

І.С. Чекман, П.В. Сімонов

Структура та функція біомембран: ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК

Узагальнено сучасні погляди на структуру та функції біомембрани, роль ліпідного, білкового та вуглеводного її компонентів у підтриманні життєдіяльності клітини. Розглянуто сучасну модель будови біомембрани, розділеної на нанокмірки рідини, у якій ліпіди та протеїни підлягають аномальній дифузії. Увагу приділено теорії існування ліпідних рафтів – нанорозмірних мембранних доменів. Проведено аналіз літератури та наукових досліджень стосовно наноприроди іонних каналів, закономірностей впливу наночастинок на біомембрану. Показано, що дані про структуру й функції біомембрани та характер впливу на неї наночастинок є необхідними для створення нових високоефективних терапевтичних і діагностичних засобів, а також для дослідження токсикологічних властивостей нанооб'єктів. Ключові слова: біомембрана, ліпідний бішар, протеїн, дифузія, ліпідний рафт, наночастинка.

ВСТУП

Біомембрана є ключовим елементом існування клітини. Ця комплексна структура її оточує, визначає межі та відділяє внутрішнє середовище (цитозоль) від зовнішнього, а вміст органел – від цитозолю. Біомембрана представлена тонкою плівкою товщиною в середньому 5 нм, яка складається з ліпідних і білкових молекул, з'єднаних переважно за допомогою нековалентних зв'язків. Клітинна мембрана – це динамічна, плинна структура; більшість її молекул можуть пересуватися уздовж неї. Ліпідні молекули розташовані у вигляді подвійного шару (бішару), який надає мембрані плинних властивостей та відіграє роль майже непроникного бар'єра для багатьох розчинних у воді сполук. Багато важливих функцій виконують білки, що, пронизуючи ліпідний бішар, транспортують через мембрану специфічні молекули чи прискорюють такі мембраноасоційовані реакції, як синтез АТФ. Деякі протеїни є структурними ланками, що зв'язують цитоскелет (волокнисту актинову коміркову

© І.С. Чекман, П.В. Сімонов

структуру, зв'язану з цитозольною поверхнею біомембрани [32]) через ліпідний бішар із зовнішньоклітинною матрицею чи іншою клітиною, тоді як інші є біосенсорами, що приймають та передають хімічні сигнали у клітинне середовище. Близько 30 % білків, що закодовані у геномі тваринної клітини, є мембранними протеїнами [1].

Цікавим є факт, що біомембрани мають у основі наноструктурні ділянки, чи домени, вивчення яких стало можливим завдяки створенню нових методів дослідження та сучасної апаратури з високою роздільною здатністю.

Окремо слід звернути увагу на актуальне питання впливу наночастинок на структуру й функції біомембрани. Адже знання цього аспекту допомагає досліджувати лікувальні й токсикологічні властивості наноматеріалів, а також знаходити нові сфери їх медичного застосування.

Біологічне значення та будова ліпідного компонента біомембрани. Ліпідний бішар – універсальна основа структури біомембрани. Його будову можна спостерігати за

допомогою електронної мікроскопії, хоча для більш детального вивчення необхідно застосовувати рентгеноструктурний аналіз. Бішар утворюється завдяки особливим властивостям молекул ліпідів, що спричинюють їх спонтанну збірку. Ліпіди складають приблизно 50 % від маси більшості тваринних мембран, майже вся інша маса – протеїни. На 1 мкм² бішару знаходиться $5 \cdot 10^6$ молекул ліпідів. Всі молекули амфільні – мають гідрофільну та гідрофобну частини [1].

Переважають більшість ліпідів біомембрани складають фосфоліпіди, що мають полярну групу («голівка») та 2 неполярні «хвости» – жирні кислоти, що відрізняються за довжиною (містять 14–24 вуглецевих атомів). Один з «хвостів» ненасичений, має один чи декілька цис-подвійних зв'язків, тоді як інший є насиченим. Відмінності у довжині та насиченості жирних кислот надзвичайно важливі, тому що впливають на здатність молекул фосфоліпідів упорядковуватися одна напроти одної та впливати на плинність мембрани [24].

Завдяки особливостям структури та амфільним властивостям, ліпіди формують бішар у водному середовищі. Щоб зрозуміти механізм утворення бішару, необхідно розглянути правила поведінки у воді молекул із різною розчинністю. Гідрофільні сполуки легко розчиняються у воді, бо містять заряджені групи чи незаряджені полярні групи, які можуть вступати в електростатичну взаємодію або утворювати водневі зв'язки з молекулами води. Гідрофобні сполуки, навпаки, нерозчинні у воді, бо всі, чи майже всі атоми незаряджені та неполярні, і тому не можуть створити енергетично вигідні зв'язки з молекулами розчинника. У такому випадку молекули води утворюють комірочки навколо гідрофобної сполуки, наслідком чого є збільшення вільної енергії системи, бо утворюються структури більш впорядковані, ніж оточуюча вода. Вільна енергія

зменшується, якщо гідрофобні молекули (або гідрофобні частини амфільних молекул) збираються разом таким чином, щоб залучати у процес меншу кількість молекул води [53, 70, 74].

Аналогічно, ліпідні молекули спонтанно агрегують, щоб «сховати» гідрофобні «хвости» всередину та зорієнтувати гідрофільні «голівки» до води. Існують два шляхи подібної спонтанної агрегації ліпідів: із формуванням *сферичних міцел* з «хвостами», спрямованими до центру, чи *бішару* з «хвостами», розташованими між «голівками».

Завдяки циліндричній формі, молекули фосфоліпідів спонтанно формують бішар у водному середовищі. У цьому енергетично найбільш бажаному розташуванні гідрофільні «голівки» направлені до води по обидва боки поверхні бішару, а гідрофобні «хвости» захищені від води усередині [37].

Кінці плоского бішару гідрофобні, бо мають «хвости» фосфоліпідів на боковій поверхні. Єдиний спосіб уникнути вільних кінців – самооточення з формуванням закритої комірки. Цей фундаментальний закон у створенні живої клітини напругу заснований на формі та амфільній природі молекули фосфоліпиду. Сили, що змушують фосфоліпіди утворювати бішар, також забезпечують властивість ауторепарації. Ушкодження мембрани створює вільну гідрофобну ділянку, яка контактує з водою, що є енергетично не вигідним. Тому ліпіди спонтанно перебудовуються й закривають ушкодження. Зокрема, у еукаріотних мембранах такі дефекти ліквідуються за допомогою потоку внутрішньоклітинних везикул. У плазматичній мембрані клітин ссавців домінують чотири основні фосфоліпіди: фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин та сфінгомієлін. З них тільки фосфатидилсерин має негативний заряд, тоді як інші є електронейтральними при фізіологічних значеннях рН. Завдяки негативному заряду, фосфатидилсерин, що розташований переважно у цито-

зольному моношарі мембрани, відіграє велику роль у створенні її електричного потенціалу. До складу біомембрани також входять інозитол-фосфоліпіди, які представлені у меншій кількості, але мають ключове значення у забезпеченні здатності мембрани виконувати сигнальну функцію [1].

Еукаріотні мембрани містять велику кількість холестерину – приблизно по одній молекулі на кожну молекулу фосфоліпіду. Холестерин відіграє важливу роль у підтриманні бар'єрної функції біомембрани. Гідроксильні групи орієнтуються ближче до «голівки» фосфоліпідів, а стероїдні цикли – до «хвостів», обмежуючи рухливість CH_2 -груп вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів, тим самим зменшуючи проникність бішару для малих водорозчинних молекул та підвищуючи його стабільність [45].

Зовнішній шар біомембрани багатий на гліколіпіди – структури, що містять вуглеводний компонент та становлять близько 5 % усіх ліпідних молекул зовнішнього моношару. Гліколіпіди здатні до скупчення завдяки утворенню водневих зв'язків між вуглеводними ділянками та силам Ван-дер-Ваальса довгих насичених вуглеводневих ланцюгів.

Гліколіпіди захищають мембрану від дії ферментів та екстремальних значень рН, зв'язуються з лектинами та беруть участь у процесі клітинної адгезії. Заряджені гліколіпіди – гангліозиди беруть участь у створенні електричного потенціалу мембрани та регулюванні концентрацій іонів, особливо Ca^{2+} , на мембранній поверхні [1].

Окремі ліпідні молекули здатні дифундувати у бішарі. Дослідження цього явища стало можливим із створенням синтетичних бішарів: ліпосом (сферичних везикул) діаметром 25–1000 нм та «чорних мембран» – планарних бішарів, сформованих у отворі на межі двох водних комірок [5, 36, 51].

Як альтернатива «чорним мембранам» були запропоновані мембрани з підтриманим ліпідним бішаром, створені на таких

поверхнях, як скло, кремній чи золото. Перевага цих структур – механічна стабільність протягом тривалого періоду. Недолік – взаємодія елементів мембрани з поверхнею, неможливість проведення досліджень іонного транспорту та включення у бішар трансмембранних протеїнів з ділянками, що знаходяться над площиною мембрани. Вирішенням цієї проблеми стали мембрани з прив'язним ліпідним бішаром – структури, що містять синтетичні тіоліпіди, які контактують з субстратом, тоді як бішар залишається вільним з обох боків [35].

