

УДК 577.41+577.171.53

## РАСЧЕТ ЗАВИСИМОСТИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ОТ НАПРЯЖЕННОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ

М. В. Фок, Г. А. Зарицкая

*Предлагается и обсуждается молекулярный механизм изменения проницаемости для кислорода цитоплазматических мембран клеток. Обсуждается различие мембран эритроцитов и мышечных клеток.*

В статье [1] было показано, что помимо величины напряженности электрического поля, имеющегося в их цитоплазматической мембране (оболочке), эритроциты и мышечные клетки различаются по величине еще какой-то характеристики своей мембраны, влияющей на работу механизма изменения ее неспецифической проницаемости. В статье [2] было показано, что проницаемость мономолекулярных слоев, состоящих из амфифильных молекул, сильно зависит от размеров отдельных участков слоя (блоков), способных независимо друг от друга переходить из состояния двумерного кристалла в состояние двумерной жидкости и обратно. Весьма вероятно, что этой неизвестной характеристикой как раз и является средний размер независимого блока цитоплазматической мембраны. Чтобы это проверить, надо рассчитать зависимость проницаемости мембраны от размеров блока и напряженности имеющегося в ней электрического поля.

Напомним механизм перестройки мембраны, приводящий к изменению ее проницаемости для кислорода (подробнее см. в работах [3] и [4]). Оболочка клетки представляет собой липидный матрикс, в который встроены молекулы белков. Матрикс состоит из двух слоев липидов, в которых гидрофобные углеводородные "хвосты" молекул обращены внутрь матрикса, а гидрофильные дипольные "головки" – наружу. У липидов отрицательный заряд дипольной головки расположен вблизи места ее соединения с углеводородным хвостом, а положительный заряд – на конце, обращенном в сторону водной среды. Если головки ориентированы по нормали к поверхности матрикса, то одноименные заряды на соседних головках находятся ближе друг к другу, чем разноименные, из-за чего головки взаимно отталкиваются. Слой не распадается благодаря

притяжению головок к диполям воды, а также благодаря водородным связям между углеводородными хвостами. При таком положении головок молекулы липидов могут легко перемещаться друг относительно друга под действием теплового движения. (Но, конечно, перемещаться только в двух измерениях, в плоскости слоя). Дальний порядок в их расположении при этом отсутствует и слой подобен жидкости. Мы и будем называть его двумерной жидкостью. В ней все время возникают и исчезают мельчайшие короткоживущие поры, но они столь узки и время их жизни столь мало, что молекулы кислорода почти никогда не могут по ним пройти, слой практически непроницаем для кислорода.

Но возможна и другая ориентация дипольных головок, когда они все настолько сильно наклонены в одну сторону, что положительный заряд на конце каждой головки находится ближе к отрицательному заряду в основании одной из соседних головок, чем к ее положительному заряду. Тогда головки взаимно притягиваются и в слое возникает дальний порядок в расположении молекул липидов, при котором разноименные заряды соседних головок находятся наиболее близко друг к другу. В таком состоянии липидный монослой подобен моноатомному слою в трехмерном кристалле. Мы будем называть его двумерным кристаллом. И то, и другое состояние монослоя отвечает некоторому минимуму его потенциальной энергии. Который из них будет глубже, зависит не только от внутренних свойств системы, но и от внешних обстоятельств. Если при нулевой трансмембранной разности потенциалов (т.е., при нулевом поле в мембране) более глубоким оказывается минимум, отвечающий наклонному положению головок, то оба липидных монослоя будут в состоянии двумерного кристалла. Как и в трехмерном кристалле, положения молекул в соседних монослоях согласованы друг с другом. Поэтому, если один из слоев состоит из отдельных кристаллических блоков, то и другой слой будет состоять из таких же блоков. Эти блоки образуются из-за того, что некоторые из встроенных в мембрану молекул белка служат центрами кристаллизации. Кристаллические блоки, возникшие вокруг соседних центров кристаллизации, ориентированы друг относительно друга случайным образом и ряды молекул в одном из них не могут плавно перейти в ряды в другом. На границе между блоками возникает цепочка краевых дислокаций. Каждая краевая дислокация имеет область разрежения, по которой мелкие молекулы могут свободно диффундировать сквозь матрикс, ибо она пронизывает оба его монослоя. Поэтому, пока оба монослоя находятся в состоянии двумерного кристалла, проницаемость матрикса, а значит, и всей мембраны для кислорода велика.

