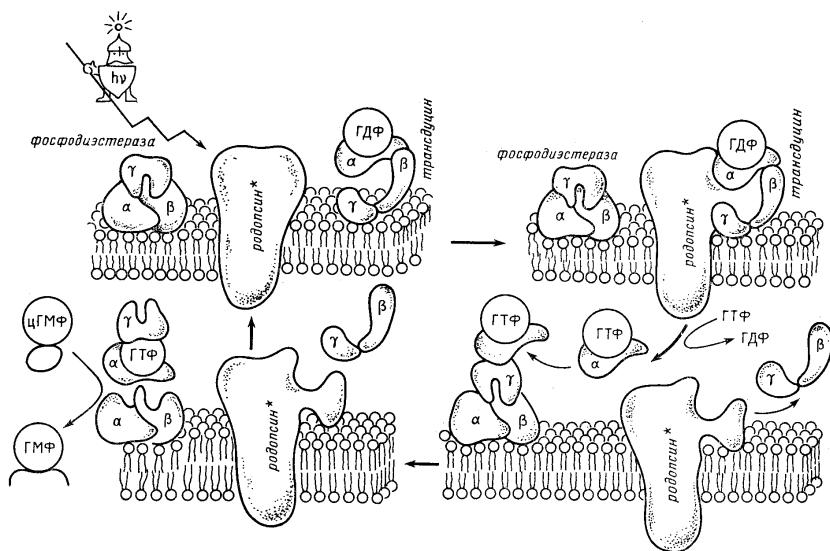


Рис. 72. Механизм функционирования зрительного родопсина

подробностей участие G-белков в образовании вторичных мессенджеров (см. ниже) Трансдуцин играет ключевую роль не только в активации, но и в инактивации сигнала. Включение и выключение сигнала осуществляются через  $\alpha$ -субъединицу. При этом ключевой стадией управления является гидролиз ГТФ до ГДФ. Реакции, ведущие к активации процесса, энергетически выгодны. Некоторые реакции инактивации требуют дополнительной энергии.

Родопсин инактивируется с помощью специальной протеинкиназы. Этот фермент присоединяет фосфатные группы к нескольким аминокислотам на одном конце полипептидной цепи опсина. Затем родопсин образует комплекс с белком, называемым *арестин*-ом, который блокирует связывание трансдуцина и возвращает систему в исходное «темновое» состояние.

Несмотря на то, что механизм передачи сигнала от фоторецепторного диска к плазматической мембране изучен достаточно подробно, ряд вопросов остается не выясненным. Во-первых, не вполне понятна роль ионов кальция. В некоторых работах

было показано, что светозависимое увеличение концентрации внутриклеточного кальция приводит к гиперполяризации мембраны, которая исчезает после удаления ионов Са. При этом хелатирующих  $\text{Ca}^{2+}$  агентов, снижает чувствительность фоторецепторной клетки к свету.

В последнее время активно обсуждается роль фосфоинозитидных мессенджеров в передаче сигнала в фоторецепторной клетке. Показано, что однократное освещение приводит к активации фосфоинозитидного цикла. Было показано, что освещение палочек активирует фосфолипазу  $\text{A}_2$ , и этот процесс зависит от трансдуцина, так как ингибируется коклюшным токсином. По-видимому, фосфоинозитидный цикл также участвует в передаче сигнала в фоторецепторной клетке, однако механизмы этого участия еще предстоит исследовать.

Функционирование родопсина в фоторецепторных дисках существенно зависит от липидного окружения. В фоторецепторной мембране низко содержание холестерина, а основные фосфолипиды, входящие в ее состав (фосфатидилхолин – 40%, фосфатидилэтаноламин – 38%, фосфатидилсерин – 13%), содержат подавляющее количество полиненасыщенных жирных кислот (до 90%). Такой состав мембраны, по-видимому, обеспечивает высокую степень жидкостности мембраны, необходимую для функционирования родопсина. В то же время, большое количество Полиненасыщенных жирных кислот делает фосфолипиды сетчатки уязвимыми для окислительного повреждения (см. предыдущую главу).

Механизмы работы фоторецепторов и рецепторов гормонов во многом подобны (см. рис. 65). Связывание гормона с рецептором приводит к активации G-белка, а возбуждение родопсина квантом света – к активации трансдуцина (рис. 73). Как активация G-белка, так и активация трансдуцина включают связывание ГТФ  $\alpha$ -субъединицей. G-белок активирует аденилатциклазу (АЦ), а трансдуцин – фосфодиэстеразу (ФДЭ). Оба этих фермента осуществляют свои функции через циклические нуклеотиды. цАМФ участвует в регуляции ферментов – эффекторов гормонов, а цГМФ индуцирует открытие натриевого канала в плазматической мембране фоторецепторной клетки.

Аналогия в передаче сигнала в фоторецепторной клетке с передачей гормонального сигнала усиливается тем, что трансдуцин и G-белок имеют не только общие функции, но и общую структуру. Все исследованные к настоящему времени белки этой группы имеют идентичные  $\beta$ -субъединицы, а  $\alpha$ -субъединица выполняет сходные функции. Исследование первичной структуры трансдуцина и трех G-белков из различных клеток выявило, что более 50% их по-

