

Mogući oblici zatvorene biološke membrane

Dujmović, Viktorija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:354075>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-10**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno – matematički fakultet

Mogući oblici zatvorene biološke membrane

Završni rad

Viktorija Dujmović

Split, rujan 2021.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Odjel za fiziku
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

Mogući oblici zatvorene biološke membrane

Viktorija Dujmović

Sveučilišni preddiplomski studij Fizika

Sažetak:

Membrana biološke stanice zbog kompleksnosti svoje kemijske strukture ima niz zanimljivih fizičkih svojstava koja druge tvari ili oblici tvari nemaju, a koja stanici omogućavaju obilje bioloških funkcija. Specifično, u ovom radu nas zanima vid elastičnosti svojstven fosfolipidnom dvosloju membrana koji rezultira nizom mogućih oblika stanice. Polazeći od eksperimentalno dobivenih oblika (izduženi, spljošteni, diskocita, stomatocita...) i podataka o oblicima razvijamo teoriju elastičnosti zatvorenih bioloških membrana. Podlogu teorije čine mehanika te diferencijalna geometrija. Po definiranju strukture uvodimo Helfrichovu teoriju elastičnosti gotovo ravne membrane (1973.), a onda pomoću te teorije rješavamo problem zatvorene membrane. Iz dobivenog izraza za energiju zatvorene membrane izvodimo dvodimenzijski fazni dijagram dvaju parametara koja ga razapinju i oblika membrana. Na faznom dijagramu dobivamo poklapanja teorijskih graničnih linija među oblicima i eksperimentalnih mjerenja. Premda se temelji na osnovnim konceptima elastičnosti obične fizičke membrane, izložena teorija elastičnosti zatvorene biološke membrane iznenađujuće vjerno objašnjava nađene stvarne oblike bioloških membrana.

Ključne riječi: biološke membrane, vezikule, Helfrichova teorija, elastičnost membrana, fazni dijagram oblika

Rad sadrži: 18 stranica, 7 slika, 0 tablica, 8 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Larisa Zoranić

Neposredni voditelj: dr. rer. nat. Mislav Cvitković

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Larisa Zoranić,
dr. rer. nat. Mislav Cvitković, mag. phys.,
prof. dr. sc. Ante Bilušić

Rad prihvaćen: 28. rujna 2021.

Rad je pohranjen u Knjižnici Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

Basic documentation card

University of Split
Faculty of Science
Department of Physics
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Bachelor thesis

Possible shapes of closed biological membranes

Viktorija Dujmović

University undergraduate study programme Physics

Abstract:

Due to complexity of its chemical makeup, the membrane of a biological cell has a number of interesting physical properties that other materials or material forms do not have, which also enable many biological functions of a cell. Specifically, in this work we consider a type of elasticity specific to membranes' phospholipid bilayer which manifests in a number of potential cell shapes. Based on the experimentally obtained shapes (prolate, oblate, discocyte, stomatocyte, ...) and the data on the known shapes, we develop a theory of elasticity of closed biological membranes from the first principles of mechanics and differential geometry. Having defined the structure, we introduce Helfrich's theory of the almost planar membrane (1973) and use it to solve the problem of a closed membrane. Given the relation for the free energy of a closed membrane, we develop a two-dimensional phase diagram of the membrane shapes. An agreement is observed between theoretically and experimentally found border lines between membrane shapes. Although it is based on basic concepts of elasticity of a regular physical membrane, the presented theory of elasticity of a closed biological membrane explains the observed shapes of biological membranes in a surprisingly faithful manner.

Keywords: biological membranes, vesicles, Helfrich's theory, membrane elasticity, phase diagram of shapes

Thesis consists of: 18 pages, 7 figures, 0 tables, 8 references. Original language: Croatian.

Supervisor: Asoc. Prof. Dr. Larisa Zoranić

Leader: Dr. Mislav Cvitković, Mag. Phys.

Reviewers: Asoc. Prof. Dr. Larisa Zoranić,
Dr. Mislav Cvitković,
Prof. Dr. Ante Bilušić

Thesis accepted: September 28, 2021

Thesis is deposited in the library of the Faculty of Science, University of Split.

