

Fyzikální vlastnosti biomembrán

Physical properties of biomembranes

Jana Heinzová

Bakalářská práce
2005



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Zde patří oficiální zadání diplomové práce.

Tato strana se ze šablony netiskne. Je to výstup z IS STAG.

ABSTRAKT

Kapalné krystaly jsou látky, které mají za určitých termodynamických podmínek vlastnosti pevné látky (krystalu) nebo kapaliny. Mezi pevnou a kapalnou fází může ve vhodném prostředí vzniknout mezofáze – tzv. kapalně krystalická fáze se specifickými vlastnostmi. Jako kapalně krystalické látky se chovají biologické membrány, které vytváří bariéru regulující vztahy mezi buňkami a jejich okolím. Hlavní složka biomembrán – lipidové a proteinové systémy mění vlivem prostředí svůj charakter, což ovlivňuje chování celé buňky a tím i organismu.

ABSTRACT

The liquid crystals are the substances, which have properties of solid or liquid phase in definite thermodynamics terms. Between solid and liquid phase can arise interphase in the convenient surroundings – liquid crystals phase with the specific characteristics. The biomembranes behave as liquid crystal substance which construct barrier with regulating relationships between cells and their surroundings. That main component of biomembranes – the lipid and proteins systems – changes theirs properties by influence of medium, which affect behaviour of the all cell and consequence whole organism.

Děkuji vedoucímu bakalářské práce panu Mgr. Aleši Mráčkovi za odborné vedení, rady a připomínky, které mi při řešení mé práce poskytoval.

Prohlašuji, že jsem na celé bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně, 14.6. 2005

....

.....

jméno diplomanta

OBSAH

1SLOŽENÍ A STRUKTURA BIOMEMBRÁN.....	8
1.1LIPIDY.....	8
1.2PROTEINY.....	12
2MOLEKULOVÁ STAVBA BIOMEMBRÁN.....	15
3FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI BIOMEMBRÁN.....	17
3.1BIOMEMBRÁNOVÁ MIKROVISKOZITA A MIKROFLUIDITA.....	17
3.2BIOMEMBRÁNOVÝ POŘÁDEK.....	17
3.3ELEKTROSTATICKÉ VLASTNOSTI.....	18
3.4BIOMEMBRÁNOVÁ KAPACITA.....	19
4BIOMEMBRÁNY JAKO KAPALNĚ KRYSTALICKÉ LÁTKY.....	20
4.1FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI KAPALNĚ KRYSTALICKÝCH MOLEKUL.....	23
5TRANSPORT BIOMEMBRÁNAMI.....	26
5.1PROSTÁ DIFÚZE.....	26
5.2SPROSTŘEDKOVANÝ TRANSPORT.....	27
5.3USNADNĚNÁ DIFÚZE.....	29
5.4AKTIVNÍ TRANSPORT.....	30
5.5SEKUNDÁRNÍ AKTIVNÍ TRANSPORT.....	30
5.6PRIMÁRNÍ AKTIVNÍ TRANSPORT.....	32

ÚVOD

Již od 60. let 20. století je studován rozdíl chování kapalných krystalů a pevných krystalických látek. Pro oba tyto systémy je charakteristická anizotropie dielektrických a magnetických vlastností. U pevných látek dojde v polích ke vzniku indukovaného elektrického nebo magnetického momentu, který je různě velký pro různou orientaci pole v materiálu. U kapalných krystalů však dochází díky jejich tekutosti k reorientaci molekul vzhledem k vnějšímu poli, čehož se využívá k uspořádání kapalných krystalů ve vzorcích. [1]

Vhodnost výběru kapalného krystalu se posuzuje podle optických vlastností, spotřeby elektrické energie a fotochemické stability. Kapalně krystalické krystaly nejsou jen užitečnými materiály pro aplikace. Hrají důležitou roli v materiálové vědě, často jsou pokládány za modelové materiály ke studiu obecných vlastností kondenzovaných systémů. Je možnost na nich zkoumat vztahy mezi strukturou molekul a fyzikálními vlastnostmi látek a přispívají k pochopení určitých vlastností samoorganizujících se systémů, biomolekul a biologických membrán. Zpočátku byl výzkum kapalných krystalů zaměřen na hledání nových typů kapalně krystalických látek vhodných pro použití v displejích, kde je nutné, aby rozsah teplot kapalně krystalické fáze ležel v oblasti pokojových teplot. Dnes je výzkum zaměřen hlavně na studium kapalně krystalických a termodynamických vlastností biomembrán. [2]

Konformační změny biomakromolekul jsou analogické přeměnám biomembránové struktury. Skupinu pěti hlavních biopolymerů tvoří buňky DNA, RNA, a složky biomembrán jako proteiny, polysacharidy a složené lipidy. Jsou hlavními biomolekulami buněk a tkání vyšších živočichů. Vyskytují se ve svalstvu, nervových tkáních a v mozku. Biomembrány separují jednu buňku od druhé a tím umožňují buněčnou individualitu. Zároveň obsahují speciální oblasti mezibuněčných kontaktů umožňující výměnu látek mezi buňkami. Fungují jako integrální článek spojení signál – odpověď a jsou místem přeměny energie při fotosyntéze. Klíčovou roli v činnosti čidel organismů hraje dráždění spojení nervových buněk průchodem iontů biomembránou. Složitější je přenos informace mezi vzdálenými buňkami, který obstarávají hormony. Biomembrány cílových buněk obsahují receptor, který rozhoduje o tom, zda bude buňka na odpovídající hormon reagovat a určuje pak povahu reakce. Proto má v mnoha případech tentýž hormon v různých cílových buňkách téhož organismu různé účinky. Také podstatné změny ve struktuře biomembrány (způsobené teplotou, elektrickým polem) mohou ovlivnit vodní rovnováhu, tok iontu a tím každý pochod v buňce. Změny některých biomembránových komponentů vedou k řadě

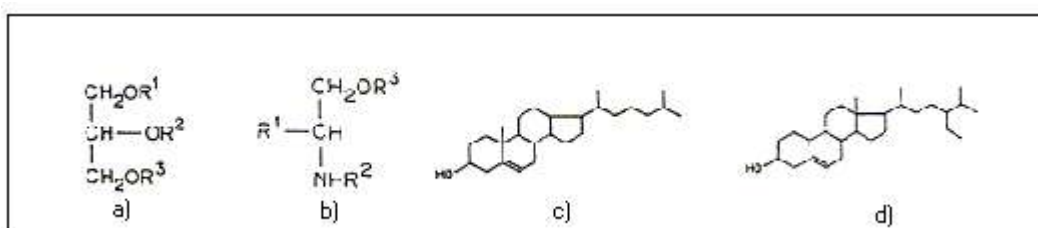
onemocnění (např. věčtých tepen, zvýšení hladiny cholesterolu v krvi). Normální buněčná funkce tedy závisí na normálních biomembránách. [3]

1 SLOŽENÍ A STRUKTURA BIOMEMBRÁN

Biomembrány jsou komplexy **lipidů** a **proteinů**. Hmotnostní průměr mezi oběma složkami kolísá od 4:1 po asi 1:3. Dále biomembrány obsahují sacharidy, ionty a vázanou vodu. Sacharidy přítomné v biomembránách jsou vázány kovalentními vazbami buď na lipidy nebo proteiny. [4]

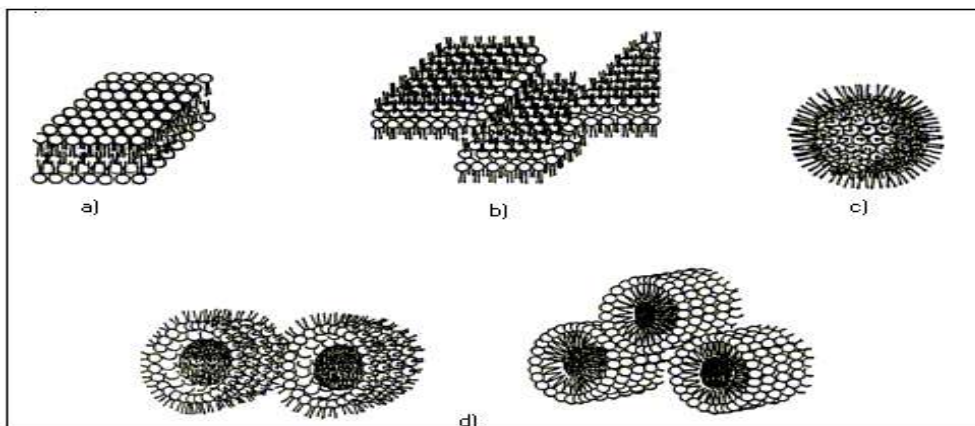
1.1 Lipidy

Lipidy biomembrán lze rozdělit na glycerolipidy (konstruované na bázi glycerolu - Obr. 1a), sfingolipidy (zbudované na bázi 2-aminoethanolu – Obr. 1b) a steoroly (živočišné-cholesterol – Obr. 1c a rostlinné- β -sitosterol – Obr. 1d).



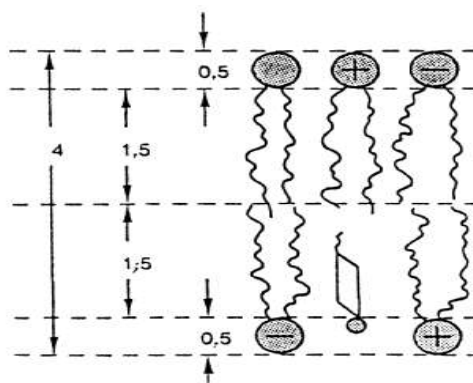
Obr. 1. a) obecný vzorec glycerolipidů, b) obecný vzorec sfingolipidů, c) vzorec cholesterolu, d) vzorec β -sitosterolu

Všechny tyto třídy mají jednu společnou vlastnost: jsou amfipatické, tzn. že obsahují část polární a nepolární. Tato skutečnost vede k jejich charakteristickému umístění v biomembránách. Lipidy v biomembráně jsou organizovány jako bimolekulární film, v němž jsou polární hlavičky exponovány do vnějšího vodného prostředí a nepolární části uzavřeny v jádře biomembrány, při čemž tvoří tzv. dvojnou vrstvu. Ta se však může přechodně zhroutit a přejít na jiný typ struktury. Dvojná vrstva je z hlediska krystalografického útvaru lamelární a označuje se L (Obr. 2a). Při vysokých teplotách a nízkém obsahu vody vznikají fáze odlišné, jako fáze pravoúhlá P (Obr. 2b), krychlová Q (Obr. 2c) nebo hexagonální H (Obr. 2d).