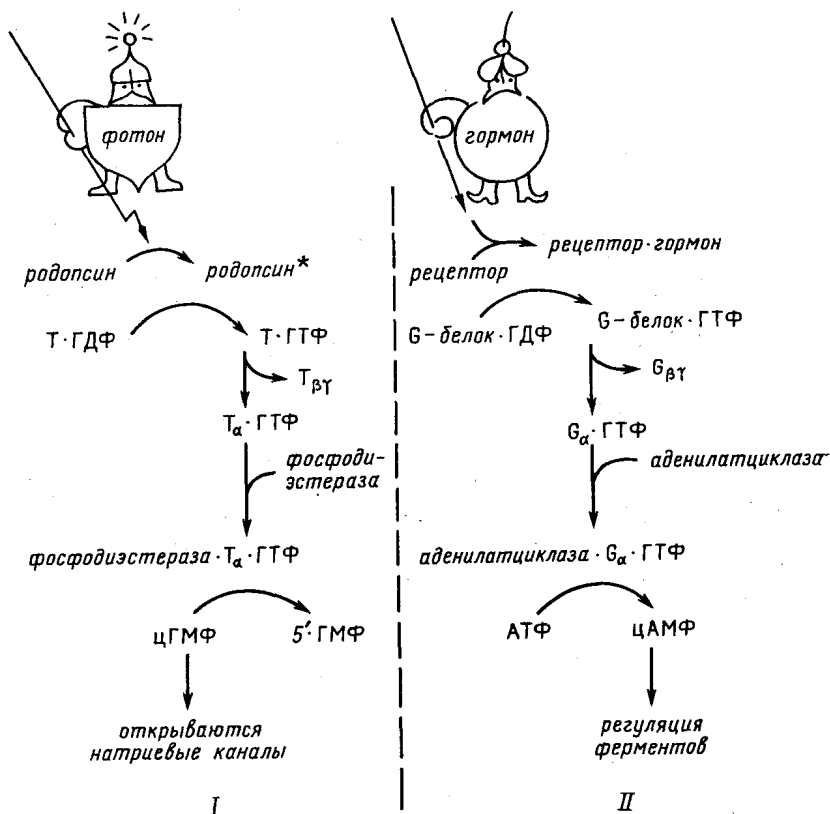


Рис. 73. Сравнение путей передачи гормонального и зрительного сигнала

липептидных цепей практически гомологичны. При этом в составе  $\alpha$ -субъединиц как трансдуцина, так и G-белков имеются как консервативные мотивы, так и мотивы, возникающие в ходе эволюции. И G-белки, и трансдуцин имеют три центра связывания: для рецептора, для гуаниловых нуклеотидов для белка-эффектора (аденилатциклазы для комплекса гормон-рецептор и фосфодиэстеразы в случае трансдуцина). Наиболее консервативными последовательностями аминокислот обладают центры связывания гуаниловых нуклеотидов.

Интересно, что участки связывания гуаниловых нуклеотидов в G-белках и трансдуцине оказались гомологичны областями связывания ГТФ в белке совершенно другого класса, в так называемом *факторе элонгации*. Этот фактор участвует в синтезе белка, образует комплекс цГМФ с молекулами аминоацил-тРНК и обеспечивая доставку аминокислот к месту удлинения полипептидной цепи. Цикл функционирования этого белка похож на цикл G-белков и трансдуцина – в основе его лежит механизм расщепления связанного в активном центре цГМФ. Возможно, что фактор элонгации является эволюционным предком трансдуцина и G-белков. Если это так, мы имеем еще одно подтверждение единства путей биохимической эволюции. Однажды найденный природой механизм используется для решения многих сходных задач.

#### **8.4. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОБОНЯНИЯ И УСИЛЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ЗАПАХОВЫХ СИГНАЛОВ**

В начале 50-х годов XX в. Эрл Сёзерленд на примере адреналина, стимулирующего образование глюкозы из гликогена, расшифровал принципы действия адреналинового рецептора, который оказался общим для широкого круга рецепторов. Уже в конце XX в. было обнаружено, что восприятие запахов осуществляется аналогичным образом, вплоть до деталей строения белков-рецепторов.

Первичные рецепторные белки – это весьма сложные молекулы, связывание которых со своими субстратами вызывает в них

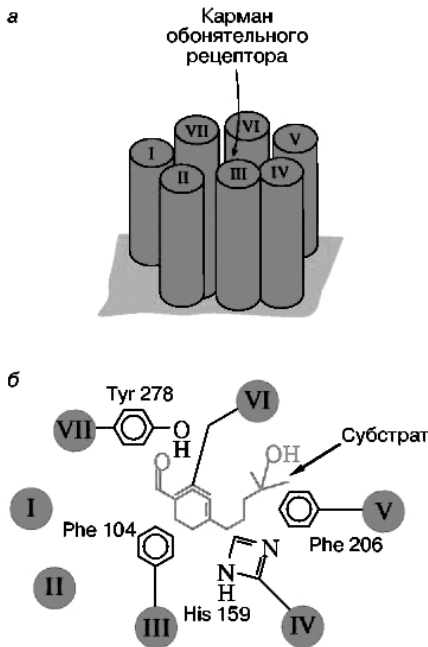


Рис. 66. Схема строения обонятельного рецептора

а — поперечное сечение семи-доменной структуры; б — схема взаимодействия одорант (лирал) — рецептор (вид сверху).

ощутимые структурные изменения, вслед за которыми начинается каскад каталитических (ферментативных) реакций. Для рецептора запаха (одорантного), так же как и для зрительного рецептора, этот процесс завершается нервным импульсом, воспринимаемым нервными клетками соответствующих отделов мозга.

На рис. 66 схематически показан механизм действия адренаинового рецептора. Согласно последним данным, строение одорантного рецептора совершенно аналогично.

Как видно на рисунке 74 рецепторный белок включает такую последовательность аминокислот, которая содержит семь гидрофобных регионов от 20 до 28 остатков в каждом. Эти полипептидные участки, свернутые в  $\alpha$ -спи-

раль, образуют микротрубочки. Таким образом, рецепторный интегральный белок представляет собой своеобразную пачку из семи микротрубочек, пересекающих биомембрану. Толщина липидного бислоя в мембране составляет 30 Å, а длина одного остатка в  $\alpha$ -спирали равна 1,5 Å. Пептидные участки в 20–28 остатков на  $\alpha$ -спиральном участке белковой молекулы имеют достаточную длину, чтобы пересечь мембранный бислой. Такая структура интегральных белков характерна для рецепторов опсина в сетчатке глаза, рецепторов серотонина, адренаина, гистамина и одорантов.

