

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР
ВТОРОЙ МОСКОВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ
имени Н. И. ПИРОГОВА

АКТОВАЯ РЕЧЬ

ВЛАДИМИРОВ Юрий Андреевич

РОЛЬ НАРУШЕНИЯ БАРЬЕРНОЙ И МАТРИЧНОЙ
ФУНКЦИЙ ЛИПИДНОГО СЛОЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ
МЕМБРАН В ПАТОЛОГИИ

Москва — 1985

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР
ВТОРОЙ МОСКОВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ
имени Н. И. ПИРОГОВА

АКТОВАЯ РЕЧЬ

Член-корреспондент АМН СССР
лауреат Государственной премии СССР
профессор
ВЛАДИМИРОВ Юрий Андреевич

РОЛЬ НАРУШЕНИЯ БАРЬЕРНОЙ И МАТРИЧНОЙ
ФУНКЦИИ ЛИПИДНОГО СЛОЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ
МЕМБРАН В ПАТОЛОГИИ

Москва — 1985

1. ВВЕДЕНИЕ

Успехи практической медицины всегда были неразрывно связаны с успехами науки и в первую очередь — биологии. Бурно развивалась одна из ведущих областей биологии — биофизика, одним из крупнейших разделов которой бесспорно стала биофизика биологических мембран. В этой области были сделаны крупные успехи. Расшифровка общей схемы строения мембран, выявление важной роли физического состояния липидного слоя для функционирования мембранных белков (ферментных и рецепторных систем), раскрытие роли мембран в регуляции внутриклеточных процессов, генерации биопотенциалов, преобразовании энергии, межклеточных взаимодействиях, — все это создало теоретическую основу для использования достижений мембранологии в медицине.

Важная роль клеточных и внутриклеточных мембран в жизнедеятельности клетки делает понятным, почему повреждение мембран должно приводить к драматическим нарушениям нормальной жизнедеятельности клеток, которые сопровождаются развитием тяжелых патологических состояний на уровне целого организма.

К настоящему времени накопился поистине огромный экспериментальный и клинический материал, показывающий, что повреждение мембран является первым событием в цепи нарушений, вызванных действием того или иного неблагоприятного фактора на организм в целом, на участок ткани или отдельные клетки; и что именно повреждение мембран приводит к развитию патологического процесса. Целью исследований, проводившихся в течение 20 лет на кафедре биофизики и в отделе биофизики 2-го МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова выяснить, каковы же возможные механизмы нарушений самих мембранных структур, как обнаружить эти нарушения, как их можно предотвратить или исправить.

Как известно, все биологические мембраны состоят из липидного слоя и белков: ферментов и рецепторов; последние обычно содержат также некоторое количество специфических углеводов. Инактивация ферментов, разрушение рецепторов сопровождается нарушениями функционирования

энзиматических и регуляторных систем, связанных с данной мембраной.

Нам хотелось бы обратить внимание аудитории на еще один основной элемент мембраны — липидный бислой. В течение последнего десятилетия накопилось множество фактов, говорящих о ключевой роли нарушения свойств именно липидного слоя мембран в развитии тяжелых заболеваний печени, сердечно-сосудистой, нервной системы, функций клеток крови, эпителия и других.

Липидный слой мембран, как известно [1], состоит из двух мономолекулярных пленок фосфолипидов, обращенных друг к другу гидрофобными жирнокислотными «хвостами» и контактирующих с окружающей водной средой полярными, гидрофильными «головками». Мембраны, окружающие цитоплазму, содержат также холестерин и гликолипиды, встроенные в липидный бимолекулярный слой (его часто называют бислоем или даже «двуслоем»), мембраны митохондрий, липосом, эндоплазматического ретикулаума и других внутриклеточных структур холестерина содержат мало [2].

Набор белков (которые определяют выполнение мембранами специализированных функций) различен в мембранах, принадлежащих разным внутриклеточным структурам, разным организмам. Напротив, липидный бислой — неизменный структурный и функциональный элемент любой мембраны.

Во всех клеточных и внутриклеточных мембранах липидный бислой выполняет две главные функции: барьерную и структурную или матричную. Тонкая (2,5 нм) гидрофобная пленка липидного бислоя является непреодолимым барьером для ионов и водорастворимых молекул, благодаря чему мембраны могут выполнять функцию регуляторов, более того организаторов, внутриклеточных процессов. С другой стороны, на этой жидкой пленке размещены основные ферментные системы клетки. Нарушение барьерных свойств (т. е. резкое увеличение проницаемости) мембран равно как и нарушение вязкости и свойств поверхности липидной пленки (т. е. матричных свойств бислоя) приводит к нарушениям работы мембранных структур, дезорганизации жизнедеятельности клетки, заболеваниям организма.

2. НЕКОТОРЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ БАРЬЕРНЫХ СВОЙСТВ МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАН

Большой вклад в изучение проницаемости липидного бислоя мембран внесло изучение модельных липидных мембран: так называемых плоских бислойных липидных мембран (БЛМ) и фосфолипидных везикул-липосом. Поскольку

в дальнейшем нам придется не раз обращаться к данным, полученным на БЛМ, необходимо остановиться на некоторых вопросах метода измерения ионной проницаемости у этих мембран.

БЛМ как модель биологических мембран была предложена П. Мюллером и сотрудниками в 1962 г. [1]. Приготовление БЛМ претерпело незначительные изменения за прошедшее время. Капля фосфолипидов, растворенных в гептане, гексане или декане, с помощью тонкой пипетки помещают в отверстие, просверленное в стенке тефлонового стаканчика, погруженного в раствор электролита. Постепенно растворитель выходит по стенкам тефлонового сосудика из внутренней части капли, и два монослоя фосфолипидов на границе раздела гептан/вода смыкаются, образуя липидный бислой. Этот бислой невидим, т. к. толщина его меньше длины волны видимого света, но о его существовании можно судить по высокому электрическому сопротивлению в цепи между двумя электродами, помещенными один — внутри другой — снаружи тефлонового стаканчика. Поскольку электропроводность несоизмеримо выше электропроводности липидного бислоя, сопротивление цепи между электродами практически полностью определяется сопротивлением БЛМ. Чем выше ионная проницаемость мембраны, тем меньше ее электрическое сопротивление.

Изучение барьерных свойств БЛМ по отношению к ионам проводят чаще всего в одном из трех режимов:

1. Измеряют электрический ток i через мембрану, к которой приложено определенное напряжение U . Зависимость i от U называется вольт-амперной характеристикой. Обычно при сравнительно невысокой разности потенциалов вольт-амперная характеристика немодифицированной БЛМ линейна: это значит, что электропроводность мембраны (т. е. тангенс угла наклона вольт-амперной характеристики $i=f(U)$) постоянна. Но при некоторой разности потенциалов на мембране, которую в этой статье мы будем называть «критической» и обозначать φ^* , происходит резкое возрастание тока через мембрану, что может привести к ее механическому разрыву. Резкое, нарастающее во времени увеличение тока через мембрану при разности потенциалов, превышающих критическую величину называют электрическим пробоем мембраны, а саму величину можно назвать «потенциалом пробоя» [4]. К этому явлению мы еще вернемся несколько позже.

2. Измеряют разность потенциалов по двум сторонам мембраны, к которой извне никакого потенциала в этом случае не прикладывают. Разность потенциалов между водными растворами по две стороны мембраны (которую называют также мембранным потенциалом φ_m) возникает, если

концентрация ионов по сторонам мембраны неодинакова и одни ионы лучше проходят через мембрану, чем другие. Если, например, слева от мембраны поместить раствор КСI с концентрацией c_1 , а справа — с концентрацией c_2 , а затем добавить к одному из растворов антибиотик валиномицин, который обладает способностью селективно переносить ион калия через гидрофобные мембраны, то на мембране возникнет диффузионный калиевый потенциал, величина которого определяется уравнением Нернста:

$$\varphi_M = 60 \ln \frac{c_1}{c_2}, \text{ мВ}$$

Мембранный потенциал будет иметь знак «плюс» с той стороны мембраны, где концентрация K^+ ниже и куда по этой причине будут диффундировать проникающие катионы (т. е. в данном случае комплекс калия с валиномицином).

Аналогичным образом можно создать диффузионный протонный потенциал на БЛМ (как и на биологических мембранах), если создать неодинаковую концентрацию протонов (т. е. разный рН) по сторонам мембраны и добавить к одному из водных растворов переносчик протонов; к таким «протонофорам» относится, например, п-трихлорметоксикарбонилцианидфенилгидразон (ХКФ). Следует подчеркнуть, что потенциал на мембране, описываемый уравнением Нернста, возникает только, если проницаемость для ионов одного знака (например, для катионов) намного превышает проницаемость для ионов другого знака (т. е. в нашем случае — для анионов). При отсутствии селективности, мембранный потенциал будет ниже Нернстового или даже близок к нулю, какую бы мы разность концентраций электролита по сторонам мембраны не создавали.

Изучение кривых зависимости: мембранный потенциал-логарифм отношения концентраций электролитов по сторонам мембраны, — для БЛМ, подвергнутой УФ-облучению, показало, что ни в растворах холин-хлорида, ни в NaCl, ни в KCl точки не ложатся на теоретическую прямую, предсказанную уравнением Нернста, а лежат ниже ее. Таким образом УФ-облучение не способно придать мембране селективную проницаемость ни для ионов холина⁺, ни для ионов Cl⁻, Na⁺ или K⁺. В то же время при разности рН по сторонам мембраны, на ней генерируется потенциал, равный теоретическому протонному диффузионному потенциалу. Таким образом, УФ-облучение делает мембрану проницаемой для протонов, но не для ионов Cl⁻, K⁺, Na⁺, холина⁺.

3. Измеряют флуктуации тока («шумы»), идущего через мембрану, при фиксированном мембранном потенциале.

Несмотря на сложность электронной аппаратуры, применяемой в таких исследованиях, они получили в последнее время значительное развитие благодаря тому, что с помощью этой техники удалось обнаружить и изучить одиночные каналы, возникающие в некоторых случаях в липидном бислое. Каналы формируют в мембранах молекулы некоторых липид-растворимых антибиотиков, например, грамицидина А, амфотерицина В, аламетицина и других [3]. Появление каждого канала сопровождается ступенчатым возрастанием тока через мембрану (а его исчезновение — ступенчатым падением тока). Метод позволяет измерять вольт-амперные характеристики одиночных каналов, время их существования, влияние мембранного потенциала на вероятность их появления и исчезновения и т. д.