Для вимірювання руху молекул та їх частин застосовують різноманітні методи. Одна з них – маркування «голівки» спіновою міткою, наприклад нітрогрупою, що містить неподілену пару електронів, спін яких створює парамагнітний сигнал, який може бути зареєстрований електронною парамагнітною резонансною спектроскопією. Такі дослідження показують, що фосфоліпіди дуже рідко мігрують з одного моношару в інший. Цей процес, відомий як «фліп-флоп», для окремої молекули спостерігається раз на місяць. Натомість, ліпіди швидко міняються місцями з сусідніми молекулами у межах одного моношару (у середньому 10^7 разів за секунду). Це є причиною швидкої латеральної дифузії з коефіцієнтом 10^{-8} cm^2/s , що свідчить про здатність молекули просуватися на відстань у 2 мкм (довжина великої бактеріальної клітини) за 1 с. Дослідження також показали, що індивідуальні молекули ліпідів дуже швидко обертаються навколо своєї осі (обертальна дифузія), а їхні «хвости» здатні до згинання [69].

Подібні дослідження були проведені як на ізольованих біомембранах, так і на живих клітинах. Результати довели, що ліпідний компонент біомембрани є двовимірною рідиною, складові частини якої вільно рухаються латерально. Індивідуальні фосфоліпіди рухаються у межах свого моношару, що створює перешкоду для їх

синтезу, адже вони синтезуються у ендоплазматичному ретикулумі всередині клітини і не можуть самостійно потрапити у зовнішній шар мембрани. Ця проблема вирішується завдяки спеціальному класу зв'язаних з мембраною ферментів – фосфоліпідних транслокаторів (фліпаз), які каталізують процес «фліп-флоп» [19, 45].

Для біомембрани характерна ліпідна асиметрія, яка має велике функціональне значення та характеризується відмінностями у якісному та кількісному складі ліпідів між зовнішнім і внутрішнім моношарами бішару. Багато протеїнів зв'язуються зі специфічними ліпідними «голівками», розташованими саме у цитозольному шарі ліпідного бішару. Наприклад, протеїнкіназа С активується у відповідь на різні зовнішньоклітинні сигнали та зв'язується з цитозольною частиною плазматичної мембрани, де у великій концентрації знаходиться негативно заряджений фосфатидилсерин, необхідний для функціонування протеїнкінази С.

У інших випадках ліпідна «голівка» повинна бути попередньо модифікована для створення ділянок зв'язування з протеїном. Наприклад, фосфатидилінозитол, що знаходиться у цитозольному моношарі, модифікується ліпідними кіназами із додаванням фосфатних груп до інозитольного кільця. Надалі фосфорильовані інозитол-фосфоліпіди зв'язуються зі специфічними цитозольними протеїнами [1].

Структура та функції мембранних протеїнів.

Хоча базова структура біомембрани складається з ліпідного бішару, виконання більшості її специфічних функцій неможливе без участі протеїнів. За масою відношення цих двох фракцій приблизно 1:1, хоча за кількістю молекул ліпідів у мембрані майже у 50 разів більше, ніж білків. [1].

Для протеїнів характерні різні способи зв'язування з біомембраною. Трансмембранні білки перетинають бішар у вигляді

поодинокі α -спіралі, множинних α -спіралей чи закрученого β -листа (β -бочки). Деякі з цих протеїнів мають ковалентно приєднаний жирнокислотний ланцюг, уведений у цитозольний ліпідний моношар. Білки іншого типу розташовані тільки по один бік мембрани. Такі протеїни можуть зв'язуватися з мембраною за допомогою амфіфільної α -спіралі, що з'єднується з цитозольним моношаром гідрофобною ділянкою, через ковалентно приєднаний жирнокислотний ланцюг чи пренільну групу у цитозольному моношарі чи через олігосахаридний посередник – з фосфатидилінозитолом у зовнішньому моношарі [14, 59].

Протеїни, що з'єднуються з бішаром за допомогою нековалентних взаємодій з мембранними білками та можуть бути легко ізольовані дією розчинів з високою іонною силою чи екстремальним значенням рН, отримали назву периферичних мембранних протеїнів, на відміну від інтегральних [59].

Трансмембранні протеїни амфіфільні. Їх гідрофобні частини проходять крізь мембрану та взаємодіють з «хвостами» фосфоліпідів, а гідрофільні – знаходяться на поверхні. Гідрофобність деяких протеїнів підвищується завдяки ковалентним зв'язкам з жирними кислотами, що введені у цитозольну частину бішару [11, 14].

Більшість трансмембранних протеїнів тваринних клітин містить дисульфідні зв'язки, які відіграють важливу роль у стабілізації структури поліпептидного ланцюга чи зв'язку з іншими ланцюгами та розташовані на зовнішньому боці мембрани. У цитозольній частині бішару білки не мають дисульфідних зв'язків через відновлювальне середовище [2].

Для протеїнів не характерний перехід «фліп-флоп», однак їм властива обертальна та латеральна дифузія. Швидкість останньої вимірюється за допомогою флуоресцентного відновлення після фотознебарвлення. Метод включає маркування протеї-

нів флуоресцентною групою із наступним знебарвленням її за допомогою лазерного променя. Вимірюється час, за який прилегли забарвлені протеїни перейдуть у знебарвлену зону [40, 48]. Також для цього застосовується метод флуоресцентної кореляційної спектроскопії, у якому вимірюються та аналізуються коливання у флуоресценції, що виникають під час дифузії мічених молекул у освітлену лазерним променем ділянку об'ємом приблизно 1 фл, та з неї [4, 20].

Глікокалікс – вуглеводні структури, що оточують біомембрану. Поверхня еукаріотної клітини вкрита олігосахаридними ланцюгами, ковалентно з'єднаними з мембранними протеїнами (глікопротеїни) та ліпідами (гліколіпіди), а також полісахаридними ланцюгами, ковалентно з'єднаними з протеїновим ядром (протеоглікани). Ця багата на вуглеводи зона отримала назву глікокалікс. Найбільш імовірною функцією глікокаліксу є захист клітини від механічного і хімічного ушкодження та запобігання небажаним взаємодіям між протеїнами.

Олігосахаридні ланцюги глікопротеїнів і гліколіпідів відрізняються неймовірною різноманітністю завдяки розгалуженій структурі та можливості мономерів ковалентно зв'язуватися одне з одним за допомогою різних функціональних груп. Навіть 3 моносахариди, з'єднані разом, можуть формувати сотні оригінальних олігосахаридів. Різноманітність якісного й кількісного складу вуглеводів поверхні клітини забезпечує реалізацію її специфічних функцій [49].

Нові погляди на структуру біомембрани – нанорозмірні комірки та аномальна дифузія. Singer та Nicolson [65], спираючись на результати термодинамічних досліджень, запропонували розглядати біомембрану як двовимірну рідину, упорядковану за принципами рідинно-мозаїчної моделі. Відпо-

відно до цієї гіпотези, мембрана – це орієнтований двовимірний в'язкий розчин амфіфільних протеїнів і ліпідів, що перебувають у термодинамічній рівновазі.

Традиційна рідинно-мозаїчна модель передбачає існування протеїнів у біомембрані у площині, перпендикулярній до поверхні клітини. На сьогодні відомо, що білки здатні займати великі за розміром ектодомені на поверхні ліпідів, створюючи об'ємні перешкоди. Прикладом такої структури є АТФ-синтаза, що утворює просторові контакти та здатна до взаємодії зі сполуками поза бішаром. Останні дослідження також показали, що товщина біомембрани не є однаковою по всій довжині. Плинність ліпідів та відносно мала рухливість протеїнів є підставою для висновку, що ліпідний компонент скривлюється для «маскування» гідрофобних ділянок протеїнів, розташованих над поверхнею мембрани. Однак у окремих випадках може спостерігатись також скривлення й протеїнів [15].

Погляди на структуру біомембрани змінюються та еволюціонують із розвитком нових технологій дослідження мікро- та наноструктур. Згідно з Engelman [15], біомембрану слід розглядати як систему з фрагментарним упорядкуванням олігомерних протеїнів.

Нові експериментальні технології, що дають змогу вченим відстежувати окремі молекули чи групи молекул, набувають все більшого значення у вивченні динаміки, структури та функції клітинної мембрани. Ці технології дають дослідникам можливість спостерігати пересування, агрегацію та навіть активацію індивідуальних молекул у плазматичній мембрані живої клітини. У методі флуоресцентного відстеження окремих молекул (ФВОМ) флуоресцентний зонд (молекула протеїну) зв'язується зі сполукою-мішенню. Результат реєструється засобами флуоресцентної мікроскопії [30]. У методі відстеження окремих частинок (ВОЧ) наночастинки золота

діаметром 20–40 нм зв'язуються з певними молекулами для відстеження руху останніх у мембрані за допомогою диференціальної інтерференційно-контрастної мікроскопії чи мікроскопії методом світлого поля [30, 52].