С внешней стороны клеточной мембраны белок-рецептор представляет собой розетку, построенную однотипно для разных рецепторных систем. На рис. 74 представлена схема взаимодействия между молекулой *лирала* (синтетический одорант) и обонятельным рецептором крысы, представленным пятью гидрофобными доменами. В таких схемах в настоящее время широко используются аналоговые компьютерные модели, поскольку для большинства белков пока еще не имеется точных рентгеноструктурных данных.

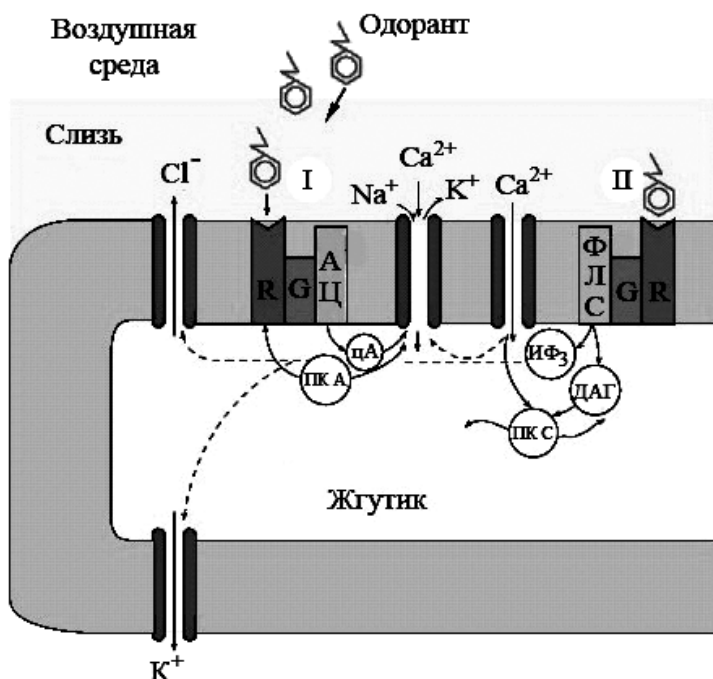


Рис. 75. Схематическая диаграмма строения обонятельного жгутика и два химических механизма усиления сигнала запаха внутри обонятельного волоска

I – мембранный интегральный комплекс – рецептор (R) + ГТФ-связывающий белок (G) + аденилатциклаза (АЦ); II – мембранный интегральный комплекс – рецептор (R) + ГТФ-связывающий белок + фосфолипаза С (ФЛС).

Согласно этим представлениям, обонятельный рецептор образован семью гидрофобными доменами мембранного белка. Лиганд-связывающие аминокислотные остатки формируют «карман», расположенный, по крайней мере, на расстоянии 12 Å от поверхности клетки. Он похож на аналогичный центр рецептора адреналина и связывающий карман других надмолекулярных мембранных комплексов, также содержащих по семь гидрофобных спиральных доменов внутри мембранной структуры.

В мембране обонятельного волоска представлены обе триады мембранных интегральных белков, представляющих собой нековалентно связанные рецепторы, G-белки и ферменты, образующие соответствующие вторичные мессенджеры, которые запускают внутриклеточный каскад реакций (рис. 75). Таким образом, фосфорилирование белков протеинкиназами и дефосфорилирование их соответствующими фосфатазами оказалось универсальным механизмом мгновенного ответа клетки на внешнее воздействие.

В результате фосфорилирования мембранных белков открываются каналы проводимости катионов, и, как следствие, мгновенно меняется мембранный потенциал клетки, в результате чего генерируется потенциал действия. Последний передается по аксону в обонятельную луковицу, где и происходит оценка и отделение биологически значимых сигналов от обонятельного «шума», а затем отобранные сигналы направляются в мозг, где и вызывают поведенческий ответ.

### ***8.5. РЕЦЕПТОРЫ ВОЗБУДИМЫХ ТКАНЕЙ***

В каждой клетке функционируют обычно несколько разных рецепторов к одному и тому же химическому сигналу (например,  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторы). В дополнение, клетка чувствительна к нескольким регуляторным молекулам (нейромедиаторам, гормонам, простагландинам, факторам роста). Каждый из этих регуляторов имеет характерные продолжительность и амплитуду регуляторного сигнала. На уровне исполнительных систем клетки может происходить как потенцирование, так и взаимное гашение разных регуляторных сигналов.



Передача сигнала через мембрану не всегда сопряжена с включением G-белков. Существенное количество рецепторов, как мы говорили, имеет свойства самостоятельного канала. Эти рецепторы объединяются в класс рецепторов быстрого ответа и осуществляют ответ на сигнал в течение нескольких миллисекунд. На возбудимые ткани, к которым относятся нервные, мышечные и секреторные клетки, информация передается через специальное образование – синапс. Из окончания нервной клетки выделяется нейромедиатор, взаимодействующий с рецепторами постсинаптической мембраны другой клетки. Наиболее типичным примером подобных рецепторов является ацетилхолиновый рецептор (холинорецептор). Холинорецепторы подразделяются на два типа: никотиновые и мускариновые. Как для первых, так и для вторых агонистом является ацетилхолин, однако первый тип рецепторов активируется еще и никотином, а второй – мускарином, веществом, содержащимся в мухоморе (*Amanita muscaria*).

Никотиновые рецепторы расположены в месте контакта аксонов со скелетными мышцами, а мускариновые сосредоточены в мозге, секреторных клетках, гладкой и сердечной мышцах. Успех в исследовании рецепторов во многом обязан применению природных токсинов, в первую очередь, ядов пчел, пауков, змей и некоторых земноводных. Эти яды содержат фосфолипазы, разрушающие мембранные фосфолипиды, что также приводит к нарушению передачи сигнала в клетке, но наиболее прямой путь парализовать жертву – ингибировать ее быстрые рецепторы. Этим путем и пошла эволюция, в результате которой у некоторых животных из различных классов (рыбы, земноводные, змеи, насекомые) появились яды – блокаторы быстрых рецепторов.