Obr. 2. a) lamelární krystalická struktura, b) pravoúhlá fáze, c) krychlová fáze, d) hexagonální fáze

Dvojná vrstva je termodynamicky velice stálá a nejhospodárnější vzhledem k množství použitého materiálu potřebného pro vytvoření určité plochy. Molekuly lipidů jsou směřovány v každé monovrstvě do určité hustoty, která závisí na tlaku a hlavně na teplotě, neboť teplota se pohybuje v širokém rozmezí a podstatně ovlivňuje uspořádání lipidů v biomembránách. Tloušťka čisté dvojně vrstvy fosfolipidů bez proteinů se pohybuje mezi 4 až 5 nm (Obr. 3). [5]



Obr. 3. Schéma dvojně lipidové vrstvy se záporně a kladně nabitými fosfolipidy a steorolem. Rozměry jsou udány v nm.

Polární lipidy mají protáhlou až tyčinkovitou formu se dvěma konci. Na jednom konci jsou polární nebo iontové funkční skupiny (hlavička lipidů), ke kterým může být vestavěn zbytek kyseliny fosforečné a označují se souhrnně fosfolipidy. Fosfolipidy obsahují vedle negativního náboje kyseliny fosforečné kladný náboj aminobáze a jsou elektricky neutrální. Jiné fosfolipidy mají negativní náboj kyseliny fosfatidové. Druhý konec molekuly lipidů je nepolární (chvost lipidů).

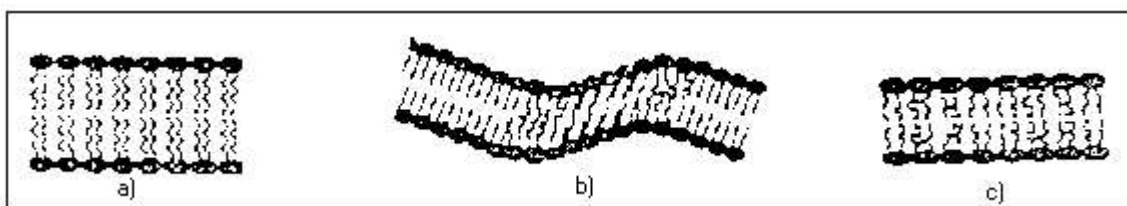
Rozpustné sloučeniny biomembránových lipidů mají schopnost vytvářet ve vodném prostředí uspořádané útvary složené z většího počtu lipidových molekul. Tyto útvary vznikají vždy až při kritické micelární koncentraci $10^{-9} - 10^{-10}$ mol/l. V závislosti na teplotě

mohou mít útvary formu micel, hexagonálních struktur, lamel, nebo formu gelu. Typ a forma útvarů závisí dále na chemické struktuře amfipatické sloučeniny, na velikosti hlavičky a chvostu a na vlastnostech prostředí (pH, iontové složení). Fyzikální charakteristikou, která ovlivňuje útvary je poměr chvostu lipidu k ploše hlavičky. Pro většinu biomembránových lipidů je tento poměr blízký 1. Proto přednostně vznikají vícevrstevné struktury, v nichž jsou dvojvrstvy lipidů uloženy v pravidelných vzdálenostech od sebe, oddělené vrstvami rozpouštědla. Periodičnost vzdáleností vyplývá z konstantní tloušťky jednotlivých vrstev a z tloušťky vrstvy vodného rozpouštědla.

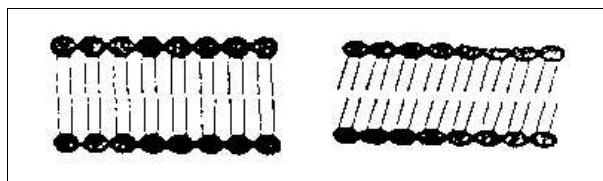
Při nízkých teplotách jsou molekuly amfipatických sloučenin uspořádány v krystalech. Se zvyšováním teploty může dojít ještě v oblasti teplot, kdy je amfifil v pevném skupenství k méně zřetelným změnám, jako změny úhlů, které svírají chvosty fosfolipidů s povrchem krystalů. Při dosažení kritické teploty přechází amfifil ze skupenství pevného do skupenství kapalného. Dochází k tání v oblastech hydrofobních řetězců a rozvolňuje se i struktura v oblasti hlaviček. Tato struktura se však nerozvolňuje zcela, takže amfifil se nestává kapalinou, nýbrž tekutým krystalem. Vznik a existence termotropních forem závisí na počtu a délce uhlovodíkových řetězců, počtu dvojných vazeb, na velikosti hlaviček a na tom zda jde o čistý amfifil nebo obsahuje příměsy. Při hlavním fázovém přechodu se mění některé důležité parametry jako zkracování řetězců, vzrůstající plocha a objem amfifilu a vzrůstající pohyblivost molekul. Molekuly vody při tání nepolárních částí pronikají do okolí hlaviček, kde se organizují v hydratačních obalech, oslabují vzájemnou interakci mezi hlavičkami a výrazně snižují teplotu přechodu. Pokud systém ochlazujeme, vzniká krystalová mřížka a z hydratační vrstvy se vytvoří gel. Voda se v blízkosti fosfolipidové hlavičky orientuje iontově-dipólovými interakcemi k záporně nabitému zbytku kyseliny fosforečné, kladně nabitě skupině s dusíkem, ke karboxylové skupině, případně –OH skupině. Optimální hydratace dvojvrstev lipidů biomembrán je 0,2 – 0,3. Molekuly vody jsou zde vázány pevněji než v krystalové mřížce - ledu. Voda má v blízkosti povrchu změněné vlastnosti; netuhne při 0°C. Následkem negativně nabitého povrchu dvojvrstvy, způsobeného přebytkem záporných nábojů, se na rozhraní mezi vodou a dvojvrstvou vytváří potenciální spád. Intenzita elektrického pole klesá se vzdáleností od povrchu dvojvrstvy. Jsou-li v blízkosti soli, vytváří se v okolí elektrická dvojvrstva. Nejsou-li v přítomnosti soli, kompenzují se negativní náboje protony. Hodnota pH se proto v blízkosti dvojvrstvy odlišuje od hodnoty pH ostatního prostředí. [4]

S teplotou se mění stav lipidů v dvojně či lamelární vrstvě velmi výrazně – biomembrána prochází řadou mezomorfózních stavů, které mají svá označení. Při velmi nízké teplotě jde

o stav L_c (Obr. 4a), se stoupající teplotou projde dvojná vrstva do gelového stavu L_β nebo $L_{\beta'}$ (Obr. 5). V mezomorfním stavu L_β jsou acylové řetězce postaveny kolmo k ploše biomembrány, ve stavu $L_{\beta'}$, který je obvyklejší, svírají řetězce s biomembránou menší úhel než pravý. S dále se zvyšující teplotou okolo 305 K se stav $L_{\beta'}$ změní na $P_{\beta'}$ (Obr. 4b), tzv. zvlněný. Toto je pochod velmi pomalý s poločasem okolo 10 minut. Konečně při 315 K nastane hlavní přechod na formu L_α (Obr. 4c), tedy lamelární kapalnou. Nad touto teplotou teprve řádně probíhají všechny fyziologické funkce biomembrán. Zatímco ve formách L_c a L_β je pohyblivost alkylových řetězců v lipidech malá, ve formě L_α se zvýší velmi výrazně zejména díky tvorbě tzv. rotamerů, kdy se vazba C-C v alkylovém řetězci otočí o 120° a dojde tak k přechodu z konfigurace *trans* do konfigurace *gauche*. Tento přechod je obvykle provázen opačnou rotací *gauche* → *trans* o dva atomy C v řetězci dále. Tím se sice srovná původní směr alkylového řetězce, ale vzniká tak kapsa mezi řetězci sousedními.



Obr. 4. a) stav L_c , b) zvlněný stav $P_{\beta'}$, c) lamelární kapalný stav L_α



Obr. 5. Gelový stav $L_{\beta'}$

Přechod z krystalické či gelové fáze L_β do tekuté (kapalně krystalické) fáze L_α závisí na složení a charakteru biomembránových lipidů jako je délka řetězce, stupeň nasycení, poloha dvojná vazba, druh polární hlavičky a pH prostředí. Tyto vlivy vyplývají z hodnot teploty přechodu. V gelové fázi pod teplotou přechodu obsahuje biomembrána defekty v pravidelné krystalové mřížce, jejichž počet se zvyšuje se stoupající teplotou. Plochy s větším počtem těchto defektů budou tát rychleji a tak vznikají v biomembráně domény obou fází. Při přibližování k teplotě přechodu zdola, se ostrůvky tekutého lipidu budou rozšiřovat v moři krystalické fáze. Při opačném přibližování budou ostrůvky krystalického lipidu plout v moři tekutého lipidu. O těchto doménách se předpokládá, že mají v průměru 10 – 20 nm a že tedy obsahují stovky molekul lipidů. Ostrůvky fáze L_α v moři fáze L_β nebo ostrůvky L_β v moři L_α jsou obklopeny tzv. mezifázovým lipidem zhruba dvě molekuly tlustým, v němž neprevládá

ani jedna z uvedených fází. Jsou to oblasti s vysokým obsahem energie jak enthalpické tak entropické.

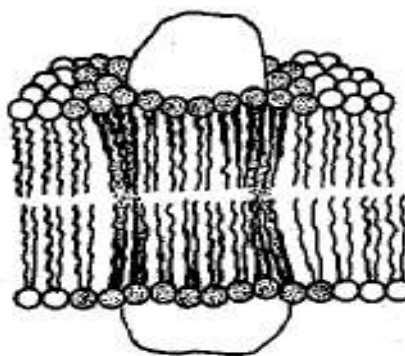
Steroly mají kratší molekuly (2nm), což vede k tomu, že molekuly glycerolipidů a sfingolipidů, které sterol obklopují, nemají dostatek prostoru k provedení změny konfigurace *trans* → *gauche*. Nad to při tuhnutí pohyblivých lipidů v biomembráně zůstávají molekuly sterolů na svém místě, takže okolní fosfolipidy nemohou vytvořit mřížku. Tyto vlivy způsobují, že v biomembránách bohatých cholesterolem nedochází k měřitelnému přechodu z fáze L_α na L_β a zpět.

1.2 Proteiny

Proteiny v biomembránách dělíme na dva druhy a to periferní a integrální. Periferní proteiny jsou ty, které lze z biomembrány snadno extrahovat. Jsou k biomembráně vázány elektrostatickými interakcemi a vodíkovými můstky, které lze v polárním rozpouštědle rozrušit změnou iontové síly nebo pH. Proteiny integrální vyžadují ke svému uvolnění z biomembrány přítomnost nepolárních rozpouštědel a nebo povrchově aktivních látek. Tyto proteiny mají ve svém polypeptidovém řetězci alespoň jednu nepolární část, kterou se zanořují do lipidové dvojvrstvy. Takto zakotvené lemují buď povrch biomembránové lipidové dvojvrstvy obrácený do cytoplazmy nebo směrem k vnějšímu prostředí.