Хоча більшість мембран характеризуються високою плинністю, останні дослідження за допомогою методу ВОЧ виявили комплекс обмежень латеральної рухливості протеїнів, що включає спрямований рух, обмежений рух та аномальну дифузію [15, 31]. Причинами обмеження є утворення великих олігомерів, зіткнення ектодоменів, взаємодії різної природи у бішарі, існування ділянок адгезії та особливості цитоскелетної структури клітини [58].

Двовимірний рідинно-мозаїчний модель біомембрани не передбачає відповіді на два важливі питання. По-перше, чому коефіцієнти дифузії для протеїнів і ліпідів у плазматичній мембрані менші, ніж у штучній мембрані чи у ліпосомах у 5–50 разів. По-друге, чому олігомери чи молекулярні комплекси дифундують значно повільніше порівняно з поодинокими мономерами. Для пояснення природи цих феноменів необхідним стало створення нової моделі структури біомембрани [30].

Результати ВОЧ показали, що дифузія компонентів мембрани не підпорядковується закону броунівського руху. Натомість спостерігається аномальна дифузія, чи стрибкоподібна. Плазматична мембрана поділена на нанокмірки мінімальною довжиною 10 нм (останні дослідження показали, що у природі розміри комірок біомембран залежно від типу живих клітин варіюють від 30 до 250 нм [32]). Всередині комірок дифузія молекул не обмежена перешкодами. Щоб перейти з однієї комірки у іншу, молекулі необхідно здійснити «стрибок», що вимагає витрат часу (рис. 1) [31].

Для пояснення принципів аномальної дифузії були запропоновані модель мембранного актинового цитоскелетного паркану (МАЦП) та модель стовпів із закріп-

лених трансмембранних протеїнів (СЗТП) (рис. 2) [52].

На базі даних ВОЧ, із використанням технології оптичного пінцета та клітин із модифікованими цитоскелетом і цитоплазматичними доменами трансмембранних протеїнів, була сформована модель МАЦП, згідно з якою цитозольні домени протеїнів стикаються з цитоскелетом, призводячи до тимчасового обмеження руху у цитоскелетній нанокмірці. Трансмембранні білки здатні перестрибувати з однієї комірки у іншу, коли між мембраною та цитоскелетом утворюється достатній простір для проходження цитозольної частини протеїну. Цей простір формується у результаті температурних коливань, коли актинові філаменти цитоскелета тимчасово дисоціюють, а трансмембранний протеїн відповідно має достатню кінетичну енергію для подолання бар'єра. Вірність моделі МАЦП підтверджена спостереженнями з використанням атомно-силової мікроскопії з тривимірною реконструкцією зображення за допомогою комп'ютерної томографії [31].

Невирішеним залишалося питання, як обмеження у русі може поширюватися на фосfolіпиди у зовнішньому моношарі мембрани – без прямого контакту з цитоскелетом. Для пояснення була запропоно-

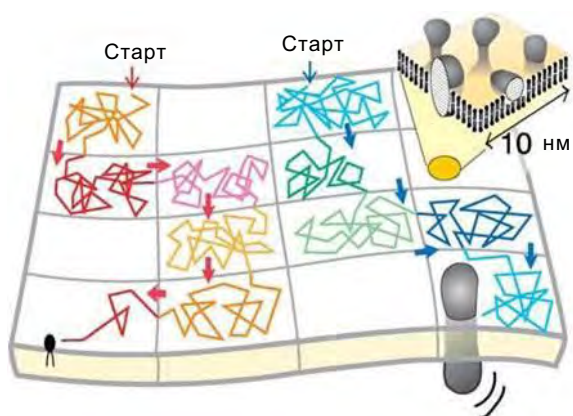


Рис. 1. Нанокмірки та аномальна дифузія у біомембрані (ліворуч – дифузія фосfolіпиду, праворуч – трансмембранного протеїну, зверху – схематичне зображення нанокмірки) [31]

вана модель СЗТП. Деякі трансмембранні протеїни (близько 15 % від загальної кількості [32]) закріплені у цитоскелеті та відіграють роль «стовпів», що обмежують рух ліпідів у бішарі [52]. Цікавим є факт, що протеїни не обов'язково мають бути з'єднані з актиновими філаментами протягом тривалого часу. Враховуючи, що молекула перетинає комірку у 10 нм в середньому за 10 мс, трансмембранний білок може виконувати роль «стовпа» протягом цього короткого проміжку часу, що є достатньою умовою [31].

Мономери мембранних молекул можуть дифундувати з однієї комірки у іншу відносно легко, тоді як молекулярні комплекси мають здійснювати «стрибок» усіма компонентами одночасно, тому швидкість їх переміщення між комірками є більш низькою. Крім того, олігомери часто зв'язуються з елементами цитоскелета, що спричинює тимчасову іммобілізацію комплексів. Цей ефект обмеження дифузії отримав назву олігомеризаційно-індукованої пастки (ОІП). У відповідь на дію зовнішньоклітинного фактора рецептор формує олігомерний комплекс, що, завдяки ефекту ОІП, залишається у комірниці, де був отриманий сигнал (рис. 3). Таке обмеження у просторі надзвичайно важливе для сигналів,

що викликають локальну реорганізацію цитоскелета чи хемотаксичні ефекти [32, 52].

Таким чином, двовимірною рідинно-мозаїчною моделлю не може пояснити явище стрибкоподібного руху молекул у мембранних структурах розмірами більше ніж 10 нм та повинна бути заміщена моделлю розділеної на нанокмірки рідини, у якій ліпідів та протеїнів підлягають аномальній (стрибкоподібній) дифузії [30].

Ліпідні рафти – нанорозмірні мембранні домени. Більшість ліпідів біомембрани знаходиться у неупорядкованому стані. Сили Ван-дер-Ваальса між сусідніми «хвостами» жирних кислот є недостатньо вибірковими для утримання молекул одного типу разом. Однак для сфінголіпідів, що мають довгі та насичені вуглеводневі ланцюги, сили притягання є достатніми для концентрування сполук у малих доменах, що отримали назву «ліпідні рафти» й розглядаються як локальні ділянки фазового переходу – місця, щільно укомплектовані сфінголіпідами, у яких дещо втрачаються властивості мембрани як рідини [44, 63].

Поштовхом до розглядання проблеми існування ліпідних рафтів стали дослідження утворення впорядкованих (L_0) та плинних (L_d) фаз у модельних мембранах

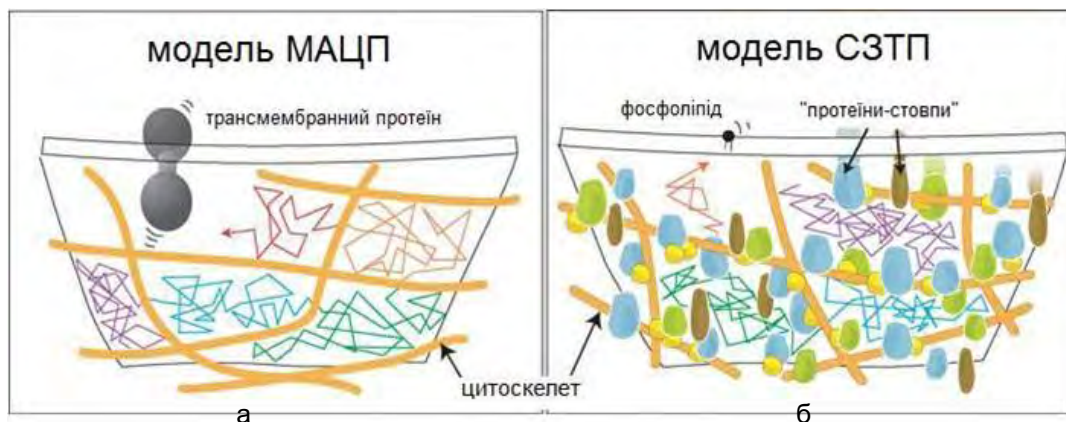


Рис. 2. Модель мембранного актинового цитоскелетного паркану (МАЦП) та модель стовпів із закріплених трансмембранних протеїнів (СЗТП) [31]: а – трансмембранний протеїн вільно дифундує у межах однієї нанокмірки, але, щоб перейти у іншу, молекула білка повинна здійснити «стрибок», що вимагає витрат енергії та часу; б – «протеїни-стовпи» обмежують рух ліпідів у бішарі, внаслідок чого спостерігається явище аномальної дифузії

під впливом холестерину на фосфоліпіди. Дійсно, холестерин впорядковує ацильні ланцюги ліпідів, що призводить до утворення фази l_o . Процесу упорядкування особливо сприяють сфінголіпіди, що мають лінійні насичені ацильні ланцюги та здатні утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки. Проведені на модельних мембранах експерименти підтвердили динамічне існування двох фаз [61], що лягло у основу «гіпотези рафтів» [62].