$\alpha$ -Бунгаротоксин из яда змей семейства эланидов (кобры, мамбы и др.), способен селективно и необратимо связываться с никотиновым холинорецептором. Это позволило идентифицировать рецепторный белок и очистить его. Первичная структура холинорецептора сначала была установлена для белка из электрического органа ската (в этой ткани концентрация рецепторного белка на два порядка превышает его концентрацию в других тканях, что существенно облегчает процедуру выделения). Позднее на основе

исследования соответствующих генов первичная последовательность холинорецептора была определена для тканей человека, теленка, цыпленка и некоторых других животных.

Холинорецептор (рис. 76) состоит из четырех субъединиц –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ ; их молярное соотношение в белке 2:1:1:1, а молекулярные массы – 40, 50, 60 и 65 кДа соответственно. Все субъединицы рецептора гликозилированы, и на долю углеводного компонента приходится около 20 кДа. Первичная последовательность всех субъединиц холинорецептора у различных классов животных весьма консервативна: гомология превышает 50%, а для некоторых субъединиц (например,  $\alpha$ -субъединица электрического ската и человека) – 80%. Из изолированных  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -субъединиц ткани электрического ската и  $\gamma$ -субъединицы теленка удалось реконструировать холинорецептор, обладающий функциональной активностью.

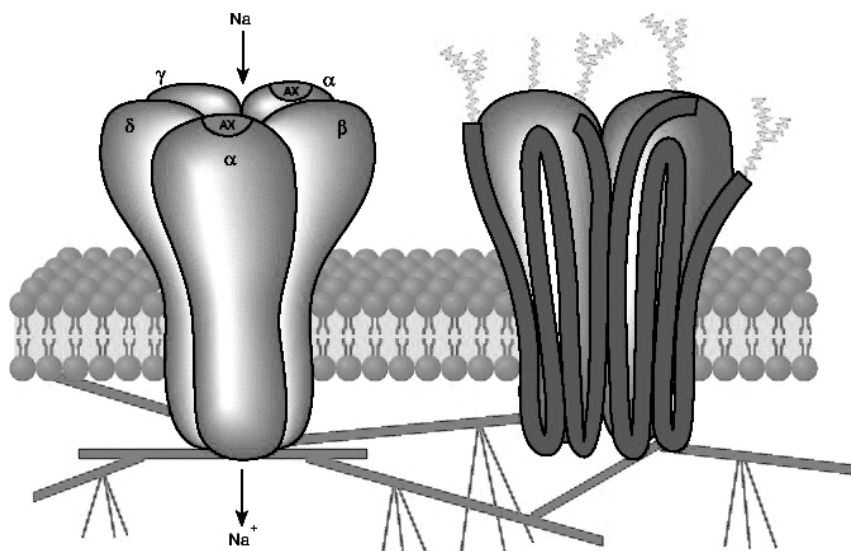


Рис. 76. Структура никотинового холинэргического рецептора, формирующего ионный канал

Субъединицы, полипептидные цепи которых четыре раза пронизывают липидный бислой, гликозилированы извне клетки, а внутри взаимодействуют с белками тубулинового и актинового цитоскелета.

Пять субъединиц холинорецептора, в последовательности  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\gamma$ - $\delta$  образуют канал, проницаемый для ионов натрия, калия, кальция и даже некоторых органических катионов. Холинорецептор локализован на постсинаптической мембране клетки и при связывании ацетилхолина изменяет свою конформацию таким образом, что через устье, сформированное канальными субъединицами, внутрь клетки устремляются ионы  $\text{Na}^+$ . Происходит деполяризация мембраны, что приводит к выходу  $\text{K}^+$  из клетки. Ток ионов  $\text{K}^+$  возвращает потенциал мембраны к исходной величине. В процессе этой перезарядки мембраны, осуществляемой потенциалом действия, через этот же канал внутрь клетки могут входить ионы  $\text{Ca}^{2+}$ . Следовательно, этот канал нельзя назвать избирательным в отношении катионов. В то же время это быстродействующая регуляторная система – потенциал действия, вызываемый ацетилхолином, возникает и затухает в тканях мозга за 1–2 мсек, благодаря чему синапс может проводить от аксона на иннервируемую клетку до 500 имп/с. В нервно-мышечном синапсе потенциал действия длится несколько дольше (80–120 мсек).

Такое быстрое развитие и тушение сигнала возможны благодаря скорости связывания ацетилхолина с рецептором, а также высоким скоростям его диссоциации от рецептора и разрушения ацетилхолинэстеразой. Разумеется, не менее важен и механизм открывания канала за счет конформационных переходов, происходящих в наносекундном интервале. Бесперебойное функционирование холинергического синапса требует большого запаса ацетилхолина, который синтезируется впрок и накапливается в везикулах пресинаптической мембраны. Кроме того, в клетках должны существовать достаточно высокие градиенты ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  по обе стороны плазматической мембраны, которые создаются и поддерживаются  $\text{Na/K}$ -насосом.

Быстродействие ацетилхолина (как и других нейромедиаторов) определяется также особенностями того морфологического образования, которое существует между аксоном и иннервируемой клеткой и которое называется синапсом. Благодаря тому, что расстояние между пре- и постсинаптической мембранами составляет всего 300–500 Å, а холинорецепторы сконцентрированы в виде

кластеров в области участков секреции ацетилхолина, в момент разрыва секреторного пузырька нейромедиатор быстро оказывается в месте его рецепции. Кроме того, при раздражении аксона происходит выброс столь большого количества ацетилхолина, что молекулы этого нейромедиатора мгновенно насыщают все рецепторы и вызывают массиванный вход  $\text{Na}^+$  в клетку (развитие потенциала действия).