Теперь остановимся на определении того, что же можно назвать нарушением барьерной функции мембраны. Очевидно, что это — резкое возрастание проницаемости липидного бислоя. В случае БЛМ — это резкое возрастание тока при данном мембранном потенциале. Мы видели, что существует по меньшей мере три причины такого резкого возрастания тока через БЛМ:

а) Появление ионофора, т. е. химического соединения, молекулы которого способны транспортировать ион через гидрофобный слой мембраны.

б) Формирование канала в липидном бислое. Непросто выяснить, является ли данное соединение, увеличивающее ионную проницаемость мембраны ионофором, т. е. подвижным переносчиком иона через мембрану, или каналоформером. Но для наших целей это пока не очень важно. Будет ли вещество переносить ионы за счет диффузии комплекса ионофора и иона через липидный слой или же за счет формирования водного канала (поры) через этот слой — в обоих случаях именно определенное химическое соединение является индуктором ионного транспорта. Эффект зависит от его концентрации и химической природы.

в) Электрический пробой мембраны. Непосредственно действующим началом является не химическое соединение, а мембранный потенциал, хотя величина критического мембранного потенциала φ^* , как мы увидим ниже, может в широком диапазоне изменяться при химической модификации липидного слоя мембран.

Липосомы

В качестве модели для изучения проницаемости липидного слоя мембран могут служить также липосомы, т. е. фосфолипидные везикулы [5]. Они получают одним из трех способов. Первый заключается в набухании сухой плен-

ки фосфолипидов в водно-солевой среде. Получаются многослойные (точнее много-бислойные) липосомы. Обработка суспензии ультразвуком приводит к образованию более мелких и однородных по размеру однослойных липосом; их диаметр составляет обычно 300—500Å (30—50 нм), т. е. всего в 10—20 раз превышает толщину мембраны. Однослойные липосомы можно получить также, впрыскивая раствор фосфолипида в спирте в водную среду. В последнее время получило распространение приготовление липосом из водных растворов фосфолипидов, солюбилизированных детергентами, например, солями желчных кислот. По ряду причин для изучения барьерных свойств липидного слоя используют практически только многослойные липосомы. Для того, чтобы их суспензия была более однородной и мелкодисперсной, можно использовать многократное ее замораживание жидким азотом и оттаивание. Метод изучения проницаемости заключается в том, что липосомы готовят в среде, содержащей интересующие нас соединения, например, изотопно-меченную глюкозу, раствор определенной соли и т. д., а затем суспензию либо подвергают диализу, либо, что гораздо быстрее, подвергают гель-фильтрации, т. е. пропускают через колонку с сефадексом, в порах которого остаются все низкомолекулярные вещества и ионы. По скорости выхода вещества и ионов из липосом судят о проницаемости их мембран. Для измерения концентрации выходящих ионов можно использовать ион-селективные электроды, измерение выхода изотопно-меченных соединений осуществляют на радиометрах после удаления липосом центрифугированием или ультра-фильтрацией.

Главная опасность, которая подстерегает исследователя, использующего замкнутые везикулярные системы с целью выяснения ионной проницаемости мембран, заключается в явлении сопряжения ионных потоков за счет того, что движение одного из ионов или одного сорта молекул может создать разность потенциалов ($\Delta\phi$) или разность рН (ΔpH) по сторонам мембраны. Созданный потенциал или ΔpH оказывает влияние на движение ионов или молекул, диффузия которых породила $\Delta\phi$ или ΔpH . Вызывая перенос еще одного из ионов (скажем K^+ добавлением валиномицина или протона — КХФ), можно избежать этого осложнения. С другой стороны, сопряжение ионных потоков позволяет судить о барьерной функции мембран липосом по их осмотическому поведению в гипертонических растворах; при этом используется простейший метод — измерение мутности суспензии. Пример исследований такого рода будет рассмотрен в разделе 10 данного обзора.

3. ЭРИТРОЦИТЫ И МИТОХОНДРИИ КАК ОБЪЕКТЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НАРУШЕНИЯ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ МЕМБРАН

Какими бы ни были причины, вызвавшие развитие того или иного патологического процесса, ни клетки, ни клеточные мембраны ничего о них не знают; их структура и функция нарушаются под влиянием изменений, происшедших в их непосредственном окружении. Избыток или недостаток растворенного кислорода, изменение концентрации ионов кальция, двухвалентного железа или тиоловых соединений, появление водорастворимых свободных радикалов или токсических веществ — вот некоторые из факторов, непосредственно влияющих на мембранные структуры клеток и вызывающие нарушение их барьерных свойств. Знание причин, вызывающих повреждение мембран в клетке, позволяет осуществлять моделирование патологического процесса, а точнее некоторых (подчас — решающих) его стадий, используя определенные мембранные системы. Липосомы, везикулы мембран саркоплазматического ретикулума или эндоплазматического ретикулума печени, митохондрии, пероксисомы, эритроциты, синаптосомы, фрагменты зрительных клеток, изолированные клетки в культуре тканей — вот неполный перечень объектов, используемых в таких исследованиях.

В качестве примера рассмотрим, как можно исследовать нарушение барьерных свойств мембран простейших клеток — эритроцитов и важнейших органелл — митохондрий.

Мембраны эритроцитов проницаемы для ионов хлора; кроме того, в мембране имеется белковый канал для анионов, благодаря чему имеет место эквивалентный обмен ионов Cl^- — OH^- между водными фазами по сторонам мембраны. Пара событий: диффузия Cl^- , а затем Cl^- — OH^- обмен, — эквивалента переносу через мембрану ионов гидроксила. В водной среде это по своим последствиям то же самое, что перенос протона. Итак, мембрана эритроцитов не является барьером ни для ионов Cl^- , ни для ионов H^+ (или OH^-). Но она является барьером для ионов K^+ и Na^+ . Возрастание проницаемости мембраны именно для этих ионов и служит общепринятым критерием нарушения барьерных свойств эритроцитарной мембраны [6].

Обнаружить увеличение катионной проницаемости эритроцитарных мембран проще всего одним из трех способов. Во-первых, из эритроцитов начинается выход ионов K^+ , что может быть зарегистрировано с помощью K^+ -селективного электрода. Во-вторых, начинается выравнивание концентраций ионов (или низко-молекулярных веществ, например, сахарозы, в которую помещены клетки) внутри и вне клет-

ки, вследствие чего в эритроците создается избыточное осмотическое давление из-за высокой концентрации гемоглобина (т. е. онкотическое давление), под влиянием которого начинается набухание клеток. Это так называемое коллоидно-осмотическое набухание может быть зарегистрировано по изменению мутности суспензии, т. е. изменению ее светопропускания в области длин волн более 600 нм, где гемоглобин уже не поглощает света. Начавшееся набухание заканчивается механическим разрывом мембран эритроцитов и выходом гемоглобина, т. е. гемолизом, который можно назвать в данном случае коллоидно-осмотическим. Анализ степени гемолиза обычно основан на определении количества гемоглобина, вышедшего из клеток.

Таким образом, выход гемоглобина может быть не самостоятельным событием, а результатом нарушения барьерной функции мембран клеток для катионов.

Рассмотрим некоторые методы определения нарушения барьерной функции мембран митохондрий. Интактные митохондрии проницаемы для ионов кальция и стронция, а также для фосфорной, угольной и уксусной кислот, но непроницаемы для большинства других молекул и таких ионов как K^+ , Na^+ , H^+ или OH^- . Непосредственно движение ионов через мембрану митохондрий можно регистрировать с помощью ион-чувствительных электродов; наиболее часто употребляются K^+ — электроды (т. е. обычные рН-метры), K^+ -, Na^+ - и Ca^{2+} -чувствительные электроды.

Движение ионов или проникающих кислот через мембрану митохондрий зависит не только непосредственно от разности концентраций этих веществ, но также и от мембранного потенциала (ϕ_m) и разности рН на мембране [7]. Катионы будут двигаться преимущественно в направлении отрицательно заряженной стороны мембраны, а кислоты — в сторону с более высоким рН. При работе дыхательной цепи митохондрий или гидролизе имеющейся в растворе АТФ происходит «энергизация» мембран, заключающаяся в выбросе протонов из матрикса и создании по сторонам мембраны вполне определенной разности электрохимических потенциалов ионов водорода, обычно обозначаемой $\Delta\mu_H$. Эта величина представляет собой сумму электрической энергии, затраченной на перенос протона против сил электрического поля, и осмотической энергии, затраченной на перенос H^+ в область, где его концентрация выше (т. е. рН ниже). Если разность потенциалов между матриксом и немитохондриальной средой равна $\Delta\phi$, а разность рН равна ΔpH , то

$$\Delta\mu_H = F\Delta\phi - 2,3 RT\Delta pH$$

или при 37° С:

$$\Delta\mu_{\text{H}} \text{ (Дж/моль)} \approx 100 \Delta\varphi \text{ (мВ)} - 600 \Delta \text{pH}$$

где F — число Фарадея, R — газовая постоянная, а T — абсолютная температура. Отбросив постоянные величины, можно несколько фигурально сказать, что разность электрохимических потенциалов на мембранных энергизованных митохондриях состоит из $\Delta\varphi$ и ΔpH .

Мембранный потенциал $\Delta\varphi$ в энергизованных митохондриях является движущей силой электрофоретического переноса катионов в матрикс, если для этих катионов (как например для Ca^{2+}) проницаема внутренняя митохондриальная мембрана; pH является движущей силой для проникающих кислот, которые входят в матрикс энергизованных митохондрий. В отсутствие тех или других установившаяся разность концентраций ионов водорода препятствует дальнейшему переносу электрона по дыхательной цепи митохондрий, т. е. торможению дыхания, несмотря на наличие кислорода и субстратов окисления в среде. Такое состояние органелл было названо состоянием дыхательного контроля (состояние 4 по Б. Чансу). При наличии в среде АДФ и ортофосфата $\Delta\mu_{\text{H}}$ расходуется на синтез АТФ и дыхание ускоряется; митохондрии переходят в фосфорилирующее состояние. Отношение скорости дыхания V (т. е. потребления кислорода) в состоянии 3 и 4 называют коэффициентом дыхательного контроля (КДК).

$$\text{Итак: КДК} = V_3/V_4.$$

Величина КДК является показателем интактности митохондриальных мембран. Нарушение дыхательной цепи митохондрий, равно как нарушение систем транспорта фосфата и АДФ через мембраны приводит к снижению V_3 . Увеличение проницаемости мембран для протонов приводит к снижению $\Delta\mu_{\text{H}}$ и росту V_3 . И то и другое приводит к снижению КДК. Простота метода полярографического измерения дыхания митохондрий привела к тому, что оценка КДК (а лучше сказать — отдельная оценка изменений V_3 и V_4) стала одним из распространенных критериев интактности митохондрий, в частности, сохранения внутренней мембраной ее барьерных свойств.