В работе [2] было показано, что высота потенциального барьера, разделяющего два

состояния независимого блока, а также энергетическое расстояние между минимумами, пропорциональны числу головок в этом блоке. Поэтому, чем больше блок, тем реже переходит он из одного состояния в другое. В молекулярном масштабе времени выпрямление головок в независимых блоках происходит очень редко – один раз за 0.1 – 0.2 с. Столько времени требуется эритроциту, чтобы пройти от одного сужения альвеолярного капилляра до другого. То, что на этом пути идет интенсивная оксигенация, показывает, что в мембране эритроцита много сквозных пор, а значит, почти все независимые блоки находятся в кристаллическом состоянии. По-видимому, к концу пути эритроцита по широкому участку альвеолярного капилляра головки успевают подняться, но дальний порядок в расположении молекул липидов еще не успевает заметно нарушиться. В сужениях капилляра отрицательные заряды сиаловой кислоты в аминокислотных цепочках гликофорина, встроенного в мембрану эритроцита, прижимаются к ней и нейтрализуют находящиеся на ней положительные заряды. Это уменьшает поле в мембране, головки вновь наклоняются и дальний порядок полностью восстанавливается, значит, сохраняется и проницаемость.

В матриксе всегда есть блоки как в кристаллическом, так и в жидком состоянии. В отсутствие поля в мембране, кристаллических блоков в ней гораздо больше, чем жидких, потому что потенциальный минимум для кристаллического состояния глубже, чем для жидкого. Сложнее обстоит дело при наличии электрического поля. В одном монослое блока оно еще сильнее прижимает головки к его поверхности, уменьшая и без того малое число жидких участков, а в другом, напротив, приближает головки к нормали, углубляя минимум, соответствующий жидкому состоянию. Это приводит к увеличению числа жидких участков и, следовательно, к уменьшению проницаемости мембраны. Так как цитопlasма заряжена отрицательно по отношению к внешней среде, то поле в мембране направлено так, что оно прижимает головки к мембране в наружном монослое липидов и стремится выпрямить их во внутреннем монослое. В дальнейшем мы будем говорить только о внутреннем монослое, ибо перестройка происходит именно в нем.

Перейдем теперь к количественным оценкам. Обозначим через  $\kappa n$  величину энергии, выделяющейся при кристаллизации монослоя, содержащего  $n$  молекул липидов. Здесь  $\kappa$  имеет смысл энергии, приходящейся на одну молекулу такого слоя. При включении электрического поля энергия каждой головки в выпрямленном положении уменьшается на  $\gamma V$ , где  $V$  – разность потенциалов, приходящаяся на мембрану, а  $\gamma$  – коэффициент, пропорциональный дипольному моменту головки. В присутствии поля разность энергий головки в выпрямленном и в наклонном положении равна  $\kappa - \gamma V$ . Как видно, при



достаточно большом  $V$  она может изменить знак, т.е., уровень выпрямленной головки может стать ниже уровня наклонной.

Отношение вероятностей встретить головку в наклонном или в выпрямленном положении задается соответствующим больцмановским множителем, но, поскольку, по чисто геометрическим причинам, головки в пределах одного блока могут наклоняться или выпрямляться только все вместе, то в показатель экспоненты входит не просто  $\kappa - \gamma V$ , а величина, в  $n$  раз большая, т.е., разность энергий всей совокупности молекул монослоя этого блока. Поэтому вероятность того, что данный блок монослоя матрикса находится в кристаллическом состоянии, равна

$$p = \frac{\exp[n(\kappa - \gamma V)kT]}{1 + \exp[n(\kappa - \gamma V)/kT]}, \quad (1)$$

где  $k$  – постоянная Больцмана и  $T$  – абсолютная температура.