Холинергические рецепторы никотинового типа имеют довольно низкое сродство к ацетилхолину – полумаксимальное насыщение рецепторов наблюдается в присутствии  $10^{-4}$  М ацетилхолина, поэтому как только ацетилхолинэстераза (локализованная в областях, соседствующих с молекулами холинорецептора) начинает гидролизовать ацетилхолин и понижать его уровень в синапсе, происходят диссоциация этого нейромедиатора от рецептора и возвращение канала в закрытое состояние.

Сродство рецептора к нейромедиатору или гормону определяется соотношением скоростей диссоциации и ассоциации гормон-рецепторного комплекса. При константе диссоциации  $10^{-4}$ – $10^{-3}$  М скорость диссоциации ацетилхолина от рецептора составляет доли миллисекунды, что, очень важно для быстрого восстановления синаптической передачи.

По «канальному» механизму работают и некоторые другие рецепторы, имеющие близкую молекулярную массу и, как правило, состоящие из нескольких субъединиц. В зависимости от селективности ионов, пропускаемых каналом, эти рецепторы генерируют деполяризацию или гиперполяризацию мембраны. Вероятно, что «ворота» каналов всех этих рецепторов открываются по единому механизму, так как у некоторых субъединиц различных рецепторов найдены гомологичные участки.

Совершенно иную, отличающуюся от холинергического рецептора никотинового типа, структуру и другой механизм функционирования имеет так называемый мускариновый холинергический рецептор (мХР) (рис. 77), который локализован преимущественно вне синапса. На этот рецептор не действует никотин, но он легко активируется мускарином (алкалоидом из ядовитых грибов), а также, разумеется, ацетилхо-

лином, к которому имеет сродство порядка  $10^6$  М. Существуют, по крайней мере, четыре типа мускариновых рецепторов, причем все они близки по структуре (их полипептидная цепь семь раз пронизывает мембрану) и сопряжены с G-белками, но передают сигнал разным системам внутриклеточной сигнализации. Так, например, мХР могут стимулировать фосфолипазу С, которая гидролизует фосфоинозитиды, и ингибировать аденилатциклазу, а также активировать  $K^+$ -канал. К этому классу рецепторов относятся и адренергические рецепторы, а также опиатные рецепторы коры полушарий мозга.

Ответ этих рецепторов растянут во времени. Эффекты мускариновых холинорецепторов развиваются спустя 1–2 мин после взаимодействия с рецептором и гасятся за десятки мин. Столь разительное отличие в скоростях проведения ацетилхолинового сигнала между никотиновым и мускариновым рецепторами объясняется, прежде всего, разной кинетикой связывания лиганда с соответствующими рецепторами (диссоциация ацетилхолина от мускаринового рецептора происходит весьма медленно), сложным каскадом проведения сигнала в случае мускариновой регуляторной системы (необходимо

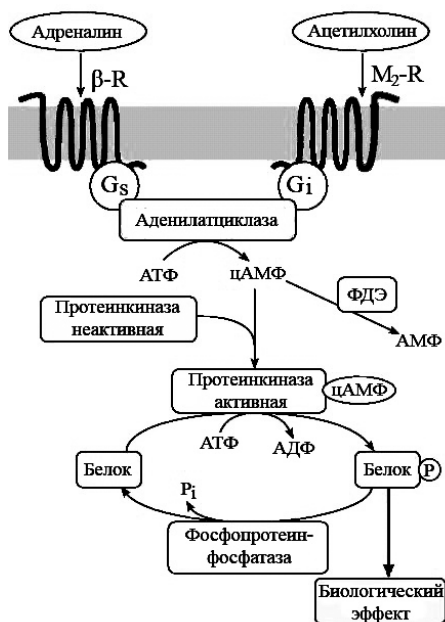


Рис. 77. Система проведения сигнала путем образования вторичных посредников и последующей химической модификации белков

$\beta$ -R – бета-адренергический рецептор,  $M_2$ -R – холинергический рецептор мускаринового типа.

последовательное взаимодействие рецептора с соответствующим G-белком, затем G-белка с определенным ферментом или каналом), а также сравнительно медленно протекающими реакциями синтеза вторичных посредников, фосфорилирования и дефосфорилирования белков.

### **8.6. МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ**

Функционирование ионных каналов может зависеть от локального растяжения мембраны и изменения градиента ее кривизны. Канальные структуры, которые изменяют свою активность в зависимости от натяжения мембраны, называются механочувствительными, хотя кроме них описаны каналы, увеличивающие активность и при обратном изменении натяжения. Впервые  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие механочувствительные каналы были показаны на эндотелиальных клетках животных, где они выполняют роль сенсора кровяного давления. Каналы с аналогичными свойствами были обнаружены в бактериях, грибах и высших растениях.

Функционирование механочувствительных каналов происходит в тесном взаимодействии с цитоскелетом. Чувствительность этих каналов к натяжению возрастает, если сила, приложенная к большому участку мембраны, концентрируется на канале посредством элементов цитоскелета. Связь осуществляется набором белков, известных как *анкирины* (см. выше).

Выделяют два типа каналов, чувствительных к натяжению мембраны: SA-каналы (stretch-activated), активирующиеся при растяжении мембраны и SI-каналы (stretch-inactivated), которые при растяжении мембраны инактивируются. В зависимости от объекта и типа клетки встречаются механочувствительные каналы, селективные к  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , а также  $\text{Ca}^{2+}$  и другим двухвалентным катионам, проницаемые для одно- и двухвалентных катионов, и неселективные (или слабоселективные) для анионов и катионов. Наиболее часто в качестве ингибитора механочувствительных каналов используют гадолиний ( $\text{Gd}^{3+}$ ), который обратимо блокирует работу каналов в низких концентрациях (10 мкМ), действуя с наружной стороны мембраны.