Второй удобный метод основан на регистрации осмотического поведения митохондрий. Внутренняя митохондриальная мембрана проницаема для воды, и в растворе непроницающих солей и соединений эти частицы ведут себя как хорошие осмометры, сжимаясь в гипертонических и набухая в гипотонических растворах; за этими процессами очень удобно следить, измеряя мутность суспензии: набухание митохондрий приводит к просветлению суспензии, их сжатие сопровождается увеличением мутности. При инкубации митохондрий в изотоническом растворе KCl , содержащем фос-

фатный буфер, их объем может довольно долго оставаться постоянным; набухание может рассматриваться как верный признак нарушения барьерной функции мембран по отношению к ионам (K^+ или K^+ и Cl^-). В присутствии кислорода, субстратов дыхания и фосфата возрастание проницаемости мембран для одних только ионов K^+ достаточно для набухания митохондрий. Последовательность событий при этом такова: в результате работы дыхательной цепи протоны выходят из матрикса наружу, фосфат в электронейтральной форме входит внутрь, нейтрализуя ΔpH , калий электрофоретически входит внутрь, нейтрализуя $\Delta\phi$. В итоге, если подвести баланс, получается, что внутрь вошел фосфат калия. Это приводит к возрастанию осмотического давления в матриксе, входу туда воды и набуханию органелл. Итак, активное (т. е. зависящее от энергизации) митохондрий в KCl -среде служит указанием на то, что мембраны митохондрий стали плохим барьером для ионов калия. Существует несколько вариантов использования явления набухания митохондрий для изучения их проницаемости по отношению к другим ионам, но на этом мы не имеем возможности останавливаться.

Митохондрии, как и эритроциты и иные мембранные системы, могут использоваться в двух вариантах: нарушение их функции в условиях целого организма изучается на суспензиях органелл, выделенных из этого (здорового или больного) организма. С другой стороны, изолированные из здорового животного органеллы могут использоваться в условиях эксперимента, моделирующего патологический процесс, например, подвергаться действию аноксии, ионов кальция, перекисного окисления, облучения и т. д.

4. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ КАК ИНДУКТОР ИОННОГО ТРАНСПОРТА ЧЕРЕЗ ЛИПИДНЫЙ БИСЛОЙ

Довольно давно известно, что окисление ненасыщенных жирно-кислотных цепей, входящих в состав мембранных фосфолипидов, молекулярным кислородом (т. е. перекисное окисление липидов) приводит к увеличению проницаемости мембран. В случае митохондрий это сопровождается набуханием частиц и разобщением окислительного фосфорилирования, в случае эритроцитов — это приводит к гемолизу. Индукция перекисного окисления БЛМ УФ-облучением или добавлением к водному раствору, омывающему мембрану, водорастворимых продуктов перекисного окисления фосфолипидов приводит к увеличению ионной проницаемости мембраны. Тот же эффект будет получен, если вводить в гепта-

новый раствор фосфолипида, из которого готовят БЛМ, окисленную ненасыщенную жирную кислоту, содержащую продукты перекисного окисления. Было показано, что сама по себе линолевая кислота была индуктором ионного транспорта БЛМ, т. к. снижала электрическое сопротивление мембраны примерно на один порядок величины (отсечка на оси ординат). В то же время накопление продуктов перекисного окисления в этой кислоте (МДА), приводило к дальнейшему падению сопротивления еще почти на два порядка величины.

Возникает вопрос, для каких именно ионов увеличивается проницаемость липидного бислоя при наличии в системе продуктов перекисного окисления липидов. Измерение потенциалов дает однозначный ответ на этот вопрос: перекисное окисление индуцирует протонную проводимость в липидном слое мембраны. Правда надо оговориться, что данные наших опытов не позволяют сказать, увеличивается ли проницаемость мембран для ионов H^+ или OH^- , т. к. результат получится одинаковым. Действительно, если протонов больше справа от мембраны, то гидроксильных ионов больше слева. Диффузия протонов слева направо приведет к появлению мембранного потенциала со знаком «+» справа. К тому же результату приведет диффузия OH^- -ионов справа налево. Разница в том, что при протонной проводимости мембрана будет обладать большей электропроводностью в кислой среде, а при гидроксильной — в щелочной. Однако этот критерий неоднозначен, т. к. сам переносчик может оказаться неодинаково эффективным при различных рН. Поэтому будем говорить о протонной проводимости (проницаемости) мембран, имея в виду, что это может быть и гидроксильная проводимость. Нетрудно понять, что в водных растворах биологические последствия будут идентичными при рассмотренных двух механизмах.

Изучение выхода ионов из фосфолипидных везикул — липосом также может служить методом обнаружения действия перекисного окисления на ионную проницаемость липидного слоя мембран. В 1977 г. в нашей лаборатории с использованием ион-чувствительных электродов было показано, что при перекисном окислении увеличивается протонная и, возможно, калиевая проницаемость мембран [8]. Но еще раньше, в 1975 г. мы обнаружили, что проницаемость липидного бислоя для ионов кальция также увеличивается в липосомах при перекисном окислении [9]. Позднее и, по-видимому, независимо А. В. Лебедев и сотрудники обнаружили, что при перекисном окислении липидов происходит увеличение кальциевой проницаемости БЛМ, что как выяснилось, обусловлено образованием в липидном слое каналов, проницаемых для ионов, формирование которых происходит при на-

личии в среде продуктов перекисного окисления липидов и ионов кальция [10].

Липидный бислой, образующий в БЛМ и липосомах самую мембрану, в мембранах клеточных и внутриклеточных дополняется белками и углеводами, гликолипидами и гликопротеидами. Однако барьером повсюду служит именно гидрофобная зона липидного слоя, нарушение которого приводит к потере барьерных свойств мембраны в целом. Поэтому вряд ли следует удивляться тому, что данные, полученные на биологических мембранах, во многом оказались лишь подтверждением того, что было получено на БЛМ и липосомах. Так, опыты с митохондриями показали, что и у этого объекта перекисное окисление приводит к росту протонной проницаемости мембран [11], и, как следствие — к разобщению окислительного фосфорилирования [12]. Перекисное окисление липидов мембран саркоплазматического ретикула приводило к выходу кальция из везикул и снижению эффективности работы кальциевой помпы [12].

Биологические последствия роста ионной проницаемости клеточных и внутриклеточных мембран для ионов водорода и кальция поистине драматичны. Трансформация энергии в митохондриях, сопровождающаяся окислительным фосфорилированием и созданием внутримитохондриальных депо ионов кальция, основана на непроницаемости внутренней мембраны митохондрий для ионов H^+ и OH^- [14]. Появление протонной проницаемости у мембран приводит к энергетическому голоду клетки и во всех отношениях эквивалентно нехватке кислорода. Хуже того — оно сопровождается бесполезной тратой субстратов дыхания и кислорода, которых, возможно, не хватает в это же самое время соседним, еще неповрежденным клеткам.

Не менее болезненно появление проницаемости для ионов кальция у таких мембран, как скажем, цитоплазматическая мембрана или мембрана саркоплазматического ретикула клеток поперечно-полосатой мускулатуры. Повышение проницаемости этих мембран сводит на нет работу кальциевых насосов и приводит к повышению концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме со всеми последствиями: активизация всех кальций-зависимых регуляторных процессов (а имя им — легион), контрактура сократительных элементов, активация мембранных фосфолипаз и разрушение мембран и т. д.

5. РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Активация перекисного окисления липидов в мембранах — явление довольно распространенное. Токсическое дей-

ствие широкого класса ксенобиотиков основано на разрушении клеток печени в результате активации перекисного окисления [15]; раньше всего это было показано на примере действия четыреххлористого углерода [16]. Действие ионизирующей радиации на организм сопровождается резким усилением свободнорадикального перекисного окисления во всех тканях человека и животных (там же). Д. И. Рощупкиным и сотрудниками в нашей лаборатории было показано образование продуктов перекисного окисления липидов при УФ-облучении изолированных клеток и кожи человека и животных [17]. Ишемия органов сопровождается увеличением перекисного окисления [18], равно как стресс приводит к накоплению продуктов перекисного окисления в миокарде и других органах [19], а также в крови человека и животных [20]. Сравнительно недавно Г. Н. Крыжановским и сотрудниками было показано, что резкая активация перекисного окисления происходит в очаге возбуждения при эпилепсии [21]. Активация перекисного окисления происходит в тканях больных раком людей и животных на терминальных стадиях заболевания [22]. Имеются данные о важности перекисного окисления при канцерогенезе [23]. С активацией перекисного окисления липидов связаны некоторые поражения сетчатки [24]. Перечисление таких примеров можно было бы продолжить. Очевидно, что всякое усиление перекисного окисления должно приводить к увеличению ионной проницаемости мембран со всеми вытекающими последствиями. Однако это еще не означает, что первопричиной развития данного патологического состояния была именно активация процесса перекисного окисления липидов. Вероятно, что последнее произошло вследствие развития патологического состояния, на одной из его стадий. Стандартная схема опытов по выяснению роли перекисного окисления в развитии того или иного патологического процесса имеет обычно целью получить ответ на следующие вопросы:

1. Происходит ли в ходе развития данного патологического состояния активация перекисного окисления?

2. Имеется ли корреляция между степенью активации перекисного окисления и тяжестью состояния больного животного или человека?

3. Приводит ли применение антиоксидантов наряду со снижением перекисного окисления в тканях также и к улучшению состояния больного или хотя бы к временному ослаблению патологического процесса?

В качестве сравнительно недавнего примера такого типа исследования приведем работу Г. Н. Крыжановского и сотрудников по выяснению возможной роли перекисного окисления в развитии эпилепсии [21]. Экспериментальной моделью служили кролики, на кору головного мозга которых

наносили в области сенсомоторной зоны пеницилин, что приводило к возникновению очага гиперактивности в коре мозга и судорожным пароксизмам животных. Оказалось, что уровень продуктов перекисного окисления липидов во фракции синапсом, выделенных из очага гиперактивности, в 2—3 раза превышал аналогичную величину в норме. Предварительное введение животным антиоксиданта α -токоферола подавляло накопление продуктов перекисного окисления (типа малонового диальдегида — МДА), и, что самое замечательное — снимало судороженные пароксизмы у животных, которым по-прежнему апплицировали раствор пеницилина.