Вычислим среднюю длину границы между кристаллическими блоками, приходящуюся на единицу площади матрикса. Поскольку сквозные поры находятся именно на этой границе, ее длину можно в первом приближении считать пропорциональной проницаемости. Предположим, что все блоки одинаковы по размерам и имеют квадратную форму со стороной  $l$ . Каждый блок может граничить с 1, 2, 3 или 4 кристаллическими блоками. Длина границы с ними будет соответственно  $l$ ,  $2l$ ,  $3l$  или  $4l$ . Вероятность того, что данный блок граничит только с одним кристаллическим блоком, есть  $w_1 = p(1-p)^3 C_4^1$ , где  $C_4^1$  – число сочетаний из 4 по 1. Вероятность того, что он граничит с двумя такими блоками, равна  $w_2 = p^2(1-p)^2 C_4^2$ , вероятность границы с тремя  $w_3 = p^3(1-p) C_4^3$ , а с четырьмя  $w_4 = p^4$ . Средняя длина границы одного блока с кристаллическими равна:

$$l_{cp} = lw_1 + 2lw_2 + 3lw_3 + 4lw_4 = 4lp[p + (1-p)]^3 = 4lp. \quad (2)$$

С другой стороны, так как вероятность того, что данный блок сам кристаллический, равна  $p$ , то общая длина границ между кристаллическими блоками, приходящаяся на единицу площади матрикса, равна

$$L = \frac{1}{2} l_{cp} p N = 2lp^2 N, \quad (3)$$

где  $N$  – число независимых блоков на единице площади, а множитель  $1/2$  введен потому, что каждая граница учитывается два раза. Количество  $n$  молекул в независимом блоке равно, очевидно,  $l^2 M$ , где  $M$  – число молекул липидов, приходящееся на единицу площади. Выразив  $l$  и  $N$  через  $n$  и  $M$  и подставив в формулу (3), получим:

$$L = 2\sqrt{\frac{M}{n}} p^2 \quad (4)$$

или, если воспользоваться формулой (1) и избавиться от экспоненты в числителе, получим:

$$L = 2\sqrt{\frac{M}{n}} \left( \frac{1}{1 + \exp[-n(\kappa - \gamma V)/kT]} \right)^2. \quad (5)$$

Перейдем к безразмерным переменным:

$$x = \frac{\kappa n}{kT}, \quad E = \frac{\gamma V}{\kappa}. \quad (6)$$

Постоянные  $\kappa$  и  $\gamma$  определяются липидным составом матрикса и, вообще говоря, могут различаться для клеток разных специализаций. Однако вряд ли это различие превышает десяток-другой процентов, ибо молекулы разных липидов построены по одному принципу (углеводородный хвост и дипольная головка, присоединенная к нему одиночной связью). Величина же  $n$ , напротив, может различаться во много раз, ибо она определяется числом приходящихся на единицу площади матрикса молекул белка, причем не всех, а лишь тех, которые могут служить центрами кристаллизации липидного слоя. Их количество, конечно, сильно зависит от специализации клеток.

Так как проницаемость мембраны  $\rho \sim L$ , то

$$\rho \sim \frac{1}{\sqrt{x}} \left( \frac{1}{1 + \exp[x(E - 1)]} \right)^2, \quad (7)$$

где  $E$  пропорционально той части трансмембранной разности потенциалов, которая приходится собственно на мембрану, а  $x$  пропорционально количеству молекул в независимом участке матрикса. При изменении проницаемости  $x$  остается постоянным, но у клеток другой специализации  $x$  может быть другим. В то же время, так как толщина матрикса у всех клеток практически одинакова, то можно считать, что при одной и той же разности потенциалов на мембранах разных клеток поле (т.е. величина  $E$ ) в них будет одинаково. Но, как видно из формулы (7), если числа молекул в независимых блоках у этих молекул, а значит, и величины  $x$ , различаются, то будут различаться и проницаемости мембраны, соответствующие одной и той же напряженности поля в этих мембранах.