В отличие от рецептор- и потенциал-зависимых ионных каналов, механочувствительные каналы имеют гораздо меньшую плотность распределения в мембранах (она составляет в среднем  $1/\text{мкм}^2$ ). Тем не менее, при мембранном потенциале  $-60\text{ мВ}$  кальциевый ток через SA-канал может достигать величин  $0,1\text{ нА}$ . Наиболее важное значение механочувствительные ионные каналы имеют в ростовых движениях различного типа и в регуляции работы устьичного аппарата. Механическое взаимодействие клеток в ходе их развития приводит к натяжению (или сдвигам) клеточных мембран, активации механочувствительных каналов и появлению векторных ионных потоков, которые уже непосредственно осуществляют регуляцию процессов роста и дифференцировки.

У млекопитающих (в том числе, у человека) функционирование механорецепторов выстилки слизистой желудка обеспечивают ощущение сытости. При генетическом нарушении этих каналов возникают заболевания, приводящие к булимии.

### **8.7. РЕЦЕПТОРЫ, ОТВЕЧАЮЩИЕ ЗА ПЕРЕНОС МАКРОМОЛЕКУЛ В КЛЕТКУ**

Информация может передаваться в клетку не только с помощью ионных каналов или цепи реакций, регулируемых G-белками. На поверхности некоторых клеток имеются рецепторы, способные распознавать макромолекулы и «организовывать» их перенос через мембрану внутрь клетки. К таким клеткам относятся макрофаги, осуществляющие один из первых актов активации иммунной системы. В этом случае участок плазматической мембраны обволакивает захватываемый материал, который в итоге попадает внутрь клетки. В процессе этого акта он заключается в мембранный пузырек-везикулу, стенки которой образуются из участков плазматической мембраны. Этот процесс называется *эндоцитозом*.

Существуют три вида эндоцитоза: 1) *фагоцитоз* – захват клеткой больших структурных компонентов, вплоть до целых клеток, например клеток бактерий одноклеточными организмами

и макрофагами; 2) *пиноцитоз* – неспецифический захват клетками внеклеточной жидкости и ее содержимого; 3) специфический захват молекул, опосредованный специальными рецепторами (рис. 78).

В этом разделе мы рассмотрим только специфический эндоцитоз. Впервые эндоцитоз, обусловленный специфическими рецепторами, был обнаружен в середине прошлого века при изучении захвата яйцеклетками белков, которые используются для питания зародыша. Позднее было выяснено, что некоторые белки синтезируются в печени, оттуда переносятся руслом крови к яичникам, там связываются со специфическими рецепторами плазматической мембраны *ооцита*, а затем происходит «впячивание» плазматической мембраны, после чего рецептор с белком попадает внутрь клетки.

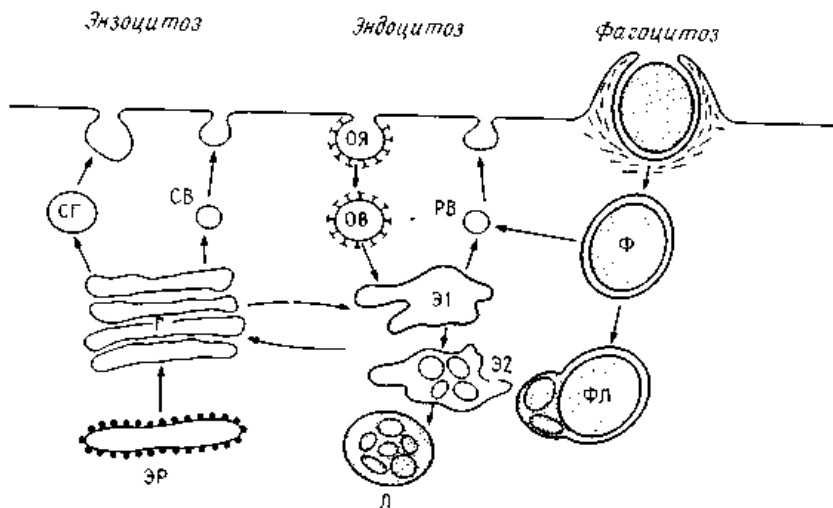


Рис. 78. Схематическое изображение мембранного транспорта между внутриклеточными вакуолями и плазматической мембраной

ЭР – эндоплазматический ретикулум, СГ – секреторная гранула, СВ – секреторная везикула, Л – лизосома, Э1 – периферическая эндосома, Э2 – перинуклеарная эндосома, ОВ – окаймленная везикула, ОЯ – окаймленная ямка, РВ – рециклирующая везикула, ФЛ – фаголизосома, Ф – фагосома, Г – аппарат Гольджи.



У млекопитающих по механизму опосредованного специфическими рецепторами эндоцитоза передаются структурные носители иммунитета от материнского организма к плоду. Антитела из кровотока материнского организма связываются с клетками плода, окружающими желточный мешок. На поверхности этих клеток имеются рецепторы, специфически связывающиеся с иммуноглобулинами и переносящие их в кровоток плода.

Клетки иммунной системы также функционируют с помощью эндоцитоза. Макрофаги захватывают антиген, внутри клетки он претерпевает *процессинг* – расщепление гидролитическими ферментами с вычленением сравнительно небольших фрагментов, несущих отдельные антигенные детерминанты. Заключительный этап этого процесса – *экспрессия* фрагментов антигена на поверхность макрофага, где они оказываются в комплексе с собственными антигенами гистосовместимости II класса (которые можно рассматривать как своего рода рецепторы). Далее запускается специфическая цепь иммунологических реакций, в которой участвуют лимфоциты различных типов.

В основе пиноцитоза и опосредованного рецепторами поглощения растворенных веществ лежит образование окаймленных ямок и окаймленных везикул. Термин «окаймленные ямки» относится к морфологии этих структур, выявляемой с помощью электронной микроскопии. Отличительной их особенностью является наличие решетчатой структуры из молекул белка клатрина, который связывается с углублениями на поверхности плазматической мембраны и везикулами, образующимися из таких ямок.