Біомембранам властива гетерогенність, яка пояснюється просторовим обмеженням білків та ліпідів у нанорозмірних ділянках [38]. Зміна рухливості та тимчасове скупчення молекул у цих доменах може мати прямий вплив на здатність мембрани виконувати біологічні функції та забезпечувати можливість здійснення таких клітинних процесів, як збудливість, презентація антигенів та міжклітинні взаємодії. Передбачуваний розмір цих мембранних доменів варіює від декількох одиниць до сотень нанометрів.

Коорман [27] запропонував модель мембрани, у якій частина молекул впорядковано розташована у окремих нанорозмірних доменах, що відіграють роль «мембранних організаторів», які підтримують і прискорюють утворення функціональних доменів більших розмірів у відповідь на дію зовнішніх чи внутрішніх чинників. При цьому нанорозмірні ліпідні домени розглядаються як прекурсори рафтів [39]. Відкриття нанодоменів стало можливим завдяки використанню скануючої ближньопольової оптичної мікроскопії [27].

Ліпідні рафти більш щільні, ніж інші ділянки бішару, та є місцем накопичення певних мембранних білків, що уможлиблює їх функціонування у комплексі для перетворення сигналів зовнішнього середовища у внутрішньоклітинну відповідь, а також для участі у процесах екзо- та ендоцитозу, клітинної адгезії та мембранного транспорту. Ліпіди одного моношару рухаються незалежно від ліпідів іншого. Однак у рафтах молекули переміщуються узгоджено у обох

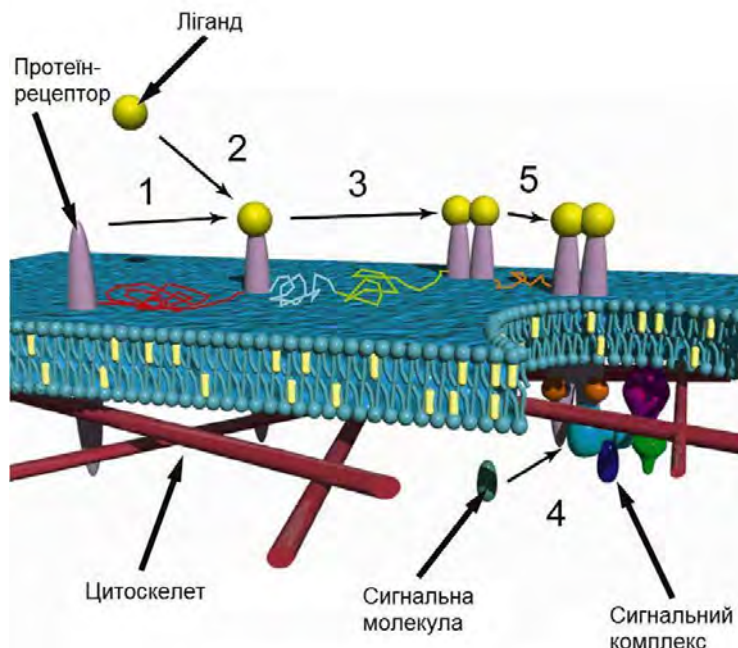


Рис. 3. Олігомеризаційно-індукована пастка. Протеїн-рецептор дифундує у біомембрані (1), реагує з лігандом (2); утворюється олігомерний комплекс (3). Цитозольні сигнальні молекули (4) разом із олігомером формують сигнальний комплекс (5) [52]

моношарах завдяки взаємодії протилежно розташованих вуглеводневих ланцюгів сфінголіпідів [21, 43, 44, 57, 64].

Коорман [27] була запропонована модель організації клітинної мембрани, у якій у неактивному стані малі ліпідні (рафтові) та протеїнові домени співіснують з окремими мономерами. При активації формуються більші протеїнові домени, стабілізовані ліпідними рафтами (рис. 4).

Плазматична мембрана тваринних клітин містить велику кількість багатих на сфінголіпідів та холестерин ліпідних рафтів, розмір яких залишається предметом дискусій: деякі автори вважають його рівним 15–44 нм [44], інші – 30–250 нм [32]. Причиною цього є відсутність серед вчених світу загальноприйнятих єдиних методів дослідження рафтів і загальних визначень [12]. Відкритим залишається питання, що саме називати рафтами – «мембранні організатори» чи більші активовані функціональні домени, а також, чи існують ліпідні рафти у неактивному стані [27].

Біологічні наноканали та нанофлюїдика.

У нормі ліпідний бішар проникний лише для неполярних незаряджених молекул малого розміру. Проходженню гідрофільних і заряджених молекул перешкоджає гідрофобний, діелектричний бар'єр, тобто біомембрана виступає у ролі електричного ізолятора. Для транспортування іонів через

мембрану остання забезпечена спеціалізованими трансмембранними протеїнами – іонними каналами [35, 74]. Деякі з цих каналів, так звані «канали витоку», дають змогу іонам переміщуватися у клітину чи з неї за градієнтом концентрації; інші відіграють більш активну роль та діють як ворітний механізм, що контролює іонні потоки. Протеїни іонних каналів створюють у біомембрані пори, що уможлиблює рух іонів у відповідь на різноманітні подразники, серед яких – дія хімічних лігандів, зміни мембранного потенціалу, температури та чинники механічного впливу. Зміни у іонному розподілі можуть у свою чергу спричинювати зміни у мембранному потенціалі та, якщо це іони кальцію, безпосередньо активувати різні внутрішньоклітинні сигнальні каскади. Генеровані іонними каналами сигнали є одними з найшвидших серед зареєстрованих у біосистемах. Іонний потік крізь пору може сягати значень 10^9 іон/с [8].

Іонні канали характеризуються високою вибірковістю дії, що можна спостерігати на прикладі ворітних каналів. При мембранному потенціалі спокою вони повністю зачинені та непроникні для потоку іонів. Тим не менш, при зміні мембранного потенціалу, взаємодії з певним лігандом чи під дією іншого фактора, канал може відкритися. Таким чином, існують дві основні групи ворітних каналів – потенціал- та лігандзалежні [35].

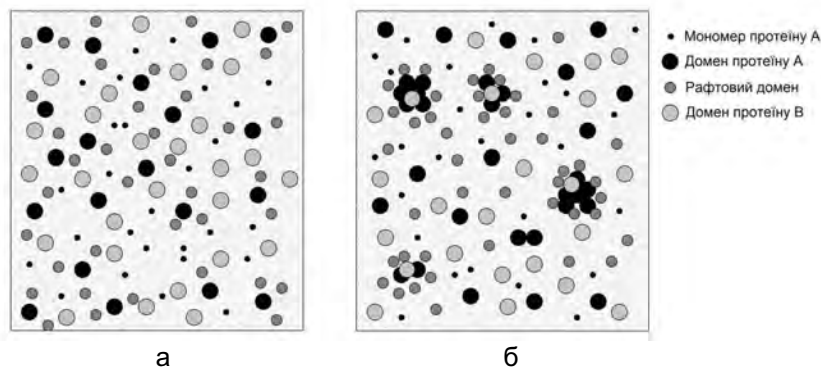


Рис. 4. Модель організації клітинної мембрани, запропонована Коорман [27]: а – неактивний стан, б – активний стан

Біологічні іонні канали доцільно розглядати як наповнені водою нанорозмірні пори, сформовані молекулами протеїнів у біомембрані. Просторове обмеження рідини у нанопорі призводить до появи нових властивостей, адже розміри пор наближаються до типових молекулярних величин та довжини Дебая – відстані, на яку поширюється дія електричного поля окремого заряду в нейтральному середовищі, що складається з позитивно та негативно заряджених частинок. Довжина Дебая залежить від концентрації заряджених частинок, діелектричної сталої та абсолютної температури. Феномен зміни властивостей рідини у нанорозмірних каналах є об'єктом великого наукового інтересу, адже лежить у основі біологічних процесів, що відбуваються у природних наноканалах біомембрани [29]. Дослідження цього феномену – завдання нанофлюїдики – нової науки, що вивчає властивості рідин у нанорозмірних структурах [6, 16]. Детальне вивчення цих властивостей допоможе зрозуміти наноприроду процесів клітинного гомеостазу та передачі сигналів у нервовій та м'язовій тканинах, що регулюються іонними наноканалами [16].

Нанофлюїдика досліджує декілька феноменів, що виникають у нанорозмірних рідинних системах:

1. *Феномен поверхневої енергії.* У макросистемах з ламінарним потоком рідини прийнято вважати, що швидкість потоку граничного шару рідини дорівнює нулю. У наноканалах опір рідини біля поверхні зменшується, внаслідок чого спостерігається «ефект ковзання» – рідина має відмінну від нуля швидкість переміщення. Ковзання найбільш характерне для рідин біля гідрофобних жорстких поверхонь. Також проявом феномена є створення від'ємного тиску рідини у наноканалі [71].