Во многом сходной была линия доказательств роли перекисного окисления в повреждении сердечной мышцы при стрессе. Известно, что избыточное количество катехоламинов в крови может привести к повреждению миокарда, что в частности, можно наблюдать в эксперименте на животных. В работе Ф. З. Мейерсона и сотрудников было показано, что стресс приводит к резкой активации перекисного окисления в сердечной мышце и что антиоксиданты (например, ионол) не только снимали накопление продуктов перекисного окисления, но и предохраняли сердечную мышцу от стрессорного повреждения.

При ультрафиолетовом облучении кожи, как известно, развивается эритема. Одновременно в липидной фракции, выделенной из УФ-облученной кожи лабораторных животных, увеличивается количество продуктов перекисного окисления липидов. Нанесение на кожу антиоксиданта α -токоферола перед УФ-облучением и даже сразу после облучения заметно снижало эритемную реакцию.

В обзоре Г. Я. Дубура и А. Х. Велены [25] дан следующий перечень патологических состояний, для которых характерен синдром пероксидации, т. е. показана важная роль процессов перекисного окисления липидов и этиологии и патогенезе заболевания (там же имеется библиография).

1. Лучевое поражение, УФ-эритема.
2. Злокачественный рост, канцерогенез.
3. Токсикозы.
4. Гипер- и гипоксия, ишемия.
5. Атеросклероз, старение.
6. Гипер- и гипотермия, ожоговая болезнь.
7. Гиподинамия (гипокинезия), иммобилизация.
8. Стресс.
9. Е-авитаминоз.

10. Тромбозы, гемокоагуляция.
11. Травмы.
12. Острые и хронические заболевания печени, в том числе вирусные.

13. Другие воспалительные процессы различной локализации и этиологии.

14. Патологии беременности.

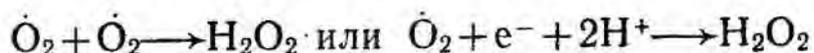
15. Отрицательное влияние магнитных и других полей и т. д.

Этот впечатляющий список постоянно пополняется, но не следует делать вывод о разнообразии действия продуктов перекисного окисления, которые «вызывают все болезни». Скорее наоборот: основных механизмов немного, но возникают они по разным причинам и клеточная, тканевая и органная локализация их различна, отсюда различны и последствия.

6. ОБЩАЯ СХЕМА ПРОЦЕССА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ И ЕГО РЕГУЛЯЦИИ

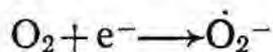
Провести непрерывную логическую линию, соединяющую активацию перекисного окисления на уровне организма или хотя бы отдельной ткани с нарушением барьерной функции липидного бислоя внутриклеточных мембран, в настоящее время трудно, т. к. многие промежуточные звенья в этой цепи причин и следствий пока еще не раскрыты. Несомненно однако, что узловым вопросом в этой отрасли мембранологии и патологии клетки — этот вопрос о механизмах регуляции процесса перекисного окисления в мембранах и организме в целом, поскольку с поломки этого механизма скорее всего и начинается каскад событий, завершающихся катастрофой. Прежде чем формулировать гипотезы рассмотрим некоторые твердо установленные факты.

Перекисное окисление органических соединений и, в частности, липидов биологических мембран — цепной, свободнорадикальный процесс [16]. Он начинается с появления в системе свободных радикалов — инициаторов цепной реакции. В биологических системах наиболее вероятным радикалом, выполняющим эту роль, скорее всего является гидроксильный радикал $\text{OH}\cdot$, образующийся при разложении перекиси водорода H_2O_2 , которая в свою очередь появляется в качестве одного продукта восстановления или диспропорционирования супероксидного радикала:



Супероксидный радикал, перекись водорода, а следовательно и гидроксильный радикал образуются при одноэлектронном восстановлении молекулярного кислорода некото-

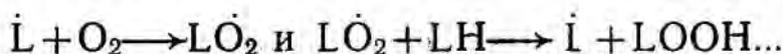
рыми ферментами, в частности, НАДФН-оксидазой микросом:



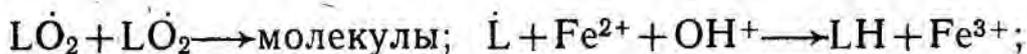
Цитотоксический эффект гидроксильного радикала во многом обусловлен тем, что он способен инициировать цепное окисление липидов, отнимая водород от молекулы полиненасыщенной жирной кислоты (LH) с образованием свободного радикала липида ($\dot{\text{L}}$):



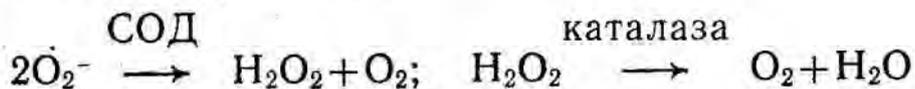
Вслед за этой реакцией инициирования развивается цепное окисление, обусловленное чередованием двух реакций продолжения цепи:



Взаимодействие свободных радикалов, ведущих цепь окисления друг с другом, ионом металла переменной валентности или с молекулой антиоксиданта (InH) приводит к исчезновению активного липидного радикала и обрыву цепи:



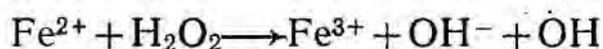
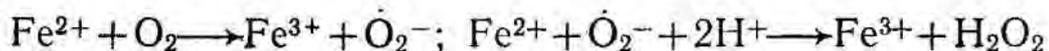
Чем больше в системе антиоксидантов, тем чаще происходят обрывы цепей, тем короче цепи и тем ниже скорость перекисного окисления при одной и той же скорости инициирования. В свою очередь, скорость инициирования зависит не только от активности систем, генерирующих супероксидный радикал, но и ограничивается совместным действием ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, действие которых сводится к разрушению супероксидных радикалов без образования гидроксильных:



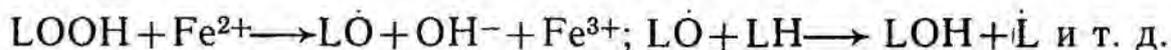
Эти ферменты, как и липидные антиоксиданты, *ограничивают* скорость перекисного окисления в клетках.

Главным *ингибитором* перекисного окисления в биологических мембранах, несомненно, служат ионы двухвалентного железа. В условиях эксперимента они могут выполнять несколько функций. При реакции с молекулярным кислородом (в присутствии, например, солей орто- или пирофосфорной кислот) они продуцируют супероксидные радикалы, мо-

лекулы перекиси водорода и OH-радикалы:

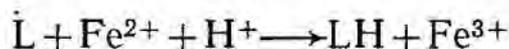


Взаимодействие ионов Fe^{2+} с гидроперекисями липидов LOOH сопровождается появлением новых свободных радикалов, которые дают начало новым цепям окисления:



Эта реакция приводит, таким образом, к разветвлению цепей окисления липидов.

Наконец, ионы железа способны вступать в реакцию со свободными радикалами, т. е. обладают свойствами антиоксиданта:



Особенности кинетики перекисного окисления таковы, что в итоге ионы железа выполняют триггерную функцию: в концентрациях ниже 60 мкМ они активируют перекисное окисление, а при более высоких концентрациях — ингибируют его [16, 20]. В условиях живой клетки концентрация свободных ионов Fe^{2+} , хотя и приближается к критической величине 60 мкМ, все же обычно ниже этого значения. Поэтому можно читать, что ионы железа выполняют функцию прооксиданта.

В существующей биохимической литературе большую роль придают реакциям иницирования цепей, т. е. реакциям, связанным с генерацией супероксидных радикалов, тогда как значение реакции разветвления цепей обычно недооценивается. Отчасти это связано с открытием супероксиддисмутаза, широкое применение которых в биологической практике позволяет выявить роль супероксидного радикала в том или ином процессе. В то же время методы изучения состояния свободного железа в клетке разработаны слабо. Между тем модельные опыты с мембранными структурами: митохондриями и микросомами, — однозначно говорят в пользу того, что реакция разветвления цепей играет решающую роль в определении скорости реакций липидной перекисидации, гораздо большую, чем даже роль иницирования цепных процессов и сопоставимую разве что со столь же определяющей, но противоположной по направленности ролью липидных антиоксидантов.

Живая природа «поняла» это гораздо раньше экспериментаторов, создав специальную клеточную систему защиты от реакций перекисного окисления, основанную на предотвращении пагубных последствий разветвленных цепных ре-

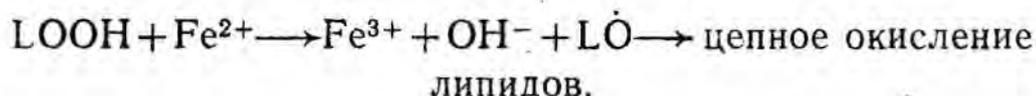
акций. Речь идет о системе глутатион-глутатионпероксидаза. Фермент глутатионпероксидаза, широко распространенный в живых клетках [27], катализирует реакцию:



где LOOH — гидроперекись ненасыщенной жирной кислоты, а LOH — спирт.

Биологический смысл этой реакции становится понятным только в свете важной роли реакций разветвления цепей:

Если бы процесс перекисного окисления липидов в клетках всегда протекал как *неразветвленная* реакция, то гидроперекиси были бы *конечным* продуктом процесса липидной перекисидации, и их концентрация не имела бы никакого значения для скорости перекисного окисления. На самом же деле скорость перекисидации липидов в условиях биологических мембранных структур определяется реакцией разветвления цепей, а следовательно концентрацией гидроперекисей липидов, которые выступают таким образом в роли промежуточного продукта. Уровень тиолов в клетке и активность глутатионпероксидазы определяют скорость процесса, конкурирующего с реакцией разветвления цепей, и именно по этой причине ограничивают скорость процесса перекисного окисления в клетках.

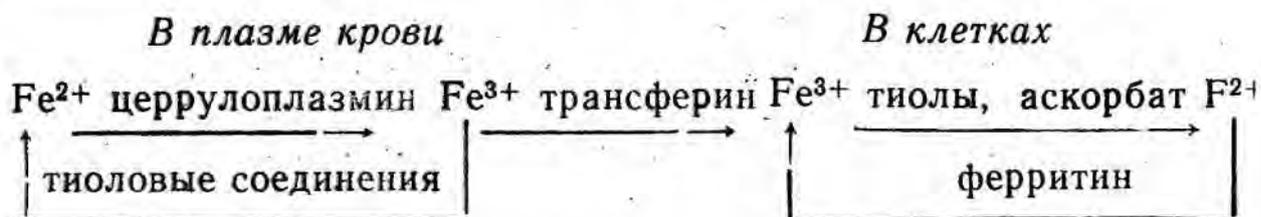


Решающая роль реакций разветвления цепей окисления определяет и важную роль двухвалентного железа в регуляции перекисного окисления липидов. С другой стороны это означает, что уровень липидной перекисидации не в последнюю (а скорее всего — в первую) очередь зависит от активности систем, восстанавливающих двухвалентное железо до трехвалентного (прямая зависимость) и систем, окисляющих двухвалентное железо до трехвалентного (зависимость перекисного окисления липидов от работы этих систем будет обратной).