На долю окаймленных ямок обычно приходится 1–2% общей площади поверхности плазматической мембраны, и большинство белков плазматической мембраны не обнаруживаются на этих участках. Однако определенные белки концентрируются в области формирования окаймленных ямок (возможно, с помощью специальных механизмов), и концентрация некоторых белков в этих ямках очень высока.

Как показано в модельных экспериментах *in vitro*, после образования эндоцитозных везикул оболочка из клатрина удаляется специфическим белком в ходе АТФ-зависимой реакции. Везикулы без

клатрина становятся частью сложной системы трубочек и везикул, называемых периферическими эндосомами; они локализованы вблизи плазматической мембраны. Конечный пункт эндоцитозного пути находится во вторичных лизосомах, где происходит деградация отдельных растворенных веществ (таких, как ЛНП).

В табл. 12 перечислены некоторые рецепторы плазматической мембраны, участвующие в поглощении специфических лигандов с помощью окаймленных ямок и везикул. В некоторых случаях сродство рецептора к окаймленным ямкам постоянно, в других случаях рецепторы концентрируются в этих структурах только при связывании лиганда (например, рецептор фактора роста эпидермиса). Примерно 70% рецепторов ЛНП сконцентрировано в клатриновых ямках, где они легко подвергаются интернализации. Физиологический смысл этого явления заключается в том что с помощью опосредованного рецепторами эндоцитоза происходит захват клетками ЛНП из кровяного русла. Этот механизм представляет собой основной путь «доставки» холестерина к клеткам.

Таблица 12. Некоторые рецепторы, интернализуемые при эндоцитозе

Группы рецепторов	Примеры рецепторов
I. Рецептор возвращается к клеточной поверхности, лиганд поступает в лизосомы	Рецепторы маннозы, асиалогликопротеина (галактозы), маннозо-6-фосфата, $\gamma$ -макроглобулина, ЛНП
II. Рецептор и лиганд поступают в лизосомы	Рецепторы ФРЭ, инсулиновый
III. Трансцитоз	IgA/IgM-рецептор, IgG-рецептор
IV. Рецептор и лиганд возвращаются к одному и тому же домену плазматической мембраны	Трансферриновый рецептор

Рецепторы ЛНП были открыты на мембранах фибробластов в конце XX в. Оказалось, что они специфически связывают ЛНП за счет «узнавания» апо-протеина 5-100 или апопротеина Е. При этом специфичность узнавания так велика, что связывание происходит даже при концентрации ЛНП  $10^{-9}$ М. Свободный холестерин, покидая лизосомы, участвует в формировании мембран, а в специализированных клетках надпочечников и яичников включается в син-

тез стероидных гормонов. Рецепторы ЛНП присутствуют практически во всех тканях, наибольшая их плотность наблюдается в клетках печени, надпочечников и яичников – органах, испытывающих наибольшую потребность в холестерине.

ЛНП-рецептор человека – это типичный рецептор группы I, который возвращается к плазматической мембране, в то время как его лиганд, сывороточный ЛНП, попадает в лизосому. По данным об аминокислотной последовательности рецептора он состоит из пяти доменов. Выраженная гомология с другими мембранными рецепторами отсутствует. Рецептор имеет единственный трансмембранный домен и непротяженный цитоплазматический С-концевой домен. Показано, что у лиц с таким генетическим заболеванием, как семейная гиперхолестеролемия, функция ЛНП-рецепторов существенно ослаблена.

## ПОСЛЕСЛОВИЕ

Завершая эту книгу, мы вполне отдаем себе отчет, как мало сумели рассказать о проблемах, составляющих суть современной биомембранологии – науки о законах организации, функционирования и устойчивого воспроизведения клеточных мембран. Мы сознательно стремились к краткости изложения, чтобы не загромождать книгу избыточным фактическим материалом. Одновременно мы старались продемонстрировать динамический характер этой новой науки, подчеркнуть наличие в ней точек роста и безусловных перспектив.

Вряд ли нам удалось при этом следовать строгой систематике в изложении материала – в этой области клеточной биологии не так много написано учебников, на опыт которых можно было бы опираться. Понимая, что поставленные нами при написании этого учебника задачи частично противоречат друг другу, мы решили отдать предпочтение главному – привлечь внимание читателя к важности знаний в молекулярной биологии клеточных мембран – в современной биологии эта дисциплина обеспечивает залог успеха в нахождении перспективных проблем и успешного их решения.

Петрозаводск, 2005 г.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Невзирая на скудость учебной литературы в рассматриваемой области, эта книга возникла не на пустом месте. Нас очень поддерживали Нина Николаевна НЕМОВА, Игорь Петрович АШМАРИН, Владимир Александрович ГОЛИЧЕНКОВ, Зинаида Александровна СУСЛИНА и Сергей Александрович ЧЕПУРНОВ, чьи дружеские дискуссии и стимулирующая критика помогали избежать излишних повторений, ошибочных формулировок, чрезмерного педантизма в изложении. И если читатель все же найдет в этом издании недостатки – они целиком остаются на нашей совести. Мы будем благодарны за любую критику, которую используем для дальнейшего совершенствования книги.

Мы благодарны нашим коллегам за оригинальные публикации в научной периодике, позволившие оживить разнообразными иллюстрациями изложение этого материала, и надеемся, что они не поставят нам в укор невозможность сослаться на все первоисточники.

Но больше всего мы признательны нашим студентам - слушателям этого курса, убедившим нас своим интересом в необходимости написания настоящего пособия.