V některých biomembránách se vyskytují desítky až stovky různých proteinů, v jiných je výběr mnohem chudší a některý protein tam může výrazně převažovat jako například přenašeč ADP/ATP v mitochondriální biomembráně představuje 12 % celkových proteinů biomembrány. [5]

Fosfolipidy v okolí proteinů jsou vystavěny odlišným interakcím od interakcí lipidů. Proteiny se dotýkají obou částí lipidů, nepolárních hlaviček i polárních chvostů, jejichž konfigurace je z velké části deformována a znehybněna. Proteiny zmrazují molekuly lipidů v určitých polohách a konformacích připomínající cholesterol. Díky složitější pohyblivosti proteinů a jejich speciálním funkcím jsou vztahy mezi proteiny a lipidy značně komplikované (Obr. 6). Integrální proteiny jsou i pod teplotou fázového přechodu obklopeny prstencem lipidů, které jsou tekuté a zaručují tak určitou aktivitu proteinů i v krystalickém stavu biomembrány a výrazně ovlivňují teplotu fázového přechodu, zejména v místech vysoké koncentrace.



Obr. 6. Schéma lipidového okolí
integrálního proteinu

Biomembránové proteiny vykazují analogicky jako biomembránové lipidy, ale ještě v pestřejším výběru, řadu pohybů. Rotační pohyby s korelačními časy mezi 0,1 – 10 ns napomáhají překonávat bariéru aktivační energie při konformačních změnách. Dalším pohybem vyskytujícím se prakticky u všech proteinů je kmitání segmentů molekuly. Jen málo proteinů je tak rigidních, že nepodléhají žádnému pohybu (tzn., že by vyžadovaly energii větší než 100 KJ/mol, aby k takovému pohybu mohlo dojít). Frekvence kmitání jednotlivých zbytků aminokyselin u proteinů se pohybují v rozmezí od 10 do 10^7 za sekundu, zatímco celé segmenty se pohybují s frekvencemi od 1 do 10^6 ze sekundu. Proteiny v biomembránách rotují kolem osy kolmé k rovině biomembrány. Tady se uplatňuje nejen velikost molekuly, ale zejména její interakce s okolními složkami biomembrány, ať lipidy nebo dalšími proteiny. Proteiny podléhají laterální difúzi a pro její popis se používá výrazu

$$D_L = (k_B T / 4\pi\eta h / [\log(\eta h / \eta_w r) - \gamma]) \quad (0)$$

kde h je výška molekuly, r je její poloměr, γ je Eulerova konstanta rovná 0,57722. Hodnoty difúzního koeficientu prudce klesají pod teplotou fázového přechodu a jsou mnohem nižší než teoreticky vypočítané. Je známo, že některé proteiny lokalizované v určité části biomembrány tam zůstávají po celou dobu života buněk. Tato menší nebo nulová pohyblivost je dána shlukováním proteinů v ploše biomembrány.

Sacharidové komponenty připojené na biomembrány jsou vázány v glykolipidech nebo glykoproteinech. Glykolipidy mají na rozdíl od glykoproteinů jen jediný sacharidový řetězec, který je k nim vázáný O-glykosidovou nebo N-glykosidovou vazbou. Sacharidové komponenty obsahují významnou biologickou informaci. Tato informace, na rozdíl od informace obsažené v polypeptidech není kódována genetickým aparátem buňky přímo, nýbrž nepřímo. Sacharidové komponenty biomembrán mají význam, pro pohyblivost

biomembránových buněk, příjem signálů, vzájemné poznávání buněk a slouží jako mezibuněčný tmel.

2 MOLEKULOVÁ STAVBA BIOMEMBRÁN

Ze schopnosti polárních lipidů tvořit ve vodném okolí dvojvrstvy vyplývá základní a funkční rys biomembrán, totiž být rozhraním mezi dvěma prostředími. Dvojvrstva je pro mnohé látky difúzní bariérou. Rychlost difúze dvojvrstvou z jedné strany na druhou je $10^6 - 10^9$ krát nižší než ve vodě.

Přesto jsou molekuly a dokonce i ionty, které dvojvrstvou procházejí poměrně snadno, patří mezi ně i voda. Vodivost klesá téměř 10^3 krát, jestliže dvojvrstva přejde do stavu gelu (snížením teploty nebo vlivem iontů). Naopak vodivost je daleko vyšší, jsou-li v ní obsaženy proteiny. Biomembrány mají elektrický odpor $10^7 \Omega \cdot m^{-2}$, což zřejmě souvisí s přítomností proteinů v nich. Kromě rozdílů potenciálů (řádově 10^2 mV/10 nm), existujícího na biomembránách se může ustavit i gradient teplot napříč biomembránou ($0,01^\circ C/10$ nm). Biomembránová dvojvrstva lipidů je ve fyziologických podmínkách kapalná (tekutý krystal) a do tohoto podkladu jsou vnořeny molekuly proteinů jako střípky mozaiky. Protože proteiny nezaujímají celou plochu povrchu dvojvrstvy, bývají přirovnány k plovoucím ledovcům nebo pohyblivým ostrovům v moři.

Každá molekulová komponenta vykonává kromě svých vnitřních pohybů ještě další pohyby jako celek. Je to *postupný dvojrozměrný pohyb* v ploše biomembrány (laterální pohyb) a to buď Brownovým pohybem nebo difúzí s koeficientem difúze 10^{-12} (lipidy) – 10^{-14} (proteiny) $m^2 \cdot s^{-1}$. Molekula lipidu mění v tekuté vrstvě sousedy asi 10^{16} krát za sekundu. Molekuly proteinů se pohybují pomaleji, ale mohou vykonávat i rychlejší usměrněné pohyby, specifické vzhledem k druhu molekuly. Pohyby proteinových molekul jednoho druhu nemusejí mít vliv na polohu a pohyby jiných biomembránových proteinů. Laterální pohyblivost některých proteinů je silně omezena. Další *postupný jednorozměrný svislý pohyb* v ose kolmé na povrch biomembrány (vertikální pohyb) je závislý na změnách tekutosti biomembrány. I když tyto pohyby mají jen malý rozsah, mohou být významné pro některé biomembránové funkce (transport, přenos signálu). *Rotační pohyb* kolem vertikální osy, kolmé k povrchu biomembrány je relativně rychlý. Doby rotace jednotlivých biomembránových proteinů se od sebe výrazně liší a odrážejí rozdíly ve viskozitě molekulového okolí. Rotační pohyby kolem os, jdoucích v rovině biomembrány, jsou zpravidla neúplnými kývavými pohyby. Pohyblivost biomembránových komponentů mohou být omezena obklopením lipidovými poli a uzavřeny v nich nebo z nich naopak vyloučeny, vazbou ligandů na vnější nebo vnitřní povrch biomembrány a kolizemi molekul proteinu s jinými proteiny.

Biomembrána je mozaikou a to v několikerém smyslu. Jde o mozaiku proteinů v lipidech – větší nebo menší plochy lipidů se střídají s políčky zaujímanými proteiny. Biomembránové

proteiny mohou být rozptýleny, nebo naopak zkondenzovány do hustoty kolem 10^{16} molekul $\cdot \text{m}^{-2}$. Za druhé jde o mozaiku lipidů v lipidech. V jedné biomembráně může vedle sebe koexistovat více než sto různých lipidových sloučenin. Poměr v jakém jsou přítomny, je specifický pro každý biomembránový typ. Mohou být i přítomna políčka lišící se mezi sebou zastoupením jednotlivých druhů lipidů, a proto i svými fyzikálně chemickými vlastnostmi a způsobem uspořádání. Za třetí lze hovořit i o mozaikovém uspořádání proteinové složky – biomembránové proteiny určitého typu mohou být s jinými promýchány anebo se mohou v určitém místě separovat.

Biomembrány mají asymetrickou strukturu, tedy jiné lipidové a proteinové složení. Díky různým strukturám a nábojům fosfolipidových hlavic a díky různému rozložení uhlovodíkových řetězců a dvojných vazeb ve vrstvách lipidového filmu mají oba povrchy dvojvrstvy různou kompaktnost, pohyblivost a elektrické charakteristiky. Asymetrie lipidů je méně výrazná než asymetrie proteinů. Lipidové vrstvy se liší spíše kvantitativně než kvalitativně. V místech, kde dochází k zprohýbání biomembrán, vznikají předpoklady pro přerozdělení lipidových komponentů v ploše biomembrány a pro zesílení asymetrie biomembrány. Mohou se vytvářet okrsky se specifickými vlastnostmi. Je pravděpodobné, že přechodnými strukturami jsou fáze kubického a hexagonálního uspořádání. Vlastnosti dvojvrstvy podstatně mění vnitřní tlak a brání průniku amfipatických sloučenin do ní. Jeho zdrojem jsou integrální proteiny, které organizují lipidy dosti daleko ve svém okolí. Biomembrány považované za dvourozměrné roztoky proteinů a lipidů, jsou roztoky silně ideální.

3 FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI BIOMEMBRÁN

3.1 Biomembránová mikroviskozita a mikrofluidita

Biomembránová mikroviskozita a její převrácená hodnota mikrofluidita průměrují anizotropní vlastnosti biomembrány a určují snadnost, s jakou se jednotlivé molekuly v biomembráně budou pohybovat. Korelační čas rotace kulové částice, který je nepřímo úměrný rychlosti rotačního pohybu, je definován jako

$$\tau_c = 4 \pi r^3 \mu / 3 k_B T \quad (0)$$

Tyto hodnoty se mohou lišit. Například mastné kyseliny v dvojité biomembráně blízko glycerolu nebo ethanolaminu mají korelační časy okolo 10 ns, zatímco hlouběji v membráně budou hodnoty τ_c okolo 12 ps. [4]

Biomembránovou viskozitu lze ovlivnit teplotou podle rovnice

$$\eta = \eta_0 \exp (E_a / RT) \quad (0)$$

kde E_a je aktivační energie proudění potřebná pro tvorbu volného objemu, tedy pro pohyb molekuly z celkové kapaliny. V typické živočišné biomembráně se její hodnota pohybuje okolo 30 KJ/mol, v rostlinných biomembránách je to 15 KJ/mol. Hodnota η v živočišné fosfolipidové biomembráně s asi 25% cholesterolu bude 0,7 Pa.s při 15°C a 0,13 Pa.s při 40°C. Mikroviskozita je ovlivněna i tlakem, při čemž kompresibilita biomembrány je prudce zvýšena při fázovém přechodu. Tlak může navodit fázový přechod stejně jako teplota. Ekvivalence teploty a tlaku, způsobující takový fázový přechod, činí 0,2 : 1 KPa. Biomembránovou fluiditu lze ovlivnit též interakcemi s vnějšími proteiny, působením různých metabolických procesů a aplikací činidel. Fluidita se zvyšuje vazbou acetylcholinu, nikotinu, adrenokortikotropního hormonu, ale snižuje se insulinem, serotoninem, lymfocyt aktivujícím faktorem a fibrinogenem.