Итак можно сформулировать концепцию, согласно которой уровень перекисного окисления липидов в клетках и тканях организма определяется уровнем свободного двухвалентного железа и может регулироваться системами, ответственными за окисление-восстановление ионов железа.

Какие же это системы? В плазме крови и двухвалентное железо связывается и окисляется медь — протейдом церрулоплазмином, который по этой причине является активным антиоксидантом в модельных системах. В условиях *in vivo* между уровнем церрулоплазмина и количеством продуктов перекисного окисления липидов в плазме имеется четкая об-

ратная корреляция (данные получены совместно с А. В. Козловым и О. А. Азизовой). Трехвалентное железо переносится в составе трансферина к различным тканям током крови. Клетки захватывают трансферин и осуществляют восстановление ионов Fe^{3+} до Fe^{2+} , причем соединениями, которые могут осуществлять такое восстановление, служат тиоловые соединения, восстановленные пиридиннуклеотиды и аскорбиновая кислота. По-видимому, именно закисное железо является транспортной формой этого иона в протоплазме и через внутриклеточные мембраны. Но высокая концентрация этого иона была бы убийственной для клетки по причине активизации перекисного окисления, поэтому существует система окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} и сохранения железа в такой форме — это ферритин. Таким образом, уровень ионов Fe^{2+} в плазме крови и в клетке определяется динамическим равновесием процессов его окисления и восстановления:



Очевидно, что нарушение этих процессов может быть фактором, определяющим изменение уровня липидной перекисидации как в тканевых жидкостях, включая кровь, так и внутри клеток.

7. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПАТОЛОГИИ

Надо сразу сказать, что однозначный ответ на этот вопрос в настоящее время отсутствует. Но можно сформулировать гипотезу, которая согласуется со многими фактами, накопленными к настоящему времени. Она заключается в том, что все известные случаи активации перекисного окисления можно свести к трем главным механизмам:

1. Снижение уровня липидных антиоксидантов в результате их ограниченного поступления или ускоренного разрушения. Так, например, Е-авитаминоз сопровождается синдромом перекисидации, т. е. значительной активации процессов перекисного окисления в клетках и тканях. Облучение клеток УФ-радиацией и организма — ионизирующей радиацией приводит к снижению уровня липидных антиоксидантов и последующей активацией перекисного окисления [16, 22].

2. Образование свободных радикалов в системе микросомального окисления, связанное с извращением работы си-

стемы, ответственной за гидрокселирование ксенобиотиков [15]. Наиболее изученный пример — активация перекисного окисления при отравлении некоторыми ксенобиотиками, например, четыреххлористым углеродом (подробнее см. 15).

3. Создание гипоксических условий в клетках с последующей реоксигенацией.

Последний случай заслуживает, как нам кажется, особого внимания. Дело в том, что гипоксическое состояние в ткани для каждой индивидуальной клетки реализуется в форме «да» или «нет». Вследствие высокого сродства цитохромоксидазы митохондрий к растворенному кислороду, клетка дышит с постоянной скоростью до тех пор, пока в окружающей среде есть хоть немного кислорода. В результате часть клеток, ближайших к кровеносным сосудам, не испытывает кислородного голодания, тогда как другая часть находится практически в условиях полной аноксии. Степень гипоксии — это просто процент клеток, оказавшихся в аноксических условиях. Но это не одни и те же клетки в разные моменты времени! Вследствие перераспределения кровяного потока, равно как и вследствие изменения потребления энергии клетками, при общем постоянном недостатке кислорода в каждом участке ткани происходит как бы «пульсация» кислородного режима: клетка оказывается попеременно то в состоянии кислородного достатка, то в условиях аноксии. Как это отразится на перекисном окислении? Может показаться, что поскольку в среднем время аэробноза ниже в гипоксической ткани, а перекисное окисление происходит в кислород-содержащей среде, то гипоксия всегда должна сопровождаться угнетением липидной пероксидации. Однако в анаэробных условиях усиливается восстановление ионов Fe^{2+} , а это приведет к активации перекисного окисления при последующей аэрации. Это предположение о возможной активации перекисного окисления в условиях гипоксии было сделано нами в 1972 г. [16], и в последующем было подтверждено в целой серии работ [18].

Следует отметить, что возможны и другие причины активации перекисного окисления липидов при гипоксии, помимо восстановления ионов железа. Во-первых, при гипоксии и последующей оксигенации, происходит набухание митохондрий и выход из них цитохрома с, который известен как активный катализатор перекисного окисления. Во-вторых, при гипоксии происходит увеличение концентрации кальция в цитоплазме и активация мембранных фосфолипаз, сопровождающаяся накоплением свободных жирных кислот. Эти обстоятельства также способствуют развитию процессов перекисного окисления, хотя конкретные механизмы активирующего действия ионов кальция и жирных кислот еще предстоит исследовать.

Несмотря на ограниченность наших знаний о механизме гипоксической активации перекисного окисления липидов, трудно переоценить значение самого этого явления. Не только недостатки в работе систем кровообращения, но и чрезмерная нагрузка, связанная с образованием очага гипервозбуждения или стрессовой реакцией, или с действием определенных токсических веществ и т. д. приводит к функциональной гипоксии, которая может при определенных условиях привести к активации процессов перекисного окисления липидов со всеми вытекающими последствиями. Можно ли однако считать, что активация перекисного окисления есть единственный механизм повреждения мембранных структур в условиях тканевой гипоксии? На этот вопрос, как мы сейчас увидим, можно дать уверенный отрицательный ответ.

8. АКТИВАЦИЯ МЕМБРАННЫХ ФОСФОЛИПАЗ — ВТОРОЙ ОСНОВНОЙ МЕХАНИЗМ НАРУШЕНИЯ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ МЕМБРАН В ПАТОЛОГИИ

При изучении роли тех или иных нарушений в клетках в общем повреждении ткани и органов важно выяснить временную последовательность процессов, поскольку довольно очевидно, что причина должна предшествовать следствию, а не наоборот. Бесмысленно выяснить, что происходит в ткани через 3—4 часа после прекращения доступа кислорода, если мы хотим понять, почему клетки погибли и ткань перестала функционировать через час после того, как наступило гипоксическое состояние. Поэтому рассмотрим кратко последовательность начальных изменений в клетках после прекращения кровоснабжения; времена указаны для печени при комнатной температуре, в случае мозга все происходит быстрее в 2—4 раза, при 37°C — примерно втрое быстрее, чем при 20—25°C.

Первые 5 мин: восстановление дыхательных переносчиков в цепи переноса электронов митохондрий (в частности, пиридиннуклеотидов), падение мембранного потенциала, снижение уровня АТФ в клетках примерно втрое, несмотря на активацию гликолиза [28].

Первые 10—15 мин: резкое увеличение концентрации кальция в клетках, появление свободных жирных кислот, как следствие активации фосфолипаз.

30 мин: нарушение функций митохондрий — снижение дыхательного контроля и кальций аккумулялирующей способности — [28]. Через 45—60 мин. происходит частичное восстановление функции митохондрий, но затем они оксидательно повреждаются к 90—120 мин.

В организме (при температуре тела) все цифры уменьшаются примерно в 2—3 раза.

Итак — нарушение функций митохондрий, т. е. резкое разобщение процессов окисления и фосфорилирования является практически первым серьезным повреждением клеточных структур, несовместимым с жизнью клеток, которое, надо полагать, и приводит к биологической смерти тканей и организма. Отчего же погибают митохондрии?

Ответ на этот вопрос может быть получен при моделировании гипоксического состояния в простейшей возможной системе: суспензии изолированных митохондрий. Инкубация такой суспензии в самых разнообразных условиях показывает, что условием потери этими органеллами в течение 20—30 мин. способности к окислительному фосфорилированию и накоплению ионов кальция является одновременно аноксия и присутствие небольших количеств ионов кальция в среде инкубации (около 10—30 мкМ). В аэробных условиях, когда кальций закачивался внутрь органелл, он не оказывал повреждающего действия на митохондрии. Таким образом, повреждающее действие оказывает внемитохондриальный кальций.

В чем же причина повреждающего действия ионов кальция на митохондрии?

Данные, полученные впервые в лаборатории Ван-Динена в опытах по набуханию изолированных митохондрий, а затем в нашей лаборатории в экспериментах с определением дыхательного контроля и кальций-аккумулирующей емкости митохондрий показали однозначно: все дело в том, что ионы Ca^{2+} , находящиеся снаружи, активируют митохондриальную фосфолипазу A_2 и именно гидролиз фосфолипидов, образующих бислои внутренней митохондриальной мембраны, приводит к потере ею барьерных свойств. В дальнейших опытах в нашей лаборатории было показано, что в условиях целой ткани гидролиз мембранных фосфолипидов тоже был причиной увеличения ионной проницаемости [26]). Специальные опыты показали, что увеличивается проницаемость для ионов калия и водорода. Первое приводит к набуханию митохондрий: увеличению объема органелл вследствие входа внутрь ионов, а затем — воды. Второе — возрастание протонной проницаемости сопровождается разобщением окисления и фосфорилирования.

Огромная важность гипоксического повреждения клеток при развитии почти всякого патологического процесса в условиях целого организма (частично мы уже говорили об этом) позволяет выделить фосфолипазное повреждение мембран в самостоятельный механизм нарушения барьерных свойств липидного бислоя в патологии.

Каков же молекулярный механизм нарушения барьерной функции липидного слоя при функционировании фосфолипазы A_2 ? Здесь следует разделить биохимический и биофизический аспекты проблемы. Само по себе уменьшение количества молекул фосфолипидов в липидном бислое, судя по всем имеющимся данным, не может быть причиной нарушения его барьерных свойств, т. к. мембраны обладают способностью «самозалечиваться», т. е. отверстия в них самопроизвольно затягиваются. Все дело в продуктах гидролиза фосфолипидов. Специальные исследования показали, что основную роль в росте проницаемости мембраны играют не жирные кислоты, как первоначально думали, а лизофосфатиды [29]. Такова биохимическая сторона проблемы. Что же касается биофизического механизма нарушения барьерных свойств липидного бислоя продуктами гидролиза фосфолипидов, то этой стороны вопроса мы коснемся несколько позже.