2. *Феномен надгідрофобності, або «лотос-ефект».* Значна шорсткість поверхні наноканалів спричинює виникнення «надгідрофобних» властивостей. У природі цей

ефект можна спостерігати, коли краплі дощу скочуються по гідрофобній поверхні листка лотоса, очищуючи його від частинок пилу та мікроорганізмів [13].

3. *Феномен зсуву.* Зростання сил зсуву у нанорозмірній рідині уможливорює розтягування та фрагментацію молекул полімерів, що використовується у діагностичних та інших дослідних цілях [13].

4. *Феномен електричного подвійного шару.* Внаслідок наближення значення радіуса наноканалів до довжини Дебая, у останніх спостерігається явище накладання електричних подвійних шарів поверхонь. Це призводить до значного збільшення електропровідності каналу. Іони, що мають однойменний з внутрішньою поверхнею каналу заряд, будуть видалені з нього. Наноканал натомість заповниться іонами протилежного заряду. Наслідком накладання електричних подвійних шарів і підвищення концентрації останніх є підвищення осмотичного та гідростатичного тиску у наноканалах. У нирках цей феномен лежить у основі напівпроникності базальної мембрани нефронів – не дає змоги негативно зарядженим молекулам альбуміну переходити з крові у первинну сечу, бо базальна мембрана нефрону несе негативний заряд. Феномен електричного подвійного шару знайшов практичне використання у синтетичних мембранах, заряд поверхні яких може штучно змінюватися протягом експерименту, що дає можливість застосовувати пристрої як нанофільтри [60].

5. *Феномен розміру.* Розмір молекул та об'ємні сили відштовхування на нанорозмірному рівні спричинюють виникнення ефекту ексклюзії – різної здатності речовин проникати у пори носія, що покладено в основу розділення сполук методом ексклюзійної хроматографії. У природі феномен розміру має значення у функціонуванні водних наноканалів – аквапоринів, що транспортують воду, але є непроникними для високомолекулярних сполук та елект-

ролітів. Завдяки водневим зв'язкам, молекули води проходять через вузький просвіт каналу у вигляді неперервного потоку товщиною в одну молекулу [9]. Створюються умови, згідно з якими електроліти для проходження через наноканал повинні позбутися власної водної оболонки, що є енергетично не вигідним.

6. *Феномен ентропії*. Природні системи прагнуть до збільшення ентропії – збільшення ймовірних станів. Наприклад, ДНК має значно більше ймовірних станів у згорнутому положенні, ніж у розгорнутому. Тому для збільшення ентропії, молекула буде займати великі порожнини поверхні, а не заповнювати малі. Цей феномен знайшов застосування у «пастках ентропії», що використовуються для розділення молекул ДНК за довжиною [68].

7. *Феномен молекулярної структури*. Для нанофлюїдики важливим є врахування взаємодій на рівні окремих молекул системи. Наприклад, для аквапоринів ще однією причиною непроникності для заряджених частинок, зокрема протонів, є існування ароматично-аргінінового селективного фільтра – позитивно заряджений аргінін не дає протонам надходити у наноканал [10].

Крім теоретичних досліджень, нанофлюїдика нині біотехнологічно застосовується у створенні «лабораторій на чипі» – високочутливих аналітичних засобів, що здатні ізолювати та досліджувати окремі макромолекули [6]. Практичне використання знайшов перемикач іонних каналів – біосенсор, що містить іонні канали граміцидину А. Граміцидиновий канал, що містить пору діаметром 0,4 нм та довжиною 2,8 нм, хаотично переміщується у ліпідній мембрані, отже, відіграє роль динамічного нанобіосенсору. Перемикач іонних каналів забезпечує швидке виявлення низько- та високомолекулярних сполук. Сигналом при виявленні аналіту є реакція зі специфічними антитілами, що перекривають транспорт іонів, чи «молекулярними пробками», які блокують каналъну

пору. Перемикач іонних каналів застосовується у діагностиці, зокрема для швидкого виявлення вірусу грипу А у біологічному матеріалі [29].

Для імітації процесів іонного транспорту у біомембранах розроблені штучні наноканали, що дало змогу пришвидшити розвиток наномашин-біосенсорів та засобів нанофлюїдики. Ідеальним вибором для досліджень з нанофлюїдики стали вуглецеві нанотрубки, що хімічно інертні та мають просту структуру; крім цього, довжина й діаметр нанотрубок можуть бути легко модифікованими. Вибірковість іонного транспорту у штучних наноканалах регулюється змінами рН та температури [16, 23].

Закономірності впливу наночастинок на структуру та функції біомембрани. Здобуття глибоких та всебічних знань у сфері взаємодії наночастинок з біологічними системами, зокрема з біомембраною, є головним завданням у визначенні лікувальних і токсикологічних їх властивостей та напрямків потенційного застосування як медикаментів і засобів доставки активних речовин [34].

Зацікавленість вчених цим питанням підтверджується проведенням експериментальних досліджень [22, 54, 55] та побудовою комп'ютерних моделей [17, 46] вивчення різних аспектів взаємодії компонентів біомембрани та наночастинок; зокрема, велику увагу приділено їх гідрофобному ефекту.

Hong та співавт. [22] визначили, що незаряджені («гідрофобні») дендримери абсорбуються ліпідним бішаром, тоді як заряджені спричинюють виникнення отворів у мембрані. Дендримери з кінцевими первинними аміногрупами у нейтральному середовищі протонуються, утворюючи катіонний полімер. Такі структури можуть вступати у електростатичну взаємодію з біомембраною, в результаті чого у останній утворюються отвори діаметром 15–40 нм, порушується цілісність. Чим більшу кіль-

кість первинних аміногруп містить дендример, тим вища густина заряду його поверхні, а, отже, сильніший руйнівний вплив на біомембрану. Після видалення розчину дендримерів мембранна структура протягом 2 год може відновитися завдяки процесам ауторепарації. Але у концентраціях більше ніж 500 нмоль/л дендримери-полікатиони спричиняють достатньо масивну дендропорацію (утворення отворів), що призводить до загибелі клітини [22].

Дендримери з термінальними ацетамідними групами не формують отворів, бо не утворюють зарядженого полімеру. Для проникнення у клітину такі дендримери необхідно функціоналізувати залишком фолієвої кислоти для взаємодії з фолат-рецепторами на поверхні мембрани та надходження у клітину за допомогою ендцитозу [22, 33].

Qiao та співавт. [46] дослідили вплив гідрофобності фулеренів на їх поведінку у біомембрані. Тоді як гідрофобний первинний (нефункціоналізований) C_{60} -фулерен може проникати крізь бішар, його гідрофільні похідні здатні лише адсорбуватися на поверхні. Первинний фулерен при проникненні у мембрану збільшує відстань між «голівками» ліпідів у місці проходження. Це надає більшим за розмірами молекулам можливість проникати у клітину та порушувати цілісність мембрани. Опосередкований механічний вплив на проникність мембрани доповнюється біохімічним механізмом ушкодження – фулерени здатні спричинювати запуск процесів перекисного окиснення ліпідів. Гідрофільні похідні C_{60} сприяють ущільненню «голівок» ліпідів, що пояснює їх низьку токсичність порівняно з первинним фулереном. Дослідження Kraszewski та співавт. [28] показали, що первинні фулерени здатні зв'язуватися з різними ділянками калієвих каналів біомембрани та діяти як блокатори чи модулятори, спричиняючи токсичні ефекти.

За допомогою методів «крупнозернис-

тої» молекулярної динаміки Li та співавт. [34] продемонстрували механізм взаємодії наночастинок різної гідрофобності з біомембраною. У експерименті були використані гідрофобні та напівгідрофільні частинки діаметром 10 нм. Для визначення можливості їх проникнення крізь мембрану були обчислені профілі вільної енергії. Також були досліджені флуктуаційні ефекти як відображення впливу наночастинок на структуру та цілісність мембрани.

У експерименті з гідрофобною наночастинкою остання послідовно проникала у мембрану, розсовуючи ліпіди та повністю заповнюючи проміжок між ними, і зупинилась у центральній ділянці бішару. Протягом усього експерименту жодна молекула води не проходила крізь ліпідний бішар, що свідчить про збереження мембранної цілісності. Отже, мембрана стає більш щільною, але нових отворів не утворюється [34].

У разі напівгідрофільної наночастинки остання не проникала усередину бішару, але адсорбувалася на поверхні [34]. Ці результати були підтверджені у експерименті, де наночастинки золота, вкриті гідрофільною оболонкою, не проникали за допомогою пасивного транспорту через фосfolіпідні мембрани [3]. Тим не менш, дослідження свідчать, що наночастинки можуть потрапляти у клітину через ендцитоз з формуванням ліпідної транспортної везикули [50].

При адсорбції на поверхні чи проникненні у мембрану наночастинки можуть змінювати такі її макроскопічні властивості, як поверхневий натяг, що у свою чергу може вплинути на функції біомембрани, наприклад, на поділ клітин [34].