3.2 Biomembránový pořádek

Biomembránový pořádek je pojmem související s organizací lipidů co do jejich pravidelnosti. Týká se submikroskopických odchylek od krystalického uspořádání lipidu, tak jak k nim dochází při teplotách pod fázovým přechodem. Dokonalý pořádek biomembrány odpovídá parametru pořádku S rovnému jedné. V situaci dokonale izotropní biomembrány je parametr pořádku roven nule. Jestliže jsou všechny řetězce zcela náhodně rozloženy pod pravým úhlem k rovině biomembrány, $S = -0,5$. Molekulový parametr

pořádku v dané poloze alkylového řetězce je definován jako $S = 0,5 (3 \cos^2\beta_i - 1)$, kde $\cos^2\beta_i$ je časově zprůměrovaná hodnota úhlových fluktuací úseku alkylového řetězce vzhledem k ose kolmé na rovinu biomembrány. Parametr pořádku lze stanovit jako elektron-spinovou rezonancí tak jaderně magnetickou rezonancí v různých hloubkách dvojné vrstvy. Obvykle má hodnoty vyšší blízko polárních částí molekuly a klesá prakticky k nule uvnitř biomembrány. Je tu tedy gradient pohyblivosti od biomembránového povrchu k biomembránovému středu. Protože parametr pořádku odráží flexibilitu určité části molekuly tím, že průměruje odchylky od anizotropie v prostoru a nikoliv v čase, nemusí poskytovat přesné údaje o fluiditě, která se mění kvalitativně stejně jako opak pořádku. Parametr S má vztah jak k ploše lipidové molekuly tak k délce alkylového řetězce lipidu, přičemž se snižuje s rostoucí plochou. Lze tu použít vztahu

$$Z = l / l_0 \quad (0)$$

kde l je skutečná délka alkylového řetězce a l_0 jeho maximální délka, jsou-li vazby v konfiguraci trans.

3.3 Elektrostatické vlastnosti

Elektrostatické vlastnosti biomembrán jsou značné, neboť všechny biomembrány nesou na svém povrchu elektrický náboj o velikosti $1 - 100 \text{ mC/m}^2$. Náboj je převážně negativní, odpovídající přibližně $10^7 - 10^8$ aniontovým skupinám a $10^6 - 10^7$ kationtovým skupinám na průměrnou živočišnou buňku. Tento náboj má velmi podstatný význam pro řadu biomembránových vlastností a funkcí, zejména pro pohyb iontů, protože vede k akumulaci iontů různého znaménka ve vrstvách kolem biomembrány. Negativní povrchový náboj o hustotě σ přitahuje kladně nabitě ionty z roztoku a tvoří s nimi tzv. *adsorpční vrstvu*. Kromě toho se v blízkém okolí tvoří tzv. *difúzní vrstva*, která je obohacena ionty opačného znaménka. Celá tato *elektrická dvojvrstva* (zvaná vrstva Gouya a Chapmana) mívá tloušťku okolo $1 - 2 \text{ nm}$, podle iontové síly roztoku. Nerovnoměrné rozložení iontů v okolí buňky dává pak vznik povrchovému potenciálu Ψ_p , jenž je přímo závislý na σ takto

$$\Psi_p = 4\pi\sigma_r / \varepsilon (1 + r / k) \quad (0)$$

kde ε je permitivita roztoku, r je poloměr buňky a k je tloušťka elektrické dvojvrstvy kolem buňky. Povrchový potenciál je veličina statická a nesmí se zaměňovat s transbiomembránovým elektrickým potenciálem Φ , který je způsoben pohybem

elektricky nabitých částic přes biomembránu. Koncentrace iontu při biomembráně $C_{s,m}$ je vztažené ke koncentraci v celém roztoku $C_{s,B}$ takto

$$C_{s,m} = C_{s,B} \exp(-nF\psi_p / RT) = C_{s,B} y^n \quad (0)$$

Zásadně platí, že pro negativně nabitě povrchy $y > 1$. Z toho plyne, že v rovnicích pro rychlost transportu iontů i pro ionty poháněných neelektrolytů je třeba analytickou koncentraci iontu nahradit výrazem z poslední rovnice.

3.4 Biomembránová kapacita

Biomembránová kapacita C_m (F/m^2) se skládá ze tří složek, dvou kapacit obou mezifázových oblastí $C_{s,1}$ a $C_{s,2}$ a z vnitřní kapacity biomembrány takto

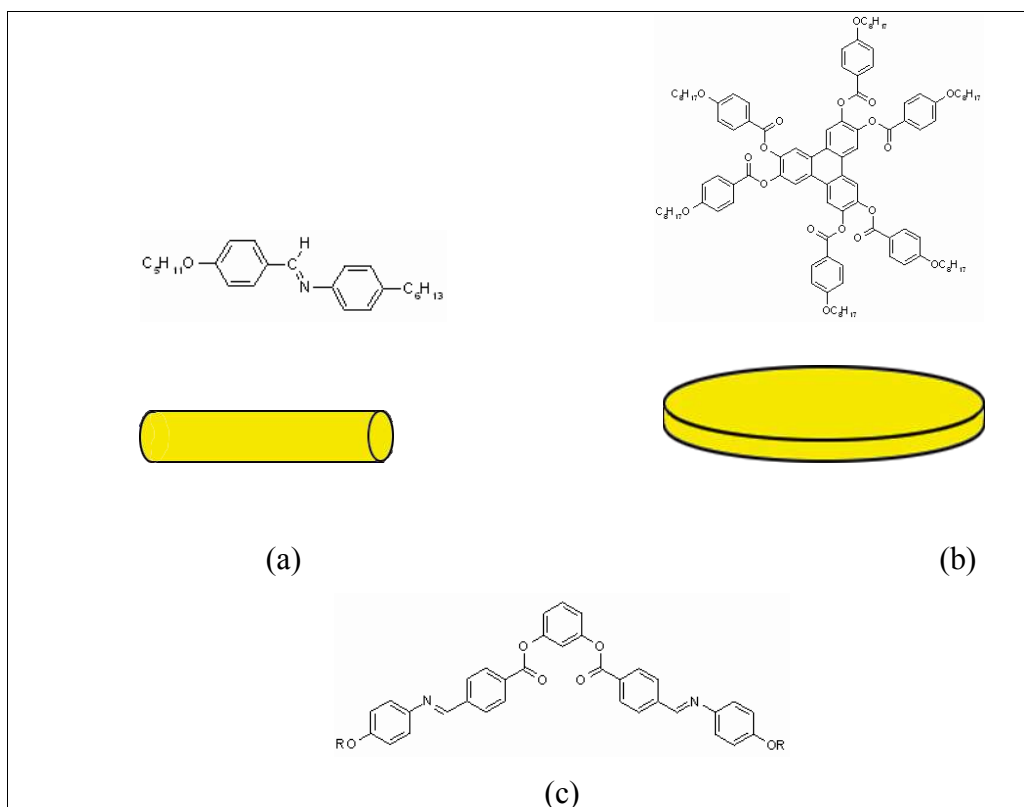
$$1/C_m = 1/C_{s,1} + 1/C_{s,2} + 1/C_i \quad (0)$$

Povrchový náboj biomembrány se určuje měřením elektroforetické pohyblivosti liposomů nebo jednotlivých buněk, stanovením vodivosti dvojných lipidových biomembrán v přítomnosti ionoforů nebo hydrofobních iontů, nebo změnou transbiomembránového elektrického pole a měřením rychlosti transportu hydrofobních iontů. [3]

4 BIOMEMBRÁNY JAKO KAPALNĚ KRYSTALICKÉ LÁTKY

Předpokladem pro vývoj života a funkční schopnosti buněk jsou jako nejvýše samoorganizující orientovaný systém termotropní a lyotropní kapalné krystaly, které mají některé vlastnosti kapalin (tečení s poměrně malou viskozitou) a některé vlastnosti připomínající pevné látky (orientační uspořádání). [2]

Základním předpokladem pro vznik **termotropní** kapalně krystalické fáze je molekula s anisotropním tvarem. Jde tedy o takový tvar, kde je jeden z rozměrů molekuly výrazně odlišný od zbývajících dvou. Příkladem takových tvarů jsou tyčinka (Obr. 7a) a disk (Obr. 7b). Protože se vlastnosti kapalných krystalů obou typů výrazně liší, označují se obě skupiny odlišnými názvy. V prvním případě jde o tzv. *kalamitické*, v druhém případě o *diskotické* kapalně krystaly. V poslední době se do popředí zájmu dostávají kapalně krystaly *banánovitého tvaru* (Obr. 7c).



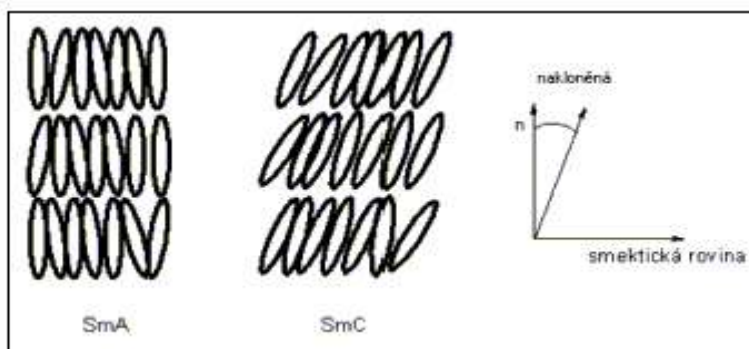
Obr. 7. a) Molekula tvaru tyčinky, b) molekula tvaru disku, c) molekula banánovitého tvaru

Jde o zvláštní modifikaci kalamitických kapalných krystalů, které vykazují odlišné vlastnosti (mají schopnost tvořit chirální fáze i bez přítomnosti chirálního prvku v molekule a zvýšenou schopnost tvořit antiferoelektrické fáze)

Kapalně krystalické fáze mohou mít několik různých uspořádání- *nematická (nematika)* a *smectická (smektika)* fáze. U jedné látky se mohou vyskytovat obě tyto fáze či pouze jedna. [6]

Nematikum se skládá z protáhlých molekul orientovaných jedním směrem. Orientaci molekul definuje tzv. *direktor*. Molekuly zaujímají orientační uspořádání a rotují kolem své osy. Tato rotace kompenzuje molekulární dipólové momenty. Nematika tečou ve všech třech směrech. Je-li látka tvořena chirálními molekulami vytvoří se spirálová struktura kolmá k direktoru označená jako *cholesterická*.