9. МЕХАНИЧЕСКОЕ (ОСМОТИЧЕСКОЕ) РАСТЯЖЕНИЕ МЕМБРАН КАК НЕЗАВИСИМЫЙ (ТРЕТИЙ) МЕХАНИЗМ НАРУШЕНИЯ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ

Морфологи, изучающие с помощью электронного микроскопа изменения в ультраструктуре различных тканей в патологии, хорошо знают, что одним из постоянных признаков таких изменений является набухание митохондрий; это подтверждают количественные морфологические оценки. В опытах с изолированными митохондриями легко убедиться, что повреждение мембран при перекисном окислении или в результате активации фосфолипазы сопровождается набуханием органелл. Непосредственной причиной этого явления оказывается увеличение ионной проницаемости, в частности калиевой, внутренней митохондриальной мембраны. Таким образом, набухание митохондрий — следствие повреждения их мембран.

На это только одна половина истины. Вторая заключается в том, что само по себе набухание тоже повреждает мембраны, независимо от других факторов. Казалось бы — это тривиальное утверждение: если мембрана растягивается под действием осмотического давления изнутри замкнутой везикулы (митохондрии, эритроцита и т. д.), то ясно, что в конце концов она должна разорваться. Действительно в гипотоническом растворе мембраны эритроцитов разрываются, эти разрывы видны на электронных микрофотографиях. Но оказывается, потеря барьерной функции происходит часто в условиях, когда никаких морфологических изменений в мемб-

ране, тем более значительных разрывов, наблюдать не удастся, и это относится и к эритроцитам, и, тем более, к внутренней мембране митохондрий. Не останавливаясь на детальном описании всех экспериментов, расскажем лишь об одном. Если поместить митохондрии в гипотонический раствор, их объем увеличится пропорционально уменьшению концентрации ионов и молекул в окружающем растворе. Примерно при 90 мОсм происходит разрыв наружной митохондриальной мембраны и потеря около половины цитохрома с, который, как известно, находится на внешней поверхности внутренней мембраны в равновесии с раствором в межмембранном пространстве. Это приводит к снижению вдвое скорости дыхания митохондрий. Проницаемость внутренней мембраны при этом остается неизменной и дыхательный контроль сохраняется. При 60 мОсм происходит резкое возрастание проницаемости внутренней мембраны и полная потеря дыхательного контроля. Но никаких морфологически наблюдаемых разрывов в мембране нет. Более того — процесс обратим: если сразу же вновь довести окружающий раствор до изотонии (около 300 мОсм), митохондрии сожмутся и дыхательный контроль восстановится. Но если дождаться, когда мембрана будет разрушена действием фосфолипазы или в результате перекисного окисления, то «оживить» митохондрии помещением их в изотонический раствор не удастся.

Таким образом механическое (осмотическое по своему происхождению) растяжение мембраны можно рассматривать как особый, независимый от других, механизм нарушения барьерной функции липидного бислоя.

Роль этого механизма в патологии, возможно, еще будет со временем оценена по достоинству. В некоторых случаях она несомненна. Так при гипоксическом повреждении митохондрий в результате активации фосфолипазы мембраны становятся проницаемыми для ионов калия. Если к таким поврежденным органеллам, изолированным в анаэробных условиях, добавить АТФ, происходит ресинтез фосфолипидов, «залечивание» мембран, и митохондрии полностью восстанавливают свои функции. Но если вместо добавки АТФ пустить в суспензию кислород, происходит набухание частиц, связанное с восстановлением мембранного потенциала и накачиванием внутрь органелл катионов, для которых поврежденные мембраны проницаемы. Набухание приводит к окончательной потере барьерной функции мембран и полной гибели митохондрий. По-видимому, именно набухание в кислородной среде митохондрий, подвергнутых действию собственной фосфолипазы, лежит в основе известного повреждающего действия реоксигенации на предварительно ишемизированную ткань.

10. ЧЕТЫРЕ ОСНОВНЫХ МЕХАНИЗМА НАРУШЕНИЙ БАРЬЕРНЫХ СВОЙСТВ МЕМБРАН В ПАТОЛОГИИ

В условиях эксперимента, например, в опытах на БЛМ, можно создать немало ситуаций, которые сопровождаются увеличением ионной проницаемости мембран. Как мы уже видели частично и еще увидим ниже, перечисленные выше факторы — перекисное окисление липидов, действие фосфолипазы A_2 (в случае БЛМ ее нужно, разумеется, добавлять извне), растяжение мембраны — все они приводят к снижению барьерной функции мембраны. Но наряду с этим рост проницаемости липидного слоя может быть вызван внедрением широкого класса соединений, осуществляющих перенос ионов через бислои, включая многие антибиотики, яды и лекарственные препараты. Сомнительно однако, что подобного рода соединения играют большую роль в развитии патологических процессов (разумеется, последнее замечание не относится к продуктам перекисного окисления и действия фосфолипаз, о чем уже говорили). Вместе с тем в модельных опытах на БЛМ можно встретиться с действием еще одного фактора, который, возможно, играет роль и в клеточной патологии: речь идет о полиэлектролитах, адсорбируемых на мембране. К числу таких полиэлектролитов относятся полипептиды и белки. Действительно, адсорбция многих белков на БЛМ сопровождается резким возрастанием ионной проницаемости мембраны [30].

Обобщение всех подобных фактов, часть которых мы здесь приводили, позволила нам сформулировать в 1973 г. гипотезу, согласно которой существует только четыре фундаментальных механизма нарушения барьерной функции мембран в патологии:

1. Перекисное окисление липидов.
2. Активация мембранных фосфолипаз.
3. Механическое (осмотическое) растяжение.
4. Адсорбция чужеродных белков.

Этот ограниченный набор позволяет объяснить большое число фактов, относящихся к нарушению функций мембран при самых разнообразных патологических состояниях. Разумеется, только будущее покажет, потребуется ли расширение этого списка.

11. СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ЕДИНЫЙ ПРОЦЕСС НАРУШЕНИЯ БАРЬЕРНЫХ СВОЙСТВ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ?

Вероятно, пора задать вопрос, по какой же причине к одному и тому же результату — нарушение барьерных свойств мембран — приводят столь различные воздействия: свободнорадикальная химическая реакция, ферментативный гидролиз, механическая сила и физико-химический процесс адсорбции. Естественно заподозрить, что на самом деле все эти разнообразные воздействия приводят каким-то образом к одному и тому же конечному молекулярному процессу, который и является непосредственной причиной нарушения целостности, непроницаемости липидного бислоя.

Мы предположили, что таким процессом является электрический пробой мембраны собственным мембранным потенциалом [31, 32]).

Явление электрического пробоя модельных и биологических мембран известно уже более полутора десятков лет (см. обзор 33). Если ввести в клетку микроэлектроды и приложить высокую разность потенциалов, произойдет пробой, т. е. резкое возрастание проницаемости под действием электрического поля. Можно вызвать пробой мембраны также в суспензии клеток, прикладывая к ней импульсы потенциала высокой амплитуды или пропуская клетки через маленькое отверстие в перегородке, по сторонам которой создана определенная разность потенциалов. Во всех перечисленных случаях непосредственно на мембрану подаются импульсы потенциала длительностью в несколько миллисекунд и амплитудой от 400 мВ до 1,5 В. Подробное изучение феноменологии пробоя на БЛМ позволило создать теорию этого явления, хорошо объясняющую все полученные к настоящему времени экспериментальные факты [33]. В основе теории лежит представление о том, что в липидном бислое время от времени в результате теплового движения молекул могут образоваться разрывы (дефекты), которые образуют заполненную водным раствором пору (канал). Образование такой поры еще не есть «пробой» мембраны. Серьезное нарушение барьерной функции произойдет, если пора начнет расти, т. е. увеличиваться в диаметре. Препятствием к этому является энергетический барьер, возникающий вследствие того, что рост поры означает увеличение границы фаз: водной и липидной, а это связано с увеличением энергии системы. Два фактора снижают величину этого энергетического барьера: уменьшение поверхностного натяжения на границе раздела фаз и увеличение разности потенциалов по сторонам мембраны. Если разность потенциалов достигнет неко-

торой определенной величины и время ее действия будет достаточно продолжительным, то хотя бы один энергетический барьер в мембране будет преодолен и произойдет самопроизвольный рост канала, который, если не сбросить потенциал, приведет к механическому разрыву мембраны.

Как ни велики достижения в этой области, явление электрического пробоя до некоторых пор никто не рассматривал как процесс, имеющий отношение к жизни клетки. Причин было, по меньшей мере, две. Во-первых, пробой наблюдали под действием разности потенциалов, прикладываемых к мембране от постороннего источника, а во-вторых, по своей величине потенциалы пробоя (400—1500 мВ) заметно превышали мембранные потенциалы, существующие на цитоплазматических мембранах (60—80 мВ) и даже мембранах митохондрий в энергизованном состоянии (около 180 мВ).

Данные, полученные за последние 4 года в нашей лаборатории заставили однако подвергнуть ревизии такой взгляд на вещи.

Было найдено, что пробой БЛМ происходит при потенциалах ниже 200 мВ, т. е. сравнимых с потенциалами на мембранах митохондрий. Почему же этот результат так сильно расходится с цитировавшимися выше цифрами? Теория, развитая Ю. А. Чизмаджевым и сотрудниками, объясняет это расхождение. Согласно теории и данным экспериментальных измерений, величина потенциала, вызывающего электрический пробой мембраны, находится в обратной зависимости от времени прикладывания потенциала. Для импульсов длительностью 10 мкс потенциал пробоя БЛМ имеет величину около 1 В, при длительности импульсов 10 мс потенциал пробоя мембраны снижается до 500 мВ. В интервалах времени 1—10 мин. потенциал пробоя снижается до 150 мВ [33]; примерно такая же величина потенциала пробоя имела место и в наших опытах.

Таким образом, потенциалы пробоя липидного бислоя под действием постоянного (а не импульсного) электрического поля оказываются сравнимы по величине с внутриклеточными мембранными потенциалами.

С другой стороны, нами было показано, что мембрана может быть «пробита» не только при создании на ней разности потенциалов, подводимой от внешнего источника напряжения, но и под действием собственного мембранного потенциала, т. е. ионных диффузионных потенциалов, генерируемых на самой мембране.

В этих опытах, проводившихся в нашей лаборатории А. В. Путвинским, Т. В. Пучковой, О. М. Парневым и О. В. Нариным, были использованы в качестве объектов исследования БЛМ, липосомы, эритроциты и митохондрии.

Остановимся на результатах изучения пробоя различных мембранных структур ионными диффузионными потенциалами.

Создание ионного диффузионного потенциала на БЛМ — задача простая. Мембрану помещают в раствор электролита, скажем KCl неодинаковой концентрации с двух сторон мембраны. Затем вводят в раствор индуктор ионной проницаемости, скажем, валиномицин, и измеряют мембранный потенциал.