Крім гідрофобного ефекту важливу роль у взаємодії з біомембраною також відіграє розмір частинок. Roiter та співавт. [54, 55] провели дослідження впливу на ліпідний бішар полярних наночастинок кремнію різних розмірів. Згідно з отриманими результатами, частинки розміром менше

ніж 1,2 нм не впливали на структуру мембрани. Наночастинки розміром 1,2–22 нм утворювали пори у бішарі. Цей факт пояснювався тим, що наявність гідрофільних наночастинок у біомембрані є термодинамічно невигідною. Щоб ізолювати гідрофобний компонент від полярної частинки бішар був вимушений утворювати пори. Також виявилось, що вплив наночастинок на мембрану залежить від кривизни поверхні нанооб'єктів. Існує критичний розмір частинок, що становить 22 нм для мембрани товщиною 5 нм, при перевищенні якого співвідношення енергії адгезії та пружної деформації ліпідного бішару зумовлює «обгортання» наночастинок мембраною (рис. 5).

Нині увагу вчених світу привертають нанометали – антибактеріальні лікарські засоби нового покоління. Важливим є вивчення впливу цих наноматеріалів на прокаріотні біомембрани – для встановлення механізму протимікробної дії та на еукаріотні біомембрани – для дослідження та оцінки токсичності. Одним з найбільш перспективних антибактеріальних агентів є наносрібло. Достеменний механізм протимікробної дії наночастинок срібла досі не відомий. Нанорозмірні частинки у розчині здатні вивільняти деяку кількість іонів, з чим

може бути пов'язана їх біологічна дія [42].

Завдяки дисоціації великої кількості карбоксильних та фосфатних функціональних груп мембрани при фізіологічних значеннях рН, поверхня бактеріальних та спорових клітин негативно заряджена. Протилежні заряди бактерії та наночастинки зумовлюють накопичення останніх на поверхні мембрани внаслідок електростатичних взаємодій [67]. Але електростатичні взаємодії не в усіх випадках відіграють ключову роль у адгезії частинок на поверхні біомембрани, адже наночастинки можуть бути заряджені негативно [25].

Цікавими є дослідження Wang та співавт. [73], результати яких допомагають встановити зв'язок між видом заряду наночастинок і локальними змінами у щільності фосфоліпідів біомембрани. Цей феномен був досліджений при дії частинок на «голівки» фосфатидилхоліну у мембрані, що закінчуються електричним диполем P^-N^+ . Аніонні наночастинки взаємодіяли з N^+ , спричинюючи місцеве підвищення щільності ліпідів, тоді як позитивно заряджені взаємодіяли з P^- , зменшуючи щільність (рис. 6). Таким чином, заряджені наночастинки сприяли виникненню ділянок локального фазового переходу у біомембрані.

Після адгезії на поверхні біомембрани

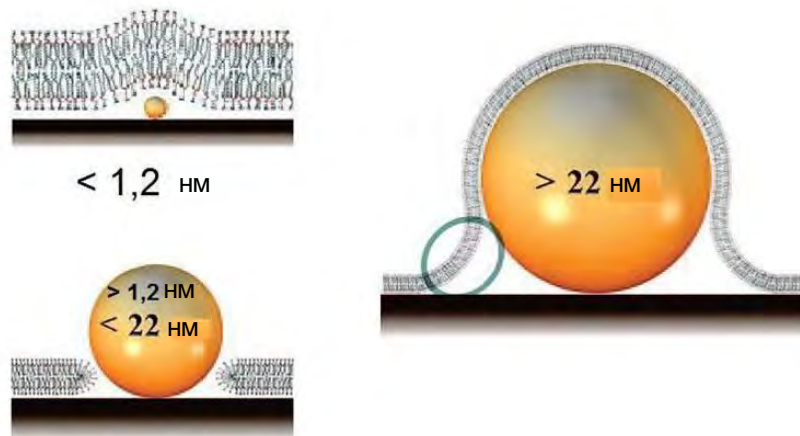


Рис. 5. Вплив наночастинок кремнію різного розміру на цілісність і форму ліпідного бішару: частинки розміром менше ніж 1,2 нм не впливають на структуру, розміром 1,2–22 нм – утворюють пори, розміром більше ніж 22 нм – зумовлюють викривлення бішару [54]

наночастинки срібла зв'язуються з сірко-вмісними та іншими протеїнами мембрани, призводячи до їх денатурації [41, 47]. Порушення морфології мембрани під дією срібла може значно підвищити проникність, призводячи до неконтрольованого транспорту сполук через мембрану і, в решті-решт, до смерті клітини [41, 42]. Аналіз за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії довів факт утворення частинками наносрібла «пор» у біомембрані [66].

Взаємодіючи з протеїнами мембрани, наночастинки срібла порушують функціонування дихального ланцюга бактерії [7, 42, 47], а також внаслідок інактивації антиоксидантних ферментів, запускають утворення вільних радикалів та наступне перекисне ушкодження мембрани [25].

Токсичні властивості наночастинок срібла були досліджені на стовбурових клітинах мишей. Результати показали, що наносрібло має більший токсичний вплив на метаболічні процеси у еукаріотній клітині, менший – на біомембрану [7]. Також

дослідження показали, що чисті наночастинки срібла більш токсичні для еукаріотних клітин, ніж функціоналізовані (нанорозмірні частинки тіопронін-срібло; вкриті шаром бичачого сироваткового альбуміну наночастинки сплаву срібло-платина; наночастинки срібла, захищені натрію поліглутаматом). Це підтримує ідею, що токсичність частинок пов'язана з наявністю відкритих металічних поверхонь, тоді як захищені органічним шаром частинки менш токсичні. Виключення становлять лише наночастинки срібла, функціоналізовані крохмалем, що призводять до порушення функцій мітохондрій, індукції процесів перекисного окиснення ліпідів, ушкодження ДНК та зупинки клітинного циклу [26]. Вплив хімічних властивостей поверхні на токсичність наночастинок також досліджували Wagner та співавт. [72]. У експерименті були застосовані частинки алюмінію та алюмінію оксиду однакових розмірів. Результати показали, що алюміній виявив значно більшу токсич-

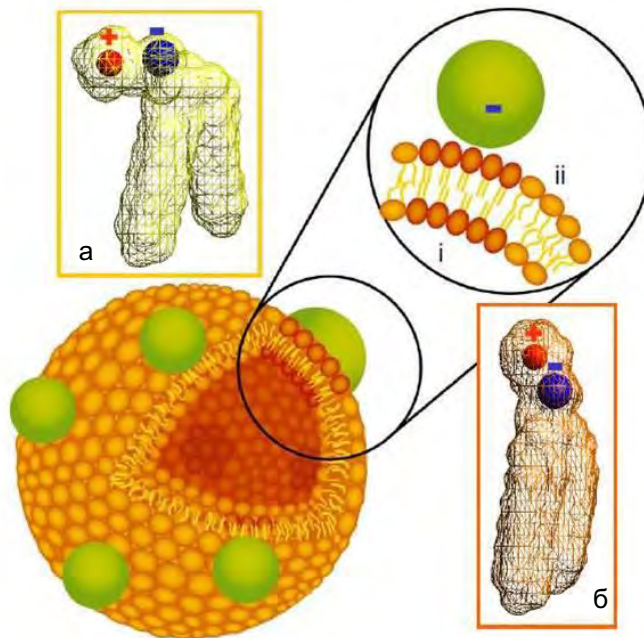


Рис. 6. Зв'язок між видом заряду наночастинок та локальними змінами у щільності фосфоліпідів біомембрани: а – просторова орієнтація молекули фосфатидилхоліну при взаємодії з катіонною наночастинкою; б – з аніонною наночастинкою; і – цитозольна поверхня мембрани; ii – зовнішня поверхня мембрани [73]

ність порівняно з оксидом. Автори дійшли до висновку, що цитотоксичність наночастинок алюмінію безпосередньо залежить від хімічної їх будови – покриття поверхні частинок киснем оксидів зменшувало токсичні ефекти.

Деякі автори вважають, що наночастинки срібла не мають прямого впливу на протеїни біомембрани. Той факт, що антибактеріальна активність наноструктурованого срібла перевищує активність срібла нітрату пояснюється здатністю наносрібла поступово та протягом тривалого часу постійно вивільняти іони срібла у середовище [18, 56].

Отже, наночастинки можуть впливати на такі властивості ліпідного бішару, як цілісність, локальна щільність ліпідів та поверхневий натяг. Але й мембрана, як складна комплексна структура, здатна самостійно адаптуватися до зовнішнього впливу завдяки природним засобам ауторепарації [34].

ВИСНОВКИ

Біомембрана – одна з найважливіших складових живої клітини. Структурною основою біомембрани є ліпідний бішар, що забезпечує цілісність клітини завдяки характерній будові та амфіфільним властивостям компонентів та захищає внутрішній вміст клітини від дії факторів зовнішнього середовища. Важливим компонентом мембрани є білкова складова, що забезпечує виконання сигнальної, транспортної та каталітичної функції.