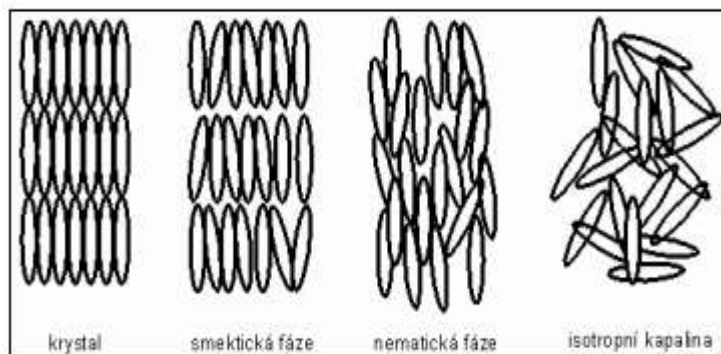
Smektika jsou tvořena protáhlými molekulami, které jsou uspořádány do vrstev. Vrstvy se po sobě pohybují, dochází k tečení v rovině. Viskozita je o něco větší než u nematické fáze. Jednu skupinu tvoří fáze s molekulami rovnoběžnými s normálou vrstev (ortogonální smektika), druhou skupinu molekuly svírající s normálou vrstev nenulový úhel - až 40° (smektika s nakloněnými molekulami). Smektika se rozdělují podle uspořádání ve vrstvách. V *SmA* a *SmC* nejsou těžiště molekul v jednotlivých vrstvách (Obr. 8). V *SmB* a *SmE* je ve vrstvách hexagonální a čtvercové uspořádání. V nakloněných *SmL*, *SmJ*, *SmG*, *SmH*, *SmK* je uspořádání hexagonální nebo čtvercové s náklonem molekul ke straně nebo k vrcholu šestiúhelníka nebo čtverce. U fází *SmJ*, *SmG*, *SmH*, *SmK* je navíc korelace na dlouhou vzdálenost. Je-li smectická fáze chirální, vzniká spirálová struktura.



Obr. 8. SmA a SmC vrstvy a nakloněná smectická rovina

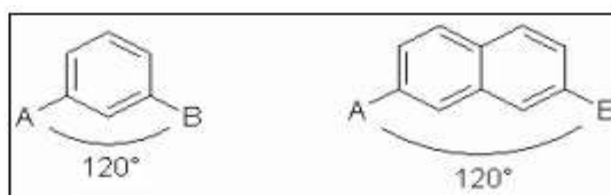
U **diskotických fází** se molekuly uspořádají do relativně tuhých sloupců, které pak vytváří kubické nebo hexagonální struktury. Vazba mezi sloupci je malá, takže sloupce po sobě volně kloužou. Tečení je tedy jednorozměrné. [2]

Pořadí fází mezi izotropní kapalinou a krystalem, jak se postupně objevují při chlazení, je dáno narůstáním stupně uspořádání a je platné pro všechny kapalně krystalické látky: *Isotropní fáze-N-SmA-SmC-SmI-SmF-SmB-SmJ-SmG-SmK-SmH-krystal*. Přičemž kterákoliv fáze může chybět.



Obr. 9. Uspořádání molekul v jednotlivých fázích

Kapalné krystaly banánovitého tvaru (bent-shaped) mají vyjímečné vlastnosti, které je činí zajímavými, mezi něž patří schopnost tvořit antiferoelektrické fáze i bez přítomnosti chirálního prvku v molekule. Pro geometrii kapalných krystalů banánovitého tvaru je důležitým prvkem rigidní jádro, kde ramena svírají úhel 120° . Nejčastěji se využívá jader odvozených od 1,3-substituovaného benzenu, popř. 2,7-disubstituovaného naftalenu (Obr.10).



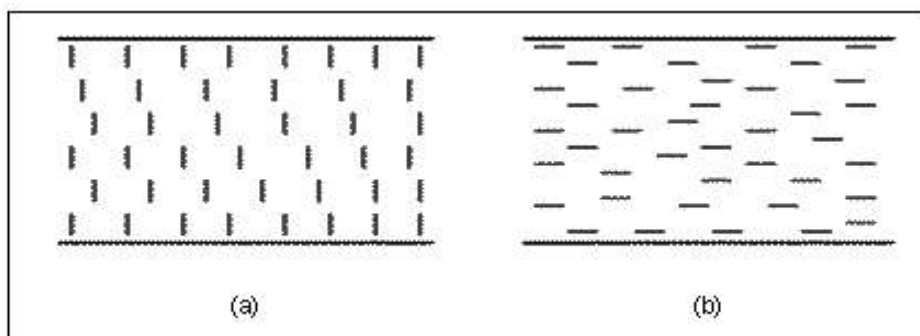
Obr. 10. Dva typy rigidních jader tvořící základ kapalných krystalů banánovitého tvaru

Pro označení různých fází se používá jak označení odvozené od kalamitických fází, tak i speciální označení BX, kde X je index fáze v pořadí v jakém byly objeveny. Tyto materiály slouží jako modelový systém pro biomembrány, pro napodobení biomembránových procesů a to hlavně pomocí kapalně krystalických polymerů.

Některé fáze se vyskytují v několika možných modifikacích jejichž identifikace je otázkou budoucího výzkumu. Pro dosažení tyčinkovitěho tvaru molekuly kalamitických kapalných krystalů je třeba, aby molekula obsahovala rigidní jádro, které podpoří požadovaný tvar. Pro jeho konstrukci se používají nejčastěji aromatické sloučeniny. Na konce molekuly jsou pak vázány flexibilní postranní řetězce. Jde o nenasycené či nasycené alkylové řetězce, které prodlužují tyčinkovitý tvar molekuly a snižují přechodové teploty. Pro snížení přechodové teploty se též užívají laterální substituenty (Cl, F), které jsou zaváděny do jádra. [6]

4.1 Fyzikální vlastnosti kapalně krystalických molekul

Strukturu kapalných krystalů lze snadno ovlivnit vnějšími poli i tvarem a vlastnostmi stěn nádob, ve kterých jsou umístěny. Povrchy skel jsou upraveny tak, aby se molekuly na nich uchytily definovaným způsobem a to buď dlouhou osou kolmou na povrch (*homeotropní kotvení*-Obr.11a) nebo dlouhou osou rovnoběžnou s určitým směrem na povrchu (*planární kotvení*-Obr.11b), anebo šikmo k povrchu pod definovaným úhlem. Uvnitř vzorku je pak možné uspořádání molekul ovlivnit ještě elektrickým a magnetickým polem.

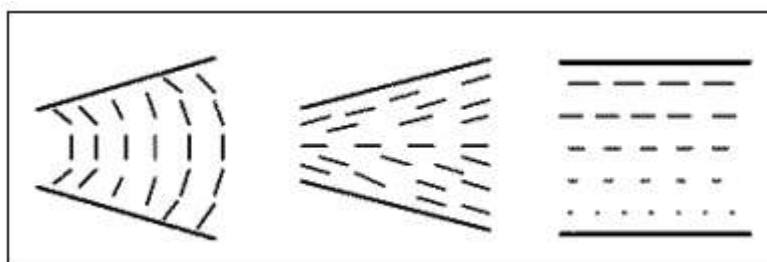


Obr. 11. Uspořádání molekul v a) homeotropním, (b) planárním vzorku

V kapalných krystalech stejně jako v kapalinách nelze vyvolat prostorově homogenní deformace. Mezi nehomogenní deformace lze zařadit *ohyb*, *rozevření* a *zkrut* (Obr. 12), důsledkem kterých může být i indukce náboje.

V důsledku nesymetrického tvaru molekul, který má za následek speciální rozložení v ohybu, vzniká *flexoelektrický jev*, který je nehomogenní analogií piezoelektrického jevu známého u pevných látek.

Následkem citlivosti kapalných krystalů na deformace je vznik četných poruch, které jsou pro ně typické. Poruchy vytvářejí textury charakteristické pro jednotlivé fáze, ty je pak možno podle textur identifikovat. Ve všech fázích lze pozorovat čárové poruchy zvané *disklinace* (poruchy v rotační symetrii). Vidíme je jako nitě (nejtypičtější pro nematiku, nemos-vlákno). Ve smektikách se dále vyskytují poruchy ve vrstevnatém uspořádání-*dislokace* a *fokální konika* u velkého zakřivení.



Obr. 12. Uspořádání molekul v základních deformacích

Interakce kapalných krystalů s elektrickým a magnetickým polem se dá popsat pomocí dielektrické a magnetické susceptibility. Dielektrická susceptibilita je působení elektrického pole na molekulární dipólové momenty, které se snaží uspořádat. Vlivem anizotropie struktury je podél střední dlouhé osy molekul X_z jiná, než ve směru kolmém X_k . Pro volnou energii pak platí vzorec

$$F_{el} = - \frac{1}{2} \varepsilon_a (E \cdot n)^2 \quad (0)$$

kde F_{el} je elektrická volná energie, E je interakce s elektrickým polem, ε_a vyjadřuje dielektrickou anizotropii a n značí direktor.

Dielektrická anizotropie může být kladná i záporná. Při kladné anizotropii se molekuly natačejí směrem do elektrického pole, při záporné se staví kolmo. Vždy dojde ke snížení elektrické energie. Magnetická susceptibilita většiny kapalných krystalů, κ , je záporná, to znamená, že jsou tzv. diamagnetické. Mikroskopický původ diamagnetické susceptibility je v delokalizaci protonů v benzenových jádrech. Magnetickou volnou energii lze vyjádřit vzorcem

$$F_m = - \frac{1}{2} \kappa_a (H \cdot n) \quad (0)$$

kde κ_a je magnetická anizotropie a H vyjadřuje interakci s magnetickým polem.

V případě, že je vzorek orientován do homeotropního nebo planárního uspořádání lze působením polí převrátit do uspořádání opačného. Chování se nazývá *Frederiksovův přechod*. Po vypnutí pole se molekuly vrátí zpět do původního uspořádání.

Lyotropní kapalně krystalické molekuly patří do skupiny látek nazývaných amfifilní směsi. Tyto směsi jsou charakteristické tzv. „rozštěpením osobnosti“ – kde jeden konec molekuly je polární a orientuje se k molekulám vody a druhý konec je nepolární, směřuje k hydrouhlíkatým molekulám. Molekuly se vzájemně umísťují tak, že buď polární konce jsou rozpuštěny v polárním rozpouštědle anebo nepolární konce v nepolárním rozpouštědle. Protější konec je od rozdílného rozpouštědla vždy izolován.

Při nízké koncentraci se může zdát, jakoby částice byly v prostředí rozloženy náhodně. Když však koncentrace dostatečně vzroste, molekuly se začnou vzájemně uspořádávat v micely. Povrch micel tvoří hydrofóbní vrstva polárních hlaviček rozpuštěných ve vodě a vnitřní část je od vody oddělena hydrofilními konci. Micely mají různé velikosti, avšak nejmenší z nich mají průměr dvakrát větší než je délka hydrouhlíkatých řetězců. S rostoucí koncentrací se micely zvětšují a jestliže dosáhnou patřičné velikosti, roztok se stane zakaleným, vzniká emulze.