Этот потенциал нарастает во времени, что отражает процесс диффузии ионов в область их меньшей концентрации, приближаясь к некоторому равновесному значению. Величина равновесного потенциала описывается уравнением Нернста, о чем уже говорилось в разделе 2. Этот потенциал может долго удерживаться на мембране, если его величина невелика. Но если она значительна, скажем превышает 100—150 мВ, то происходит внезапное падение потенциала и наблюдаются сильные его флуктуации, свидетельствующие о резком возрастании тока через БЛМ, связанном с ее электрическим пробоем. Феноменология пробоя под действием собственного мембранного потенциала на БЛМ очень сходна с картиной, наблюдаемой при подаче плавно увеличивающегося напряжения от внешнего источника.

Сложнее оказалось создать условия для изучения пробоя ионным диффузионным потенциалом мембран везикулярных структур, но эту трудность удалось преодолеть в опытах А. В. Путвинского и сотрудников в нашей лаборатории. Начнем с описания опытов с фосфолипидными везикулами-липосомами. Приготовив их практически в чистой воде, их впрыскивали затем в раствор ацетата калия, помещенный в кювету нефелометра. При этом происходило два события: во-первых, внутрь входило некоторое количество уксусной кислоты и на мембране создавался ΔpH . Это «запирало» дальнейшее вхождение кислоты и таким образом раствор снаружи липсом оставался гипертоническим по отношению к внутреннему раствору. Поэтому (во-вторых) липсомы сжимались, а светопропускание суспензии уменьшалось (возрастала мутность). Если теперь добавить к суспензии переносчик протонов КХФ, ионы H^+ начинают диффундировать изнутри липсом (где их было больше) и на мембране возникает диффузионный протонный потенциал (образно говоря, ΔpH порождает $\Delta \phi$). Чем выше была исходная концентрация ацетата калия в среде, тем значительнее величина ΔpH и тем выше мембранный потенциал, генерируемый при добавлении протонофора (т. е. КХФ). Было выведено уравнение, позволяющее рассчитывать величину мембранных потенциалов, генерируемых таким способом, если известна концентрация ацетата калия, в которую помещали липосо-

мы [32] Как же ведут себя липосомы в такой ситуации? Оказалось, что при генерации небольших по величине мембранных потенциалов (ниже 140—170 мВ) их объем не изменяется (т. е. мутность суспензии остается прежней при введении КХФ). Но при высоких мембранных потенциалах происходит быстрое, можно даже сказать скачкообразное, просветление суспензии, говорящее о резком набухании везикул. Это говорит о резком возрастании проницаемости мембран, по крайней мере для ионов калия. В условиях, когда внутрь могут входить ионы калия и уксусная кислота, а наружу — выходить протон, происходит, по общему балансу, свободное вхождение ацетата калия в липосомы из окружающей среды, осмотические концентрации растворов снаружи и внутри выравниваются, и сила, сжимающая липосомы, исчезает. Происходит восстановление их объема и уменьшение мутности суспензии. Зависимость степени набухания липосом от величины мембранного потенциала имеет характер зависимости «все или ничего»: ниже потенциала 100 мВ с мембранами ничего не происходит, выше этой величины происходит резкое увеличение проницаемости мембран. Картина очень похожая на то, что наблюдается и в случае БЛМ. Очевидно, что при потенциале $\varphi^* = 100$ мВ произошел электрический пробой мембран липосом ионным диффузионным потенциалом. В дальнейших опытах было показано, что пробой мембран липосом может происходить не только под действием протонного диффузионного потенциала, но и под действием диффузионных потенциалов, создаваемых ионами K^+ или J^- : дело не в том, что создает разность потенциалов на мембране, а лишь в том, как велика эта разность.

Искусственные мембраны, как бы ни были убедительны полученные с ними данные — лишь модель липидного бислоя мембран биологических. В живой клетке пробой, если он вообще имеет место, должен происходить под влиянием мембранных потенциалов, генерируемых дыхательной цепью митохондрий или создаваемых диффузией ионов через цитоплазматическую мембрану клетки. Можно ли наблюдать пробой митохондриальной и клеточной мембран собственными мембранными потенциалами?

Как уже говорилось в разделе 3, на мембране энергизованных митохондрий создается разность электрохимических потенциалов протонов $\Delta\mu$, состоящая из $\Delta\varphi$ и ΔpH . Генерацию мембранного потенциала при энергизации можно наблюдать разными способами, наиболее наглядный из которых заключается в измерении флуоресценции некоторых красителей. В ряде работ (см. обзор 35) было показано, что интенсивность флуоресценции красителя *dis-C₃*-(5) снижается в митохондриальной суспензии пропорционально величине мембранного потенциала на мембранах митохондрий (ма-

трикс при этом имеет знак «минус» по отношению к потенциалу среды). Таким образом, степень тушения исходной флуоресценции позволяет непосредственно измерять изменение мембранного потенциала. Было показано, что энергизация митохондрий приводит к снижению интенсивности флуоресценции зонда, что соответствует возрастанию потенциала на мембране. Последующее добавление ацетата калия, как и следовало ожидать, приводит к дальнейшему увеличению мембранного потенциала, величина которого остается постоянной при концентрации добавленного ацетата не выше 3 мМ. При более высоких концентрациях ацетата мембранный потенциал, достигнув некоторого максимального уровня, начинает затем снижаться. Этот факт можно объяснить электрическим пробоем внутренних мембран митохондрий, приводящим к увеличению ионной проницаемости мембран, снижению мембранного потенциала, т. е. к потере мембранами барьерных свойств.

Наблюдать электрический пробой мембран митохондрий можно также измеряя светорассеяние суспензии, которое отражает изменение объема органелл. При добавлении к суспензии энергизованных частиц низких, «докритических» концентраций ацетата калия набухание митохондрий не происходит, но при достижении критической концентрации ацетата (которая была такой же, что и в опытах по измерению флуоресценции зонда, 3 мМ) происходило быстрое набухание митохондрий, говорящее о потере мембранами барьерных свойств и вхождении в матрикс значительных количеств ионов.

Аналогичные данные были получены в опытах, в которых ацетат калия заменили фосфатом калия.

Следует отметить, что явление набухания митохондрий в присутствии солей слабых кислот было известно уже давно [14, 15, 16], однако объяснения этому не было, а между тем нам теперь ясно, что во всех этих случаях исследователи имели дело с электрическим пробоем мембран собственным мембранным потенциалом.

Величина потенциала пробоя внутренней мембраны митохондрий, по нашим данным, составляет около 200 мВ; это всего лишь на 15—20 мВ превышает разность потенциалов на мембранах энергизованных митохондрий. В условиях патологии электрическая стабильность мембран может снижаться. Это хорошо видно в опыте, где митохондрий подвергались ультрафиолетовому облучению. Известно, что в таких митохондриях усиливается перекисное окисление липидов. По мере накопления продуктов ПОЛ происходило снижение потенциала пробоя мембран. В конце концов потенциал пробоя должен достичь значения, равного потенциалу энергизованных митохондрий, к которым вообще не добавляли

ацетата, т. е. 180—185 мВ. При такой степени повреждения мембраны митохондрий начнут «пробиваться» собственным потенциалом как в опытах, так, очевидно, и непосредственно в живой клетке.

Предварительные опыты, проведенные в нашей лаборатории О. В. Нариным, показали, что при гидролизе мембранных фосфолипидов собственной мембранной фосфелипазой, равно как и при осмотическом растяжении мембран в гипотонической среде потенциал пробоя в митохондриях также снижается.

В заключение этого раздела следует остановиться на возможности электрического пробоя цитоплазматических или клеточных мембран. Потенциал на таких мембранах во многих клетках достигает значений 60—80 мВ, что конечно гораздо меньше величины потенциала на митохондриальной мембране. Но весь вопрос в том, какова электрическая прочность клеточных мембран. К сожалению, пока нам не удалось провести эксперименты по возможности пробоя собственным мембранным потенциалом «классических» электровозбудимых мембран, т. е. мембран нервных и мышечных клеток. Но все же удалось показать возможность электрического пробоя клеточных мембран собственным мембранным потенциалом, используя в качестве модельной системы другие клетки — эритроциты. В обычных условиях мембранный потенциал эритроцитов очень низок — всего около 8 мВ; это объясняется высокой проницаемостью эритроцитарных мембран для ионов хлора, благодаря чему величина потенциала определяется практически только соотношением концентраций ионов Cl^- во внутренней и внешней среде. Помещая эритроциты в незабуференный изотонический раствор сахарозы, добавкой разных концентраций KCl можно создавать на эритроцитарной мембране разные потенциалы; это сопровождается перераспределением ионов OH^- и изменением pH в окружающей среде. Создаваемый мембранный потенциал может быть стабильным или, напротив, возвращаться к исходному уровню после достижения некоторого максимального значения: обо всем этом нам скажут изменения pH в окружающей среде. При этом при низких значениях мембранного потенциала (ниже 60—90 мВ) он был стабилен, а при более высоких начинает вдруг падать. Картина очень похожа на вольт-амперную характеристику БЛМ и липосом. Во всех случаях, включая эритроциты, резкое возрастание тока ионов через мембрану и падение мембранного потенциала происходило после того, как мембранный потенциал достигал некоторого критического значения. Во всех случаях причиной такого резкого нарушения барьерной функции мембран был, по всей видимости, электрический пробой липидного бислоя. Потенциал пробоя клеточных мем-

бран (60—90 мВ) в эритроцитах заметно превышает собственный потенциал (8 мВ), но вполне сравним с мембранным потенциалом у нервных и мышечных клеток. Возможно, что снижение в условиях патологии электрической стабильности (т. е. потенциала пробоя) мембран этих клеток может привести к их пробоем собственным мембранным потенциалом. В модельных опытах с эритроцитами было показано, что УФ-индуцированное перекисное окисление снижало потенциал пробоя: так при дозе 0,32 Дж/см² потенциал пробоя уменьшался до 55 мВ, а при дозе 0,73 Дж/см² — до 35 мВ. Не менее интересный результат был получен при механическом (осмотическом) растяжении мембран эритроцитов. Вызвать разную степень растяжения мембран можно, помещая эритроциты в гипотоническую среду с разной суммарной концентрацией ионов (K⁺ и Cl⁻) и молекул (сахарозы). О степени набухания эритроцитов (и косвенно — растяжения мембран) можно судить по изменению гематокрита. Было показано, что увеличение гематокрита суспензии эритроцитов в гипотонической среде сопровождается снижением потенциала пробоя мембран. Таким образом, перекисное окисление липидов и осмотическое растяжение мембран снижало потенциал пробоя в опытах с эритроцитами и можно думать, что снижение этой характеристики у мембран иных клеток в аналогичных условиях может привести к электрическому пробоем этих мембран собственным мембранным потенциалом.