Погляди на структуру та функції біомембрани еволюціонували разом із розвитком нових засобів та методів дослідження. Відомо, що компонентам мембрани властива аномальна дифузія. Плазматична мембрана поділена на комірочки мінімального розміру 10 нм. Для переходу з однієї комірочки у іншу молекули повинні здійснити «стрибок». Для пояснення феномену аномальної дифузії були запропоновані модель

мембранного актинового цитоскелетного паркану та модель стовпів із закріплених трансмембранних протеїнів. Отже, нині біомембрана розглядається як розділена на нанокмірки рідина, у якій ліпіди та протеїни підлягають аномальній (стрибокподібній) дифузії.

Біомембранам властива гетерогенність, що пояснюється просторовим обмеженням білків та ліпідів у нанорозмірних ділянках. Зміна рухливості та тимчасове скупчення молекул у цих доменах – ліпідних рафтах – може мати прямий вплив на можливість здійснення таких клітинних процесів, як збудливість, презентація антигенів та міжклітинні взаємодії. Ліпідні рафти розглядаються як нанорозмірні локальні ділянки фазового переходу – місця, щільно укомплектовані сфінголіпідами, у яких дещо втрачаються властивості мембрани як рідини. Ліпідні рафти є місцем накопичення певних мембранних білків, що уможливує їх функціонування у комплексі для перетворення сигналів зовнішнього середовища у внутрішньоклітинну відповідь, а також для участі у процесах екзотачендоцитозу, клітинної адгезії та мембранного транспорту.

У нормі ліпідний бішар непроникний для гідрофільних та заряджених молекул, для транспортування яких існують спеціалізовані трансмембранні протеїни – іонні канали. Біологічні іонні канали доцільно розглядати як наповнені водою нанорозмірні пори. Просторове обмеження рідини у нанопорі призводить до появи нових властивостей. Феномен зміни властивостей рідини у нанорозмірних каналах є об'єктом великого наукового інтересу, адже лежить у основі біологічних процесів, що відбуваються у природних наноканалах біомембрани. Дослідження даного феномену – завдання нанофлюїдики – нової науки, що вивчає властивості рідин у нанорозмірних структурах. Нанофлюїдика знаходить біотехнологічне застосування у створенні «лабораторій на чипі» – високочутливих аналі-

тичних засобів, що здатні ізолювати та досліджувати окремі макромолекули.

Здобуття глибоких і всебічних знань у сфері взаємодії наночастинок з біологічними системами, зокрема з біомембраною, є важливим завданням при визначенні цитотоксичності наночастинок та напрямків їх потенційного застосування як медикаментів та засобів доставки активних речовин. Специфіка взаємодії наночастинок з біомембраною визначається їх природою, їх розміром, площею вільної поверхні, наявністю покриттів та гідрофобним ефектом.

Цікавим є дослідження принципів взаємодії компонентів біомембрани з нанометалами, що є перспективними антибактеріальними агентами, а також застосовуються у діагностиці захворювань та як засоби терапевтичної доставки активних речовин.

Вичерпні знання зі структури та функцій біомембрани як наноструктури, а також дані щодо впливу на неї наночастинок допоможуть достеменно дослідити її природу та створити нові високоефективні фармакотерапевтичні та діагностичні засоби, а також виявити токсикологічні властивості наноматеріалів.

И.С. Чекман, П.В. Симонов

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ БИОМЕМБРАН: ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ

Обобщены современные взгляды на структуру и функции биомембраны, роли липидного, белкового и углеводного ее компонентов в поддержании жизнедеятельности клетки. Рассмотрена современная модель строения биомембраны – разделенной на наночастицы жидкости, в которой липиды и протеины подвержены аномальной диффузии. Внимание уделено теории существования липидных рафтов – наноразмерных мембранных доменов. Проведен анализ литературы и научных исследований касательно наноприроды ионных каналов, закономерностей влияния наночастиц на биомембрану. Показано, что данные о структуре, функциях биомембраны и характер влияния на нее наночастиц являются необходимыми для создания новых высокоэффективных терапевтических и диагностических средств, а также для исследования токсикологических свойств нанобъектов.

Ключевые слова: биомембрана, липидный бислой, протеин, диффузия, липидный рафт, наночастица.

I.S. Chekman, P.V. Simonov

STRUCTURE AND FUNCTION OF BIOMEMBRANES: INFLUENCE OF NANOPARTICLES

The up-to-date view on a biomembrane structure and functions and the role of lipid, protein and carbohydrate biomembrane components in maintenance of a cell vital activity is summarized in this article. The up-to-date model of a biomembrane structure as a nanocompartmentalized fluid in which lipids and proteins undergo anomalous diffusion is examined. An attention is paid to lipid rafts existence as nanoscaled membrane domains. The analysis of literature and research results concerning the nanonature of ion channels and the mechanism of influence of nanoparticles on a biomembrane is carried out. It is shown that the data on structure and functions of a biomembrane and the nature of influence of nanoparticles on it is necessary to create new high-performance therapeutic agents, diagnostic tools and to study nanoobjects' toxicological properties.

Key words: biomembrane, lipid bilayer, protein, diffusion, lipid raft, nanoparticle.

O.O. Bogomoletz National Medical University, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. 5th ed. – New York: Garland Publishing, 2008. – 1601 p.
2. Arolas J.L., Aviles F.X., Chang J.Y., Ventura S. Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle // Trends. Biochem. Sci. – 2006. – **31**, №5. – P. 292–301.
3. Banerji S.K., Hayes M.A. Examination of nonendocytic bulk transport of nanoparticles across phospholipid membranes // Langmuir. – 2007. – **23**, №6. – P. 3305–3313.
4. Bates I.R., Wiseman P.W., Hanrahan J.W. Investigating membrane protein dynamics in living cells // Biochem. Cell. Biol. – 2006. – **84**, №6. – P. 825–831.
5. Beerlink A., Mell M., Tolkiehn M., Salditt T. Hard x-ray phase contrast imaging of black lipid membranes // Appl. Phys. Lett. – 2009. – **95**. – P. 1–3.
6. Bocquet L., Charlaix E. Nanofluidics, from bulk to interfaces // Chem. Soc. Rev. – 2010. – **39**, №3. – P. 1073–1095.
7. Bozhevolnyi S.I. Silver nanoparticles. – Aalborg: Aalborg University, Faculty of physics and nanotechnology, 2005. – 81 p.
8. Bradshaw R.A., Dennis E.A. Handbook of cell signaling. 2nd edition. – Oxford: Acad. Press, 2009. – P. 201–207.