Při zvyšující se koncentraci se micely začnou uspořádávat do vzorků – kapalných krystalů, formovaných do kubické krystalové mřížky. Koncentrace, při které se micely formují

v roztoku, se nazývá kritická micelární koncentrace a prokazuje se jako bodová čára, ze které pak vznikají lyotropní kapalné krystaly.

Jestliže je prostředí vody a hydrouhlíkatých řetězců smícháno dohromady, je možné, že dojde ke vzniku mikroemulze známou jako prstencovitý gel. Umístíme-li tento gel mezi vrstvy, které jsou krouceny, začne gel vibrovat se slyšitelnou rezonanční frekvencí.

Materiálem, který vysvětluje chování lyotropních kapalných krystalů je obyčejné mýdlo. Mýdlo pracuje lépe než čistá voda při odstraňování špíny a mastnoty, neboť nepolární vnitřní část micel je schopna rozpustit nepolární látky, které se nerozpouští ve vodě. Mýdlo tedy pomáhá vodě rozpouštět mnohem lépe, protože molekuly mají tendenci zůstat na povrchu, hydrouhlíkatou částí ven z vody a tak umožňují většině jiných látek vstoupit dovnitř a rozpustit se.

Lyotropní kapalné krystaly hrají nejdůležitější roli v biologických membránách. Biomembrány jsou tvořeny amfifilními lipidy – většinou fosfolipidy. Fosfolipidy mají dvě hydrouhlíkaté části, jednu nasycenou a jednu nenasycenou. Ačkoliv ještě nejsou biologické membrány důsledně prozkoumány, je obecně známo, že lipidy tvoří lyotropickou fázi, která je hlavní strukturou buňky biomembrány. Umístění proteinů v biomembránách je určeno hydrofóbními interakcemi a lyotropní fáze poskytuje kontakt s polárními konci řetězců potřebné pro řádnou funkci proteinů. [7]

Princip samoorganizace - vznik kapalně krystalické fáze v biomembránách - není výmyslem moderní vědy, ale hlavní myšlenkou již antické filosofie v Evropě a Asii, což vedlo později k objevení nových kapalně krystalických materiálů a ke snaze zkombinovat vlastnosti těchto dvou polí (kapaliny a pevné látky) a stimulovat jejich vzájemné interakce při používání a zpracování. Snižování hranice mezi buňkami a kapalnými krystaly hraje dnes důležitou roli. [8]

5 TRANSPORT BIOMEMBRÁNAMI

5.1 Prostá difúze

Termodynamický tok J neboli hustota transportního proudu vyjadřuje velikost transportního děje. Udává počet jednotek dané veličiny (hmoty, tepla, elektrického náboje, impulsu apod.), který za jednotku času přenese jednotkovou plochou, postavenou kolmo na směr pohybu veličiny. Závislost mezi tokem a silou udává vztah

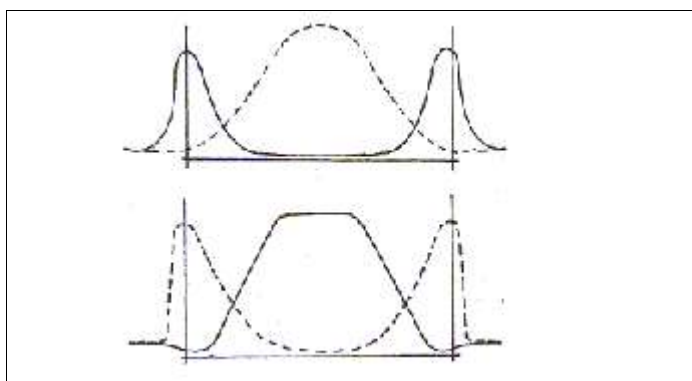
$$\mathbf{J}_i = \mathbf{L}_{ii} \mathbf{x}_i \quad (0)$$

V němž L_{ii} je tzv. fenomenologický koeficient spřahující tok J_i s jeho silou x_i .

Pro individuální částice a ani pro soubor částic neexistuje žádná speciální difúzní síla, která by částice poháněla ve směru spádu koncentrací nebo potenciálů. Difúze je výsledkem neuspořádaného Brownova pohybu částic nerovnoměrně rozdělených v prostoru. K difúznímu toku dochází pouze proto, že částice které se se stejnou pravděpodobností pohybují všemi směry, procházejí v jednom směru plochou, kolmou ke spádu chemických potenciálů, ve větším množství než ve směru opačném, neboť jsou na jedné straně této plochy zastoupeny ve větší hustotě než na druhé. Difúzní síla je vlastně definována negativně a to jako síla, která není, ale která by musela být přítomna, aby difúzní tok částic, nacházejících se v potenciálovém gradientu $d\mu/dx$, kde μ je chemický potenciál, byl roven nule. Látky, které procházejí biomembránou prostou difúzí, jsou takové, pro něž v biomembráně není žádná specifická komponenta, která by sprostředkovala jejich transport. Skupina volně difundujících látek je definována podmíněně – látky jsou sem seřazovány do té doby, dokud se u některé z nich nezjistí známky zprostředkovaného přenosu. Nespecifická schopnost látek vnikat do plasmatické biomembrány a pronikat jí, je charakterizována hodnotou rozdělovacího koeficientu vodného prostředí – lipidová biomembránová dvojvrstva. Rozdělovací koeficient k je konstanta, udávající poměr koncentrací látky A ve dvou nemísitelných fázích i a ii . Pro organické látky jako např. vícesytné karboxylové kyseliny, i pro malé anionty a kationty silných elektrolytů, je uvedený koeficient menší než 10^{-5} . Za předpokladu, že ion je v prostředí po stranách biomembrány přítomen v koncentracích je biomembrána pro takovou látku velmi málo propustná, stává se osmotickou bariérou. O prostupu látek biomembránou prostou difúzí rozhoduje vedle rozdělovacího koeficientu ještě druhý fyzikální parametr a to rozměr a tvar difundujících molekul (molární hmotnost M_r). Biomembrána se tedy chová jako síto dvojí povahy. První, když rozlišuje mezi látkami

podle jejich afinity k ní jako k nepolárnímu rozpouštědлу a vybírá molekuly podle hodnoty jejich rozdělovacího koeficientu. Druhé, když vybírá a omezuje pohyblivost molekul podle jejich velikosti, přičemž menší molekuly omezuje méně a větší více.

Znáznorníme-li biomembránu v souladu s vertikálním rozdělením fází modelem pěti vrstev (Obr. 13), pak obě povrchní vrstvy, které jsou tvořené poměrně volně pohyblivými polárními hlavičkami fosfolipidů, nepředstavují příliš velkou překážku propustnosti. Podpovrchové vrstvy tvořené uhlíky glycerolu, prvními uhlíky uhlovodíkových řetězců jsou těsně uspořádané, ale jejich rozdělovací vlastnosti, ještě zcela nejsou vzdáleny vodnému prostředí. Hlavním determinantem jejich propustnosti proto bude míra nutného přeorganizování určená rozměrem pronikajících částic. Tyto úseky biomembrány tedy budou místem odporu průniku molekul s velkými molárními hmotnostmi. Prostřední, pátá vrstva biomembrány tvořená poměrně volně pohyblivými koncovými úseky hydrofóbních uhlovodíkových řetězců, bude hlavní překážkou pro částice a to bez ohledu na jejich velikost.



Obr. 13. Biomembrána s vertikálním rozdělením fází

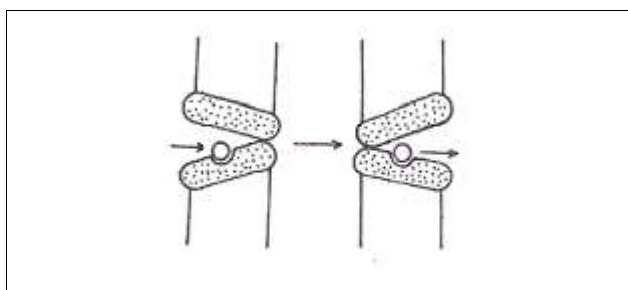
Prostá difúze biomembránou je závislá na teplotě. S rostoucí teplotou se zvyšuje hodnota aktivační energie, která má za následek rušení četných vazeb mezi biomembránovými komponenty v místech, kde částice pronikají. Vedle teploty ovlivňují propustnost biomembrán všechny další faktory, které mění fluiditu biomembrán, jako např. obsah cholesterolu. Cizorodé lipofilní látky jako alkohol a anestetika zvyšují neuspořádanost lipidových dvojvrstev, zvyšující nespecifickou prostou difúzi a zároveň snižují rychlost transportních procesů.

5.2 Sprostředkovaný transport

Tok biomembránou se za určitých podmínek v prostředí po obou stranách biomembrány může zvýšit a to zvětšením celkové plochy biomembrány, zvětšením gradientu $d\mu/dx$, tím,

že se zmenší difúzní dráha dx , otevřením póru v biomembráně a zvýšením koncentrace látky v biomembráně. Všechny uvedené mechanismy se spolu kombinují a jen zřídka lze jeden z nich oddělit od ostatních. Zprostředkovaný přenos má své charakteristické rysy. Přenos je rychlejší než lze předpokládat na základě M_r částic. Při nízkých koncentracích roste rychlost přenosu lineárně se zvětšováním spádu chemických potenciálů látky, při vyšších koncentracích – na rozdíl od prosté difúze – dochází k nasycení, tok dosahuje maximální velikosti a dále se nezvětšuje.