Оценим, насколько различаются средние величины независимых блоков липидного матрикса у эритроцитов и мышечных клеток. У мышечных клеток трансмембранная разность потенциалов равна приблизительно 72 мВ (см. [3]). Когда вся она приходится на липидный матрикс, проницаемость мембраны мала и близка к минимальной проницаемости мембраны эритроцита. Адсорбция на мембране комплексов деоксимиоглобина

с онкобелком уменьшает приходящуюся на матрикс разность потенциалов вдвое. При этом проницаемость увеличивается приблизительно в 300 раз. С другой стороны, у деоксигенированных эритроцитов трансмембранная разность потенциалов равна 8 мВ и лишь половина ее приходится на липидный матрикс. У оксигенированных эритроцитов трансмембранная разность потенциалов больше и вся она приходится на матрикс. А проницаемость мембраны у них в  $10^4$  раз меньше, чем у деоксигенированных.

Если принять, что величины  $\kappa$  и  $\gamma$  у эритроцитов и мышечных клеток одинаковы, на основании этих данных можно составить следующую систему уравнений:

$$\rho(x_\varepsilon, E_0) = 10^4 \rho(x_\varepsilon, rE_0), \quad (8)$$

$$\rho(x_m, 9E_0) = 300 \rho(x_m, 18E_0), \quad (9)$$

$$\rho(x_\varepsilon, rE_0) = \rho(x_m, 18E_0), \quad (10)$$

где индексы "э" и "м" указывают, что данная величина относится к эритроциту или к мышечной клетке,  $E_0$  соответствует разности потенциалов на матриксе деоксигенированного эритроцита, т.е. 4 мВ, а  $r$  указывает, во сколько раз больше разность потенциалов на матриксе у эритроцита с наименьшей проницаемостью мембраны. Пока  $r$  неизвестно, но можно думать, что  $3 \leq r \leq 18$ . Решив численно эту систему уравнений, получим значения  $E_0$ ,  $x_\varepsilon$  и  $x_m$  для любой заданной величины  $r$ . По ним можно найти  $n_\varepsilon$ ,  $n_m$  и  $\kappa$ .

Как видно из формул (6), произведение  $Ex_\varepsilon$  не зависит от  $\kappa$ :

$$Ex_\varepsilon = \frac{\gamma V n_\varepsilon}{kT}. \quad (11)$$

Отсюда можно найти  $n_\varepsilon$ , так как  $\gamma$  можно оценить независимо. Из формул (6) следует также, что

$$n_\varepsilon/n_m = x_\varepsilon/x_m, \quad (12)$$

откуда можно найти  $n_m$ . Остается оценить величину  $\gamma$ . Если принять дипольный момент головки равным двум дебаям, а толщину матрикса 70 Å и предположить, что головки могут отклоняться от вертикали на 45°, то получим, что  $\gamma = 2 \cdot 10^{-3}$  мэВ/мВ.

Т а б л и ц а

Характеристики независимо кристаллизующихся участков липидного матрикса эритроцитов и мышечных клеток

$V_э$	$r$	Первое решение системы уравнений (8) – (10)			Второе решение системы уравнений (8) – (10)		
		$n_э$	$n_м$	$\kappa$	$n_э$	$n_м$	$\kappa$
12	3	10000	1050	0.012	13600	1060	0.02
16	4	6400	1050	0.012	8700	1070	0.02
20	5	4600	1050	0.012	6000	1070	0.02
24	6	3600	1060	0.011	4500	1070	0.02
28	7	2900	1060	0.010	3500	1060	0.02
32	8	2400	1050	0.007	2900	1070	0.02
36	9	2100	1050	0.002	2400	1070	0.02
48	12				1700	1070	0.02
72	18				1070	1070	0.02

$n$  – число молекул в независимом участке матрикса;  $\kappa$  – приходящееся на одну молекулу липидного монослоя изменение его энергии (в мэВ) при переходе в кристаллическое состояние;  $V$  – максимальная трансмембранная разность потенциалов. Индексы "э" и "м" означают, что данная величина относится к эритроцитам или к мышечным клеткам, отсутствие индекса – что она считается одинаковой для тех и других клеток. Вычисления велись для  $V_м = 72$  мВ и минимальных разностей потенциалов 4 мВ для эритроцитов и 36 мВ – для мышечных клеток;  $r = V_э/4$  мВ.