9. Clapham D.E. Symmetry, selectivity, and the 2003 Nobel Prize // *Cell*. – 2003. – **115**, №6. – P. 641–646.
10. De Groot B.L., Grubmuller H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF // *Science*. – 2001. – **294**, №5550. – P. 2353–2357.
11. Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2003. – **4**, №5. – P. 414–418.
12. Eggeling C., Ringemann C., Medda R., Schwarzmann G., Sandhoff K., Polyakova S., Belov V.N., Hein B., Middendorff C., Schonle A., Hell S.W. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell // *Nature*. – 2009. – **457**, №7233. – P. 1159–1162.
13. Eijkel J.C.T., Berg A. Nanofluidics: what is it and what can we expect from it? // *Microfluidics and Nanofluidics*. – 2005. – **1**, №3. – P. 249–267.
14. Elofsson A., Heijne G. Membrane protein structure: prediction versus reality // *Annu. Rev. Biochem.* – 2007. – **76**. – P. 125–140.
15. Engelman D.M. Membranes are more mosaic than fluid // *Nature*. – 2005. – **438**, №7068. – P. 578–580.
16. Fornasiero F., In J.B., Kim S., Park H.G., Wang Y., Grigoropoulos C.P., Noy A., Bakajin O. pH-tunable ion selectivity in carbon nanotube pores // *Langmuir*. – 2010. – **26**, №18. – P. 14848–14853.
17. Ginzburg V.V., Balijepalli S. Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes // *Nano Lett.* – 2007. – **7**, №12. – P. 3716–3722.
18. Gogoi S.K., Gopinath P., Paul A., Ramesh A., Ghosh S.S., Chattopadhyay A. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles // *Langmuir*. – 2006. – **22**, №22. – P. 9322–9328.
19. Gurtovenko A.A., Onike O.I., Anwar J. Chemically induced phospholipid translocation across biological membranes // *Langmuir*. – 2008. – **24**, №17. – P. 9656–9660.
20. Haustein E., Schwille P. Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2007. – **36**. – P. 151–169.
21. Helms J.B., Zurzolo C. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking // *Traffic*. – 2004. – **5**, №4. – P. 247–254.
22. Hong S., Bielinska A.U., Mecke A., Keszlner B., Beals J.L., Shi X., Balogh L., Orr B.G., Baker J.R., Holl M.M.B. Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – **15**, №4. – P. 774–782.
23. Hou X., Yang F., Li L., Song Y., Jiang L., Zhu D. A biomimetic asymmetric responsive single nanochannel // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2010. – **132**, №33. – P. 11736–11742.
24. Kik R.A. Lipid bilayers and interfaces // Thesis Wageningen University, the Netherlands. – 2007. – P. 1–169.
25. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C., Kim Y., Lee Y., Jeong D.H., Cho M. Antimicrobial effects of silver nanoparticles // *Nanomedicine*. – 2007. – **3**, №1. – P. 95–101.
26. Klippstein R., Fernandez-Montesinos R., Castillo P.M., Zaderenko A.P., Pozo D. Silver nanoparticles. – Vienna: IN-TECH Books, 2010. – P. 309–324.
27. Koopman M. Nanoscale cell membrane organization: a near-field optical view. – Enschede: University of Twente, 2006. – 142 p.
28. Kraszewski S., Tarek M., Treptow W., Ramseyer C. Affinity of C60 neat fullerenes with membrane proteins: a computational study on potassium channels // *ACS Nano*. – 2010. – **4**, №7. – P. 4158–4164.
29. Krishnamurthy V., Monfared S., Cornell B. Ion channel biosensors – part I: construction, operation, and clinical studies // *IEEE Transactions on Nanotechnology*. – 2010. – **9**, №3. – P. 313–322.
30. Kusumi A., Ike H., Nakada C., Murase K., Fujiwara T. Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules // *Semin. Immunol.* – 2005. – **17**, №1. – P. 3–21.
31. Kusumi A., Nakada C., Ritchie K., Murase K., Suzuki K., Murakoshi H., Kasai R.S., Kondo J., Fujiwara T. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2005. – **34**. – P. 351–378.
32. Kusumi A., Shirai Y.M., Koyama-Honda I., Suzuki K., Fujiwara T. Hierarchical organization of the plasma membrane: investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy // *FEBS Lett.* – 2010. – **584**, №9. – P. 1814–1823.
33. Leroueil P.R., Hong S., Mecke A., Baker J.R., Orr B.G., Holl M.M.B. Nanoparticle interaction with biological membranes: does nanotechnology present a Janus face? // *Acc. Chem. Res.* – 2007. – **40**, №5. – P. 335–342.
34. Li Y., Chen X., Gu N. Computational investigation of interaction between nanoparticles and membranes: hydrophobic/hydrophilic effect // *J. Phys. Chem. B*. – 2008. – **112**, №51. – P. 16647–16653.
35. Li-Fries J. Ion channels in mixed tethered Bilayer lipid membranes. – In: Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2007. – P. 6–12.
36. Lipowsky R., Sackmann E. Handbook of biological physics. – Elsevier Science B.V., 1995. – P. 491–519.
37. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L., Darnell J. Molecular cell biology. 5th ed. – New York: W. H. Freeman, 2003. – 973 p.

38. Maxfield F.R. Plasma membrane microdomains // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2002. – **14**, №4. – P. 483–487.
39. Mayor S., Rao M. Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface // *Traffic.* – 2004. – **5**, №4. – P. 231–240.
40. Owen D.M., Williamson D., Rentero C., Gaus K. Quantitative microscopy: protein dynamics and membrane organization // *Ibid.* – 2009. – **10**, №8. – P. 962–971.
41. Pal S., Tak Y.K., Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – **73**, №6. – P. 1712–1720.
42. Parameswari E., Udayasoorian C., Sebastian S.P., Jayabalakrishnan R.M. The bactericidal potential of silver nanoparticles // *Intern. Res. J. Biotechnol.* – 2010. – **1**, №3. – P. 44–49.
43. Parton R.G., Richards A.A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms // *Traffic.* – 2003. – **4**, №11. – P. 724–738.
44. Parton R.G., Hancock J.F. Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras // *Trends Cell. Biol.* – 2004. – **14**, №3. – P. 141–147.
45. Pomorski T., Holthuis J.C., Herrmann A., Meer G. Tracking down lipid flippases and their biological functions // *J. Cell. Sci.* – 2004. – **117**, №6. – P. 805–813.
46. Qiao R., Roberts A.P., Mount A.S., Klaine S.J., Ke P.C. Translocation of C60 and its derivatives across a lipid bilayer // *Nano Lett.* – 2007. – **7**, №3. – P. 614–619.
47. Raffi M., Hussain F., Bhatti T.M., Akhter J.I., Hameed A., Hasan M.M. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224 // *J. Mater. Sci. Technol.* – 2008. – **24**, №2. – P. 192–196.
48. Rayan G., Guet J., Taulier N., Pincet F., Urbach W. Recent applications of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to membrane bio-macromolecules // *Sensors.* – 2010. – **10**. – P. 5927–5948.
49. Reitsma S., Slaaf D.W., Vink H., Zandvoort M.A.M.J., Egbring M.G.A. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization // *Pflugers Arch.* – 2007. – **454**, №3. – P. 345–359.
50. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis // *Biochem. J.* – 2004. – **377**. – P. 159–169.
51. Ries R.S., Choi H., Blunck R., Bezanilla F., Heath J.R. Black lipid membranes: visualizing the structure, dynamics, and substrate dependence of membranes // *J. Phys. Chem. B.* – 2004. – **108**, №41. – P. 16040–16049.
52. Ritchie K., Iino R., Fujiwara T., Murase K., Kusumi A. The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques (Review) // *Mol. Membr. Biol.* – 2003. – **20**, №1. – P. 13–18.
53. Roger M., Peletier M.A. Cell membranes, lipid bilayers, and the elastic functional // *Proc. Appl. Math. Mech.* – 2006. – **6**, №1. – P. 11–14.
54. Roiter Y., Ornatska M., Rammohan A.R., Balakrishnan J., Heine D.R., Minko S. Interaction of nanoparticles with lipid membrane // *Nano Lett.* – 2008. – **8**, №3. – P. 941–944.
55. Roiter Y., Ornatska M., Rammohan A.R., Balakrishnan J., Heine D.R., Minko S. Interaction of lipid membrane with nanostructured surfaces // *Langmuir.* – 2009. – **25**, №11. – P. 6287–6299.
56. Ruparelia J.P., Chatterjee A.K., Duttagupta S.P., Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles // *Acta Biomater.* – 2008. – **4**, №3. – P. 707–716.
57. Salaun C., James D.J., Chamberlain L.H. Lipid rafts and the regulation of exocytosis // *Traffic.* – 2004. – **5**, №4. – P. 255–264.
58. Saxton M.J., Jacobson K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1997. – **26**. – P. 373–399.
59. Scarlata S. Membrane protein structure // *Biophysics Textbook Online.* – 2004. – P. 1–23.
60. Schmuhl R., Nijdam W., Sekulic J., Chowdhury S.R., Rijn C.J.M., Berg A., Elshof J.E. Blank D.H.A. Si-supported mesoporous and microporous oxide interconnects as electrophoretic gates for application in microfluidic devices // *Anal. Chem.* – 2005. – **77**, №1. – P. 178–184.
61. Silvius J.R. Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains: insights from model-membrane studies // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 2005. – **1746**, №3. – P. 193–202.
62. Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes // *Nature.* – 1997. – **387**, №6633. – P. 569–572.
63. Simons K., Vaz W.L. Model systems, lipid rafts, and cell membranes // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2004. – **33**. – P. 269–295.
64. Simons K., Gerl M.J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2010. – **11**, №10. – P. 688–699.
65. Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // *Science.* – 1972. – **175**, №23. – P. 720–731.
66. Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria // *J. Colloid Interface Sci.* – 2004. – **275**, №1. – P. 177–182.
67. Stoimenov P.K., Klinger R.L., Marchin G.L., Klabunde K.J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents // *Langmuir.* – 2002. – **18**, №17. – P. 6679–6686.
68. Streek M., Schmid F., Duong T.T., Ros A. Mechanisms of DNA separation in entropic trap arrays: a Brownian dynamics simulation // *J. Biotechnol.* – 2004. – **112**, №1–2. – P. 79–89.
69. Subczynski W.K., Wisniewska A. Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions // *Acta Biochim. Pol.* – 2000. – **47**, №3. – P. 613–625.
70. Tanford C. The hydrophobic effect and the organization

- of living matter // Science. – 1978. – 200, №4345. – P. 1012–1018.
71. Tas N.R., Mela P., Kramer T., Berenschot J.W., Berg A. Capillarity induced negative pressure of water plugs in nanochannels // Nano Letters. – 2003. – 3, №11. – P. 1537–1540.
72. Wagner A.J., Bleckmann C.A., Murdock R.C., Schrand A.M., Schlager J.J., Hussain S.M. Cellular interaction of different forms of aluminum nanoparticles in rat alveolar macrophages // J. Phys. Chem. B. – 2007. – 111, №25. – P. 7353–7359.
73. Wang B., Zhang L., Bae S.C., Granick S. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – 105, №47. – P. 18171–18175.
74. Yeagle P.L. Cell Membrane Features // Encycloped. Life Sci. – 2001. – P. 1–7.

Нац. мед. ун-т імені О.О. Богомольця
E-mail: simonovpavlo@ukr.net

Матеріал надійшов до
редакції 05.04.2011