*Авторы*

## СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Анисимов В.Н.* Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб. 2003.
- Биологические мембраны. Изд. МП-ИКВА, 1992.
- Биохимия мозга (Под ред. И.П. Ашмарина), 1999. Гл. 11
- Болдырев А.А.* Карнозин: биологическая роль и возможности применения в медицине. М. 1998.
- Введение в биомембранологию. (Под ред. А.А. Болдырева) М. 1990.
- Геннис Р.* Биомембраны, молекулярная структура и функции. М. 1999.
- Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М. 2000.
- Ивков В.Г., Берестовский Г.Н.* Динамическая структура липидного бислоя. М. 1981
- Ивков В.Г., Берестовский Г.Н.* Липидный бислой биологических мембран. М. 1982.
- Конев С.В.* Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. Минск. 1987.
- Нейрохимия (Под ред. И.П. Ашмарина) М. 2001.
- Пальцев М.А.* (ред.) Введение в молекулярную медицину. М. 2004.
- Ткачук В.А.* Основы молекулярной эндокринологии. М. 1989.
- Скулачев В.П.* Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. М. 1989.
- Соросовский образовательный журнал <<http://journal.issep.ru>>.
- Шалабодов А.Д., Гусева Н.В.* Основы мембранного транспорта. Тюмень. 2001.
- Chapman D.* Phase transition and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. Quart. Rev. Biophys. 1975, 8, 185–234.
- Helenius A., Simens K.* Solubilization of membranes by detergents. Biochem. Biophys. Acta, 1975, 415, 29–79.
- Nature: Neurological disorders, 1999, 399 (Suppl.) #6738.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

К читателю .....	3
Список сокращений .....	4
<b>1. Эволюция представлений о строении мембран .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Клеточные мембранные структуры .....</b>	<b>9</b>
<b>3. Биологические функции мембран .....</b>	<b>15</b>
<b>4. Состав биологических мембран .....</b>	<b>18</b>
4.1. Мембранные липиды .....	18
4.1.1. Фосфолипиды, гликолипиды, стероиды .....	18
4.1.2. Роль холестерина в биологических мембранах .....	25
4.1.3. Жирные кислоты и их пространственная конфигурация .....	29
4.2. Принципы организации липидного бислоя .....	35
4.2.1. Фосфолипиды как структурная основа бислоя .....	35
4.2.2. Трансмембранная асимметрия липидов .....	42
4.2.3. Различные виды подвижности компонентов липидного бислоя .....	43
4.2.4. Дефектные зоны. Роль холестерина .....	45
4.2.5. Микровязкость мембран .....	49
4.2.6. Фазовые переходы мембранных липидов .....	49
4.2.7. Биологические функции мембранных липидов .....	54
4.3. Углеводы мембран .....	56
4.4. Мембранные белки – особенности строения .....	57
4.4.1. Локализация и подвижность белков в бислое .....	60
4.4.2. Белок-липидные взаимодействия .....	66
4.4.3. Функции мембранных белков .....	67
4.5. Цитоскелет и гликокаликс мембран .....	69
<b>5. Современные подходы к исследованию клеточных мембран .....</b>	<b>74</b>
5.1. Выделение и характеристика мембранных фракций .....	74
5.2. Методы исследования мембранных структур .....	78
5.2.1. Дифракция рентгеновских лучей .....	78
5.2.2. Электронная микроскопия .....	79
5.3. Методы изучения динамического поведения мембранных систем и липид-белковых взаимодействий .....	82

5.3.1. Микровязкость мембран и применимость мембранных зондов .....	84
5.3.2. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) ....	87
5.3.3. Деполяризация флуоресценции .....	90
5.3.4. Ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) .....	92
5.3.5. Метод кругового дихроизма .....	96
5.3.6. Метод сканирующей калориметрии .....	97
5.3.7. Флуоресцентная спектроскопия .....	99
<b>6. Транспорт веществ через мембрану .....</b>	<b>103</b>
6.1. Характеристика транспортных процессов .....	103
6.2. Транспорт воды .....	120
6.3. Ионный гомеостаз клетки .....	120
6.4. Молекулярные основы первично-активного транспорта ионов .....	128
6.4.1. Na/K-АТФаза .....	130
6.4.2. H <sup>+</sup> -АТФаза .....	138
6.4.3. Са-АТФазы .....	140
<b>7. Активные формы кислорода и состояние окислительного стресса .....</b>	<b>144</b>
7.1. Системы генерации и утилизации АФК и продуктов ПОЛ .....	144
7.2. Участие АФК в лейкоцитарном взрыве и синтезе простагландинов .....	154
7.3. АФК и продукты ПОЛ как сигнальные молекулы ....	158
7.4. Нарушения мембранных структур, связанные с повышением концентрации АФК .....	161
<b>8. Передача (трансдукция) информации через клеточную мембрану .....</b>	<b>171</b>
8.1. Типы рецепторов .....	173
8.1.1. G-белки и вторичные мессенджеры .....	178
8.1.2. Роль мембранных фосфоинозитидов в передаче сигнала .....	184
8.1.3. Метаболизм фосфоинозитидов и регуляция проницаемости мембран для ионов Са <sup>2+</sup> .....	189
8.1.4. Другие типы вторичных посредников .....	191



8.2. Передача гормонального сигнала через мембрану.....	192
8.3. Передача сигнала в фоторецепторных клетках сетчатки .....	197
8.4. Биохимические механизмы обоняния и усиления первичных запаховых сигналов .....	205
8.5. Рецепторы возбудимых тканей .....	208
8.6. Механочувствительные ионные каналы .....	214
8.7. Рецепторы, отвечающие за перенос макромолекул в клетку .....	215
Послесловие .....	220
Благодарности .....	221
Список рекомендуемой литературы .....	222

Александр Александрович Болдырев  
Елена Ивановна Кяйвярйнен  
Виктор Александрович Илюха

## **БИОМЕМБРАНОЛОГИЯ**

Учебное пособие

*Печатается по решению Ученых Советов  
МБЦ МГУ им. М.В. Ломоносова,  
Института биологии  
Карельского Научного Центра РАН,  
Института неврологии РАМН*

Изд. лиц. №00041 от 30.08.99. Подписано в печать 17.01.06.  
Формат 60х84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Печать офсетная.  
Уч.-изд. л. 14,0. Усл. печ. л. 13,1. Тираж 200 экз. Изд. № 17. Заказ № 563

Карельский научный центр РАН  
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50  
Редакционно-издательский отдел