Оказалось, что при каждом  $r \neq 18$  этой системе уравнений удовлетворяет по две тройки величин  $E_0$ ,  $x_э$  и  $x_м$ . Физический смысл этой двойственности неясен, но оба решения дают качественно одинаковую зависимость  $E_0$ ,  $x_э$  и  $x_м$  от  $r$ , а именно, чем больше  $r$ , тем ближе к 1 отношение  $x_э/x_м$ , причем всегда  $x_э > x_м$ . Количественно они тоже различаются мало – менее, чем на 30%. Но в зависимости  $\kappa$  от  $r$  наблюдаются и качественные различия: первое решение дает сильное уменьшение  $\kappa$  с ростом  $r$ , второе – практически полное постоянство. Так как есть все основания считать, что  $\kappa$  у мышечных клеток и эритроцитов одинаково, то зависимость  $\kappa$  от  $r$  трудно объяснима.



Поэтому мы отдаем предпочтение второму решению, но в таблице даны результаты обоих решений. Из нее видно, что число молекул липидов в независимом участке мембраны мышечной клетки не зависит от того, в каком интервале изменяется напряжение на мембране эритроцита, что вполне естественно. Видно также, что чем меньше этот интервал, тем больше должно быть среднее число молекул в независимом участке мембраны эритроцита. Это имеет простой физический смысл. Действительно, большинство независимых блоков в мембране перейдет в жидкое состояние лишь если поворот головок в поле изменит энергию каждого блока на величину, значительно превышающую  $kT$ . Но чем меньше максимальная разность потенциалов, тем меньший вклад вносит поворот каждой головки, значит, для того же результата их должно быть больше, т.е., блок должен быть больше (напомним, что поворот головок – эффект коллективный). По всей вероятности, максимальная трансмембранная разность потенциалов у эритроцитов не менее, чем в три раза превосходит минимальную. Как видно из таблицы, в этом случае число молекул в независимом блоке его мембраны менее чем в 5 раз больше числа молекул в независимом блоке мышечной клетки. И этого уже достаточно, чтобы интервал изменения проницаемости мембраны эритроцита был в 30 раз больше!

Очевидно, что не всякая встроенная в мембрану молекула белка может быть центром кристаллизации ее матрикса. Гликофорин, например, вряд ли может им быть, ибо почти целиком находится вне мембраны. Поэтому число встроенных в мембрану молекул белка много больше числа имеющихся в ней независимых блоков. И действительно, у эритроцита в мембрану встроено столько молекул белка, что на каждую приходится менее сотни молекул липидов, а, как видно из таблицы, каждый независимый блок содержит более тысячи молекул липидов.

Итак, у клеток, даже сильно различающихся по величине трансмембранной разности потенциалов, молекулярный механизм изменения проницаемости для кислорода их цитоплазматических мембран может быть одинаковым. Чтобы приспособить его для работы при любой встречающейся в организме трансмембранной разности потенциалов достаточно изменить средние размеры независимо кристаллизующихся участков матрикса мембраны.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Фок М. В., Заричка Г. А. Краткие сообщения по физике ФИАН, N 5, 3 (2001).



- [2] Фок М. В., Краткие сообщения по физике ФИАН, N 6, 15 (2001).
- [3] Фок М. В., Зарицкий А. Р., Зарицкая Г. А.,  
Переведенцева Е. В. Авторегуляция неспецифической проницаемости  
мембраны эритроцита. М., Наука, 1999, 77 стр.
- [4] Фок М. В., Зарицкий А. Р. Авторегуляция, как основа гомеостаза клеток.  
М., Космоинформ, 1997, 103 стр.

Поступила в редакцию 11 апреля 2001 г.