12. ЗАЩИТНЫЕ СИСТЕМЫ МЕМБРАНЫ

Как же клетка и организм в целом справляются с постоянно существующей опасностью нарушения барьерных свойств липидного бислоя? Очевидно, поддерживая строго контролируемый уровень тех процессов, которые могут привести к повреждению липидного слоя мембран.

Перекисное окисление липидов ограничивается супероксиддисмутазой, каталазой, глутатион-пероксидазой (+ тиолы), липидными антиоксидантами, железо-связывающими системами клеток и плазмы крови.

Активность фосфолипаз ограничивается низким уровнем ионов кальция в гиалоплазме и не слишком высоким их содержанием в матриксе митохондрий.

Механическое растяжение мембран ограничивается поддержанием осмотического баланса между клеткой и окружающей средой и существованием цитоскелета, а также структурных мембранных белков.

Адсорбция чужеродных полиэлектролитов исключается тем, что в нормально функционирующей клетке сбалансирован метаболизм.

Но если все эти защитные системы не сработали, то включается последняя линия обороны: системы, сбрасывающие мембранный потенциал и системы, повышающие электрическую прочность мембраны. Остановимся лишь на последних. По-видимому, живая клетка избрала два способа увеличить электрическую прочность своих мембран. Первый — это включение в липидный слой холестерина. То ли вследствие повышения вязкости мембран, то ли по каким-то иным неизвестным причинам, холестерин резко увеличивает электрическую прочность липидного бислоя, т. е. повышает потенциал пробоя. Не в этом ли заключается главная функция холестерина в клеточных мембранах?

Второй способ защиты от пробоя — это асимметричное распределение электрических зарядов на двух поверхностях мембраны. Дело в том, что пробой липидного слоя мембраны происходит при определенной разности потенциалов непосредственно между границами этого слоя ($\Delta\varphi$), а эта величина складывается из разности потенциалов поверхностей ($\Delta\varphi_s$), обусловленной асимметричным распределением зарядов на мембране, и разности потенциалов между водными фазами (φ_m):

$$\Delta\varphi = \Delta\varphi_s + \varphi_m.$$

Наружная поверхность клеточных и митохондриальных мембран из-за наличия гликокаликса заряжена отрицательно по отношению к внутренней поверхности, т. е. $\Delta\varphi_s$ имеет знак «+» внутри, а трансмембранный потенциал (φ_m) и в клетке и в митохондриях имеет внутри знак «—». Таким образом поверхностный потенциал $\Delta\varphi_s$ «демпфирует» действие потенциала трансмембранного φ_m , снижая скачок потенциала $\Delta\varphi$ на липидном бислое и предохраняя тем самым этот слой от электрического пробоя.

Не в этом ли состоит одна из функций гликокаликса в клеточных мембранах?

13. ИТОГИ.

Итак, нарушение барьерной функции мембран (т. е. барьерной функции липидного слоя в мембранах) есть один из ведущих механизмов патогенеза. Потеря барьерных функций непосредственно вызывается одним из четырех процессов: перекисным окислением липидов, действием фосфолипаз, растяжением мембран или адсорбцией на ней чужеродных белков. Частично в основе потери барьерной функции лежит появление селективных переносчиков ионов или ионных каналов. Но основным механизмом нарушения мембранного барьера является, по-видимому, электрический пробой мембран собственным мембранным потенциалом. Клетка располагает

целой системой защиты от развития всех этих неблагоприятных событий. Анализ состояния этой системы и свойств самих мембран может быть положен в основу «мембранного диагноза». Коррекция систем защиты и свойств самих мембран лежит в основе зарождающейся уже «мембранотерапии», к которой можно, в частности, отнести все более широко используемое применение в лечебных целях природных и синтетических биоантиоксидантов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Müller P., Rudin D. O., Tien U. T., Westcott W. C. Formation and properties of bimolecular lipid membranes. In: Recent Progress in Surface Science. N-4, 1964, p. 379—393.
2. Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. «Холестериноз», М., Медицина, 1983.
3. Ермишкин Л. Н., Зильберштейн А. Я. Ионные каналы, образуемые антибиотиками. Структура и свойства. Сб. Итоги науки и техники. Биофизика мембран. Т. 2. Ионные каналы и их модели. М., 1982, стр. 82—158.
4. Tien H. T., Diana A. L. Bimolecular lipid membranes. A review and a summary of some recent studies.—Chem. Phys. Lipids, 1968, 2, 1:55—101.
5. Bangham A. D., De Gier I., Greville C. D. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals.—Chem. Phys. Lipids, 1967, 1, 3:225—246.
6. Лев А. А. Ионная избирательность клеточных мембран. Л.-д., Наука, 1975.
7. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., Наука, 1972.
8. Иванов А. С., Путвинский А. В., Антонов В. Ф., Владимиров Ю. А. Увеличение протонной проницаемости липосом при перекисном фотоокислении липидов. Биофизика, 1977, т. 22, № 4, стр. 621—624.
9. Поглазов А. Ф., Шубин М. В., Скоцеллс Ю. Г., Алимов В. А., Владимиров Ю. А. Флуориметрическое изучение выхода Ca^{2+} из липосом, индуцированного воздействием фосфолипазы A_2 . Биофизика, 1975, т. 20, стр. 69—72.
10. Лебедев А. В. Ионные каналы в бислойных липидных мембранах, зависящие от кислорода. Докл. АН СССР, 1981, 260, № 3, 757—761.
11. Putvinsky A. V., Potapenko A. Ya., Puchkov E. O., Roschupkin D. I., Vladimirov Yu. A. Study of effect of ultraviolet light on biomembranes. VI. Increase

in the ion permeability of mitochondrial and artificial lipid membranes.— *Studia Biophysica*, 1977, 64, 1:17—32.

12. Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Суслова Т. Б., Потапенко А. Я. Механизм перекисного окисления липидов и его действие на биологические мембраны.— В кн.: Молекулярные механизмы патологии клеточных мембран. М., 1975, с. 56—117.

13. Каган В. Е., Азизова О. А., Архипенко Ю. В., Клаан Н. К., Козлов Ю. П., Владимиров Ю. А. Взаимосвязь структурных и функциональных перестроек в мембранах саркоплазматического ретикулума при перекисном окислении липидов. *Биофизика*, 1977, № 4, 625—630.

14. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.— *Biol. Rev.*, 1966, 41,

15. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М., Наука, 1978.

16. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука, 1972.

17. Roshchupkin D. I., Pistsov M. Yu., Potapenko A. Ya. Inhibition of ultra-violet light-induced erythema by antioxidants.— *Arch. Dermatol. Res.*, 1979, 226, 91—94.

18. Виленко М. В. Биологические аспекты аллотрансплантации почки. М., Медицина, 1978.

19. Меерсон Ф. ., Каган В. Е., Прилипко Л. Л. и др. Активация перекисного окисления липидов при эмоционально-болевым стрессе.— *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, 1979, 87, 10, 404—406.

20. Vladimirov Yu. A., Olenev V. I., Suslova T. B., Cheremisina Z. P. Lipid peroxidation in mitochondrial membranes.— *Advances in Lipid Research*. 1980, 17, 173—249.

21. Крыжановский Г. Н., Никушин Е. В., Браславский В. Е., Глебов Р. Н. Перекисное окисление в очаге гиперактивности в коре головного мозга крыс.— *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, 1980, 89, 1, 14—16.

22. Бурлакова Е. Б., Алексенко А. В., Молочкин Е. М., Пальмина Н. П., Храпова Н. П. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М., Наука, 1975.

23. Козлов Ю. П., Данилов В. С., Каган В. Е., Ситковский М. В. Свободнорадикальное окисление липидов в биологических мембранах. М., МГУ, 1972.

24. Каган В. Е., Ланкин В. З., Шведова А. А. и др. Ферментные и неферментные системы защиты мембран фо-

торецепторов от активных форм кислорода и перекисей липидов. Бюлл. exper. биол. и мед., 1979, 88, 8, 164—166.

25. Дубур Г. Я., Велена А. Х. Влияние физиологически активных соединений на системы перекисного окисления липидов в биологических мембранах. В кн.: Биомембраны. Структура. Функции. Медицинские аспекты. Рига, «Зинатне», 1981, 257—277.

26. Владимиров Ю. А., Каган Э. М. Механизмы нарушения биоэнергетических функций мембран митохондрий при тканевой гипоксии. Кардиология, 1981, № 1, 82—85.

27. Кибедмагомедова Х. А., Мельников Ю. Л., Владимиров Ю. А. Хемилюминесценция, сопряженная с образованием липидных перекисей в биологических мембранах V. Биофизика, 1970, 15, 6, 1022—1028.

28. Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. Повреждение митохондрий при аноксии.— В кн.: Итоги науки и техники. Биофизика, 1975, т. 5, с. 11—55.

29. Pfeiffer D. R., Schmid P. C., Beatrice M. C., Schmid H. H. O. Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of Ca^{2+} plus N-ethylmaleide on mitochondrial function.— J. Biol. Chem., 1979, 254, 22:11485—11494.

30. Корпанова Е. А., Антонов В. Ф. Взаимодействие ядерных белков, протамина и гистона с заряженными бислойными мембранами. Биофизика, 1975, т. 20, № 5, с. 812—815.

31. Пучкова Т. В., Путвинский А. В., Владимиров Ю. А. Снижение электрической прочности как основной механизм нарушения барьерной функции биомембран. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 6, с. 1489—1492.

32. Пучкова Т. В., Путвинский А. В., Владимиров Ю. А. Электрический пробой липидного бислоя диффузионным потенциалом. Докл. АН СССР, 1979, т. 249, № 5, с. 1241—1244.

33. Чизмаджев Ю. А., Черномордик Л. В., Пастушенко В. Ф. Электрический прибор бислойных липидных мембран. В кн.: Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биофиз. мембран, М., 1982, т. 2.

34. Пучкова Т. В., Путвинский А. В., Владимиров Ю. А., Парнев О. М. Электрический пробой мембран фосфолипидных везикул диффузионным потенциалом.— Биофизика, 1981, 26, 2:265—270.

35. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., Наука, 1980.

Подписано в печать 27.09.85 г.
Тираж 500 экз.

А 10454.
Заказ 1030

Объем 2,5 п. л.
Бесплатно

Типография ХОЗУ Минпромстроя СССР. Петровка, д. 14