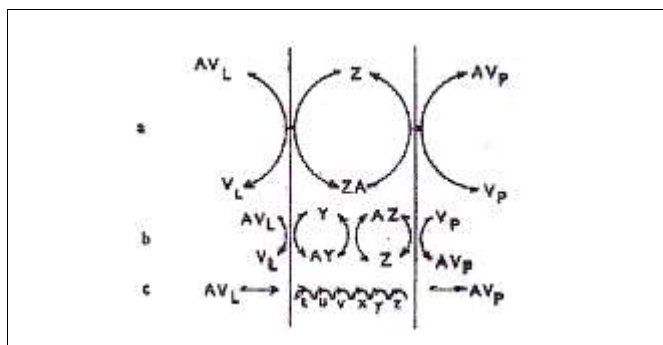
Zprostředkování transportu může provádět jeden cirkulující nosič anebo může jít o dva či více nosičů zařazených za sebou. Série většího počtu nosičů je ekvivalentní biomembránovému póru nebo kanálu. Katalyzátory přenosu se zařazují do jedné ze dvou skupin – mezi cirkulující nosiče nebo mezi póry. Cirkulující nosič stěží zprostředkuje přenos většího počtu částic než $10^4 - 10^5 \text{ s}^{-1}$. Póry a cirkulující nosiče se mohou v jednom transportním systému kombinovat v jeden složitější katalytický komplex. Pod cirkulujícím nosičem si není nutno představovat pouze molekulu schopnou přijmout transportovanou částici a difundovat s ní biomembránou. Nosič se při katalýze přenosu membránou nemusí vůbec translačně pohybovat jako celek. Stačí, jestliže transport látky bude provázen pohybem pouze částí nosiče. Jediné, co je nutné, je, aby v průběhu transportu došlo ke změně katalitického centra nosiče tak, aby se v centru uzavřel přístup z jedné strany biomembrány a otevřel se k němu přístup z druhé strany. Jedna část nosiče se tedy v průběhu transportu bude pohybovat vzhledem ke druhé. Přenos se uskuteční vazbou transportované částice do aktivního centra, následnými pohyby částí nosiče vůči sobě navzájem i vůči transportované částici a závěrečným uvolněním částice na opačné straně biomembrány. Jde o tzv. hrdlový mechanismus (Obr. 14)



Obr. 14. Hrubá představa hrdlového mechanismu

Ve zprostředkovaném transportu dochází k výměně vazebných interakcí. Katalyzátor (nosič) Z , který zprostředkovává přenos částice biomembránovou bariérou, tvoří s částicí A komplex ZA a musí nahradit její vazby k prostředí vazbami přibližně stejné energie.

Jestliže V vodné prostředí a L ukazuje, že jde o levou stranu biomembrány, pak probíhá na druhé straně biomembrány, P , opačný proces. (Obr. 15).



Obr. 15. Mechanismy zprostředkovaného přenosu

5.3 Usnadněná difúze

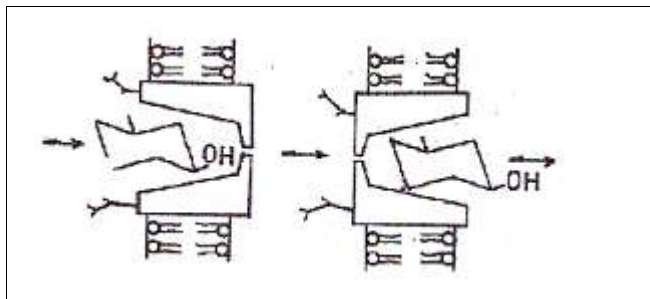
Usnadněná difúze je nejjednodušším zprostředkovaným transportním dějem. Jedná s o tok částic, vázaných na nosič J_A^Z , který se přičítá k toku částic pohybujících se napříč biomembránou volnou difúzí J_A^D . Odtud plyne rovnice

$$J_A^{D'} = J_A^D + J_A^Z \quad (0)$$

Substrát je stejně jako u prosté difúze transportovaný z místa svého vyššího chemického potenciálu do místa nižšího potenciálu až do vyrovnání potenciálů. Často lze pozorovat, že rychlost výměny substrátů v rovnovážných podmínkách je vyšší než rychlost toku částic jedním směrem v silně nerovnovážném uspořádání. Tento jev se vysvětluje skutečností, že obsazený nosič může cirkulovat rychleji než neobsazený. Může se také stát, že nosič se vůbec nevrátí na původní stranu biomembrány, dokud není obsazen.

Jako příklad usnadněné difúze lze uvést nosič D – glukosu. Glukosa je polární molekula a prochází hydrofobní dvojvrstvou biomembrán velmi obtížně. Do tkání savců, kteří mají v plasmě stálou koncentraci D – glukosu, se dostává usnadněnou difúzí. Nosič usnadněné difúze glukózy je přítomen v biomembránách tukových buněk, buněk nervové, jaterní a svalové tkáně. Zatím nejlépe prostudován je nosič plasmatických biomembrán lidských červených krvinek. Nosič glukosu je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem. Prostupuje celou tloušťku biomembrány, sahá z cytoplasmatické strany až na vnější povrch. Je pevně a přitom asymetricky zakotven. Nosič má pro glukosu pouze jedno aktivní místo. Vazebné místo je střídavě přístupné z vnějška nebo z nitra buňky. Oba stavy se vzájemně liší. Oblast vazebného místa, která je přístupná z vnějška, váže glukosu jejím C_1 koncem. Podoblast schopná přijímat glukózu z vnitřní strany biomembrány váže glukosu za její C_6 konec.

Podle toho proniká glukosa biomembránou orientovaná pólem C_1 dopředu. Přechod jednoho stavu nosiče ve druhý zřejmě zprostředkovává konformační změna. (Obr. 16)



Obr. 16. Nosič usnadněné difúze D-glukosy
biomembrán nepochárných buněk

5.4 Aktivní transport

Prostá difúze i usnadněná difúze jsou tzv. pasivní transportní děje. Spotřebává se při nich pouze energie samotných transportovaných částic. Je zřejmé, že těmito pochody, při nepřítomnosti vnějších sil, nelze dosáhnout akumulace látek na některé straně bariéry. Opakem pasivního transportu je aktivní transport. Aktivní transport se definuje jako pohyb látek proti jejich vlastnímu chemickému potenciálu. Děj je nezbytně zprostředkovaný a vyžaduje dodání energie. Vyskytuje se ve fotosyntetizujících a v heterotrofních organismech. Jako zdroj energie pro transport může být využit rozdíl mezi potenciály látek, které jsou v prostředí po obou stranách biomembrány anebo rozdíl potenciálů mezi výchozími látkami a produkty biochemické reakce. Transportní systém nemusí přijímat energii pouze z té strany biomembrány, kde nedochází k hromadění látky. Je-li energie pro akumulaci určité látky nebo iontu A na jedné straně bariéry dodávána z transportního děje jiné látky nebo iontu B, označujeme aktivní transport látky A jako sekundární aktivní. Z hlediska změn energie jde o tzv. osmotické energetické spřažení. Je-li energie dodávána z biochemické reakce, jde o primární aktivní transport látky nebo iontu A. Z hlediska změn energie jde v tomto případě o tzv. chemiosmotický typ spřažení.

5.5 Sekundární aktivní transport

Sekundární aktivní transportní děje můžeme popsat rovnicemi

$$J_A = L_{AA} X_A + L_{AB} X_B \quad (0)$$

$$J_B = L_{BA} X_A + L_{BB} X_B \quad (0)$$

Popis vychází z poznatku, že termodynamické toky bývají kromě závislosti na své konjugované síle závislé také na termodynamické síle jiného toku. Interakci obou toků charakterizují křížové fenomenologické koeficienty L_{AB} a L_{BA} , a platí vztah $L_{AB} = L_{BA}$.

Sekundární aktivní transport se dělí na *symport* a *antiport*. U *Symportu* je přenos jedné látky nebo iontu spřažen s přenosem jiné látky nebo iontu, přičemž mají oba spřažené toky stejný směr. Rovnováha se pro jeden druh částic ustavuje v závislosti na druhém. U *antiportu* se částice spolu spřažených toků pohybují biomembránou protisměrně. Rovnováha se opět ustavuje pro jeden druh částic v závislosti na druhém.

Kinetická schémata symportu a antiportu látek A a B, přenášených mezi fázemi na levé (L) a pravé (P) straně biomembrány. Látky jsou přenášeny nosičem Z v komplexech ZA, ZB a ZAB, které se pohybují s frikčními koeficienty f_{ZA} , f_{ZB} , a f_{ZAB} . K_A a K_B jsou konstanty disociace.

Je však možný také ping-pongový model symportu. Lze si představit, že energetická bariéra pro pohyb částice druhu A nosičem se liší od energetické bariéry druhu B. Nosič přijímá ve stavu I částici A pouze zleva a částici B pouze zprava. Ve stavu II je tomu opačně. Jestliže potom průchod částice A zleva zanechává nosič ve stavu II, může následně proběhnout přenos částice B – doprovázený návratem nosiče do stavu I - stejným směrem.

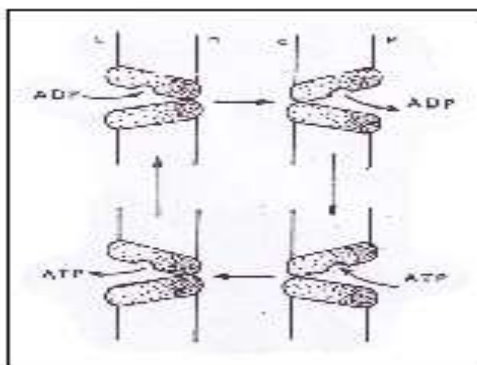
Dosud známé nosiče antiportu fungují pouze mechanismem ping-pong. Nosič ve stavu I má nízkou bariéru pro pohyb částice zleva doprava a zároveň vysokou bariéru pro pohyb částic opačným směrem. Ve stavu II je tomu obráceně. Nosič pracuje cyklicky tím způsobem, že částice A transportovaná zleva doprava zanechává nosič ve stavu II, který se zvrátí ve stav I teprve při transportu částice B zprava doleva. Lze očekávat, že spřažení toků bude vysoké, jestliže spontánní přechody $I \leftrightarrow II$ budou velmi pomalé.

Jako příklad symportu můžeme uvést nosič D-glukosy aktivovaný ionty Na^+ . Buňky, které se podílejí na vytváření výstelky některých orgánů, mají povrchovou biomembránu rozlišenou na dvě části. Jedna z nich lemuje buněčný povrch obrácený do dutiny orgánu, druhá navazuje na bocích buňky a ohraničuje buněčný povrch obrácený do nitra organismu. Taková buňka je rozčleněna na dvě strukturně i funkčně rozdílné části. Říkáme, že je polární. V její povrchové biomembráně jsou přítomny – na rozdíl od biomembrán nepolárních buněk – transportní systémy pro sekundární aktivní transport D-glukosy, které patří dosud k nejlépe prostudovaným systémům symportu. Nosiče sekundárního aktivního transportu glukosy katalizují symport glukosy s Na^+ ionty. Protože existuje rozdíl elektrochemických potenciálů iontů Na^+ mezi vnějším povrchem a nitrem buněk, může být tok sodíkových iontů zdrojem energie pro akumulaci sacharidu v buňce. Nosič proniká celou tloušťkou biomembrány. Asymetrické uložení je v souladu také s poznatkem o

biosyntéze biomembránových proteinů. Transportní systémy závislé na Na^+ jsou hojně rozšířeny v živočišné a rostlinné říši i mezi mikroorganismy.

Je důležité upozornit, že na biomembránovém potenciálu může být závislá nejen termodynamika, ale i kinetika (rychlost) přenosu látek v transportních dějích. Tato skutečnost se vyjadřuje označením transportu jako elektrogenního. Elektrogenní charakter zprostředkovaného přenosu lze vysvětlit buď tím, že elektrické pole působí na pohyb elektricky nabitého prázdného nosiče, nebo tím, že komplex nosič - látka nese nekompenzovaný náboj, anebo uplatněním obou zmíněných možností dohromady. Výsledkem elektrogenního transportu je vždy přenos elektrických nábojů biomembránou a změna biomembránového potenciálu.

Příkladem antiportu je nosič antiportu ADP a ATP (Obr. 17), který katalyzuje výměnu ADP za ATP na vnitřní biomembráně mitochondrií.



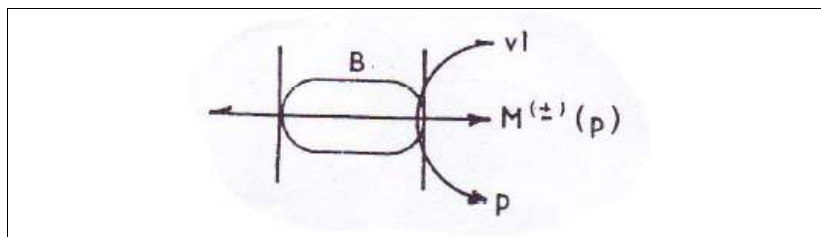
Obr. 17. Model činnosti nosiče

ADP/ATP-antiportu

Výměna se uskutečňuje se stechiometrií 1 : 1. V mitochondrii se tak udržuje konstantní zásoba ATP a ADP. Nosič je biomembránový lipoprotein. V srdečním svalu představuje nejčastěji se vyskytující protein vnitřní mitochondriální biomembrány. Je silně hydrofobní, prostupuje celou biomembránou a je v ní zakotven asymetricky. I zde má důležitou úlohu biomembránový potenciál. Je-li přítomen - uvnitř mitochondrie negativní – podporuje tok ADP směrem dovnitř a ATP směrem ven z mitochondrie.

5.6 Primární aktivní transport

V primárním aktivním transportu jde o spřažení transportního děje s chemickou reakcí. Rovnováha se ustavuje současně pro transportované částice a pro reaktanty (produkty) reakce (Obr. 18).



Obr. 18. Schematická představa primárního aktivního transportu

Popis primárního aktivního transportu je obdobný popisu sekundárního transportu. U obou těchto procesů není chápání chemických reakcí jako skalárních procesů úplné. K přeměnám látek v chemických reakcích dochází tím, že původní vnitřní molekulová vibrace podél určité chemické vazby přechází v translační pohyb chemické skupiny od jedné látky ke druhé. Pohyb skupin v chemických reakcích je tedy nezbytně vektorový.

Mechanismy primárního aktivního transportu dělíme na transport látek spojený s jejich enzymovou přeměnou, kde transportované látky jsou translokovány jako nestabilní a při průchodu biomembránou jsou chemicky modifikovány a na transport látek spojený s enzymovou reakcí. Transportované molekuly nebo ionty jsou samy po transportu – na rozdíl od předešlého mechanismu – přítomné v prostředích po stranách biomembrány v původním stavu, tj. chemicky nemodifikované. Ve skupinové translokaci jde o přenesení chemicky neúplných, poměrně nestálých částic, které snadno vytvářejí kovalentní vazby přes biomembrány v průběhu enzymového děje. Enzym nebo enzymový komplex je zakotven v biomembráně asymetricky a svým aktivním centrem vytváří pro průběh reakce anizotropní prostředí. Enzymový nosič má schopnost specificky vázat substráty, popř. uvolňovat produkty jen v určitém prostorovém směru anebo schopnost v prostoru specificky převést reaktanty a jejich reagující skupiny od jejich zdrojů na místa určení. Příkladem velmi významné skupinové translokace je translokace elementů vody, při nichž dochází k transbiomembránovým pohybům elementů molekulové struktury vody. Vzájemné uspořádání těchto reakcí může dát vznik gradientů protonů napříč biomembránou a jejich využití pro bioenergetické účely. Jsou podkladem základních bioenergetických pochodů jako fotosyntézy, buněčného dýchání a tvorby ATP. [4]

ZÁVĚR

Bioorganická chemie i biofyzika uvedla dosud modely biologických membrán a jejich funkcí, které jsou však velmi jednoduché a zatím dosti vzdálené reálným systémům. Přesto umožňují pochopit některé elementární procesy, které v biomembránách probíhají. Nabízí se otázka zda lze konstruovat systémy, které by stály na rozhraní mezi modelem a reálnou strukturou. Takovou možnost skýtá kombinace biomembrány a syntetických (polymerních) modelů. Lze přizpůsobovat syntetický model přirozenému systému a naopak. Takové biomembrány pak spojují výhody systému přirozeného a umělého, což by nacházelo velké uplatnění v medicíně a farmakologii. Nejnovější výzkumy upozorňují na důležitý prvek biomembrán a tím jsou nosiče. Nosiče slouží jako transformátoři substrátu, nervového vzruchu či genetických informací. Membránové receptory rozeznají molekulu chemického posla a stimulují procesy na druhé straně membrány. Mechanismy, jimiž je stimulace realizována, nejsou však dosud zcela známy. Aby umožňoval nosič rychlou výměnu informací, je třeba hledat struktury, jejichž vlastnosti by bylo možno měnit tak, aby bylo dosaženo žádoucího kompromisu mezi termodynamickými a kinetickými parametry. Proto je důležité znát velmi dobře strukturu a fyzikální vlastnosti biomembrán. [2]

Biomembrány nachází široké uplatnění také v kombinaci s biočipy. Dosud bylo obtížné připojit počítačový čip k živé buňce, neboť jsou příliš kluzké a amorfní. Proto se pro tato připojení využívají biomembrány, které slouží jako vrstva mezi buňkou a čipem. Pomocí krátkého elektrického pulsu se biomembrána přichytí na patřičné zakončení čipu, živé buňky se sami přichytí z druhé strany v domění, že se připojují k jiné živé buňce. Již nyní se dá výsledků výzkumu využít při laboratorních testech, biomembrána s biočipem je schopná detekovat rakovinné buňky nebo může dobře posloužit při testech HIV pozitivita. Na základě výzkumu biomembrán byl zkonstruován první čip se světelnými senzory, který umožňuje slepým pacientům rozpoznat zdroje světla a vnímat obrysy předmětů. Čip, který je situován v blízkosti očního nervu, vysílá směrem k nervu elektrické pulsy úměrné dopadajícímu světlu. Až bude možné připojit tento čip přímo na oční nerv, komunikace s nervem se ještělepší. Vědci dnes pracují na paměťovém čipu, který by byl schopen uchovávat lidské myšlenky a zkušenosti. Čip bude zaznamenávat smyslové pocity jako je vůně, obraz a zvuky a to ve formě neuronových pulsů, které bude možné později přehrát do počítače. Lidé tak budou schopni znovuprožívat vlastní zážitky nebo přenést svou paměť do mozku jiného člověka. Způsob využití biočipu s pomocí biomembrány na bázi znalosti DNA je detekce mutací a informací obsažených v genech. Na trhu je vyvinut biočip, který je schopen číst genetickou informaci a rozpoznat různé mutace. Odborníci na léčbu

rakoviny k tomu poznamenali, že tyto biočipy, monitorující tisíce genů najednou, mohou velmi dobře posloužit v boji proti rakovině a dalším geneticky podmíněným nemocím. Speciálně upravené biočipy dokáží vysledovat mutace ve virech způsobující AIDS.[9]

Pokroky v lékařské technologii nutně závisí na našem porozumění nejen detailů organismů jako jsou buňky a biomembrány, ale celkově žijícím systémům. Je proto nutné je prozkoumat a analyzovat do mnohem větších detailů, než bylo v minulosti možné. [3]

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] <http://mek.kosmo.cz>
- [2] <http://emf-9.fzu.cz>
- [3] Kodíček, M. ; Karpenko, V.: Biofyzikální chemie, Academia 1997-2000
- [4] Veselý, J.: Základy molekulární biofyziky II, Olomouc 1987
- [5] Kotyk, A.: Struktura a funkce biomembrán, PřF MU, Brno 1996
- [6] <http://uoch.vscht.cz>
- [7] <http://plc.cwru.edu>
- [8] Wiley, J.: About Wiley InterScience, Copyright 1999-2004
- [9] <http://www.fi.muni.cz>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADP	Adenosindifosfát (difosforečnan)
ATP	Adenosintrifosfát (trifosforečnan)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina

SEZNAM OBRÁZKŮ

OBR. 1. A) OBECNÝ VZOREC GLYCEROLIPIDŮ, B) OBECNÝ VZOREC SFINGOLIPIDŮ,.....	8
OBR. 2. A) LAMELÁRNÍ KRYSTALICKÁ STUKTURA, B) PRAVOÚHLÁ FÁZE,C) KRYCHLOVÁ FÁZE,	9
OBR. 3. SCHÉMA DVOJNÉ LIPIDOVÉ VRSTVY.....	9
OBR. 4. A) STAV LC, B) ZVLNĚNÝ STAV P β ', C) LAMELÁRNÍ KAPALNÝ STAV L α	11
OBR. 5. GELOVÝ STAV L β '	11
OBR. 6. SCHÉMA LIPIDOVÉHO OKOLÍ	13
OBR. 7. A) MOLEKULA TVARU TYČINKY, B) MOLEKULA TVARU DISKU, C)MOLEKULA BANÁNOVITÉHO TVARU.....	20
OBR. 8. SMA A SMC VRSTVY A NAKLONĚNÁ SMEKTICKÁ ROVINA....	21
OBR. 9. USPOŘÁDÁNÍ MOLEKUL V JEDNOTLIVÝCH FÁZÍCH	22
OBR. 10. DVA TYPY RIGIDNÍCH JADER TVOŘÍCÍ ZÁKLAD	22
OBR. 11. USPOŘÁDÁNÍ MOLEKUL V A) HOMEOTROPNÍM, (B) PLANÁRNÍM VZORKU.....	23
OBR. 12. USPOŘÁDÁNÍ MOLEKUL V ZÁKLADNÍCH DEFORMACÍCH.....	23
OBR. 13. BIOMEMBRÁNA S VERTIKÁLNÍM ROZDĚLENÍM FÁZÍ.....	27
OBR. 14. HRUBÁ PŘEDSTAVA HRDLOVÉHO MECHANISMU.....	28
OBR. 15. MECHANISMY ZPROSTŘEDKOVANÉHO PŘENOSU... 29	
OBR. 16. NOSIČ USNADNĚNÉ DIFÚZE D-GLUKOSY	30
OBR. 17. MODEL ČINNOSTI NOSIČE	32
OBR. 18. SCHEMATICKÁ PŘEDSTAVA PRIMÁRNÍHO AKTIVNÍHO TRANSPORTU.....	33