Sadržaj

1	Uvod	1
2	Model elastičnosti membrane [3]	4
2.1	Energija lokalne zakrivljenosti u klasičnom modelu	4
2.2	Gotovo planarne membrane, duljina postojanosti	4
2.3	Problem lipidnog dvosloja	6
3	Zatvorena biološka membrana [3]	8
3.1	Energija zatvorene membrane	8
3.1.1	Gauss-Bonnetov teorem	8
3.1.2	Osmotski tlak	8
3.1.3	Minimalizacija s obzirom na gustoću lipida	8
3.1.4	Efektivna ograničenja površine i volumena	9
3.1.5	ADE model	10
3.2	Mogući oblici vezikule	10
3.2.1	Ekspanzije oko sfere	12
3.2.2	Osnosimetrični oblici	12
3.3	Fazni dijagram oblika	13
4	Zaključak	16

1 Uvod

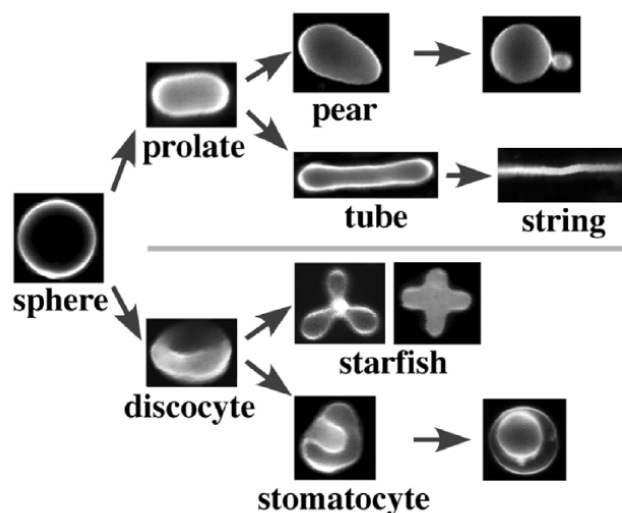
Lipidi su amfifilne molekule koje se sastoje od hidrofilne *glave* i hidrofobnog *repa*. Nađu li se lipidi u vodenoj otopini, zbog polarnosti se okupljaju u tenzidne agregate. Oblici tih agregata ovise o dimenzijskim karakteristikama *glava* i *repora*. Definiramo parametar zbijanja

$$P := \frac{v}{la}, \quad (1.1)$$

gdje je a površina koju *glava* molekule ima u agregatu, v volumen lipida te l duljina *repa*. Ovisno o iznosu parametra zbijanja P prepoznamo koji oblik će poprimiti tenzidni agregat. Za iznose parametra $P \leq \frac{1}{3}$ lipidi se slažu u sferne agregate, odnosno micelle. Cilindrični agregati zadovoljavaju uvjet $\frac{1}{3} \leq P \leq \frac{1}{2}$, dok za planarne agregate vrijedi $\frac{1}{2} \leq P \leq 1$ [1].

Membrane u pravilu sačinjava lipidni dvosloj, koji je planarni agregat. Iz izraza (1.1) primjećujemo da je volumen v približno jednak umnošku al , odnosno da lipidi koji tvore membranu imaju približno cilindričan oblik koji im osiguravaju dva *repa*. Kod bioloških membrana, lipidni se dvosloj sastoji od raznih lipida te ostalih amfifilnih molekula.

Kako je lipidni dvosloj energijski teško održiv na rubovima gdje su izloženi hidrofobni *repovi*, membrane formiraju zatvorene *vrećice* vezikule. Promjer vezikula iznosi od nekoliko stotina angstrema do par milimetara, dok je debljina lipidnog dvosloja u nanometrима [2, 3]. Promatranjima vezikula otkriveni su brojni oblici kao i promjene oblika uzrokovane promjenom temperature ili osmotskog tlaka.



Slika 1: Prikaz lančano mogućih transformacija oblika vezikula pri promjeni osmotskog tlaka. (Slika preuzeta iz [4].)

Iz sfernog oblika vezikula promjenom uvjeta možemo dobiti dva karakteristična oblika kao što je prikazano na slici 1. Promjenu iz sfernog u izduljeni (eng. *prolate*) oblik nazivamo pupanjem (eng. *budding transition*). Daljnim povećavanjem temperature ili osmotskog tlaka

okoline oblik se mijenja u oblik kruške (eng. *pear*) te iz njega u dvostruku sfernu vezikulu ili u oblik cijevi (eng. *tube*) te iz njega u lanac (eng. *string*).

U drugom smjeru može doći do užimanja (eng. *re-entrant transition*) gdje iz sfernog dobijemo oblik sličan izduljenome koji je u srednjem dijelu *stegnut*. Primjer takvog oblika je oblik 4 na slici 2.

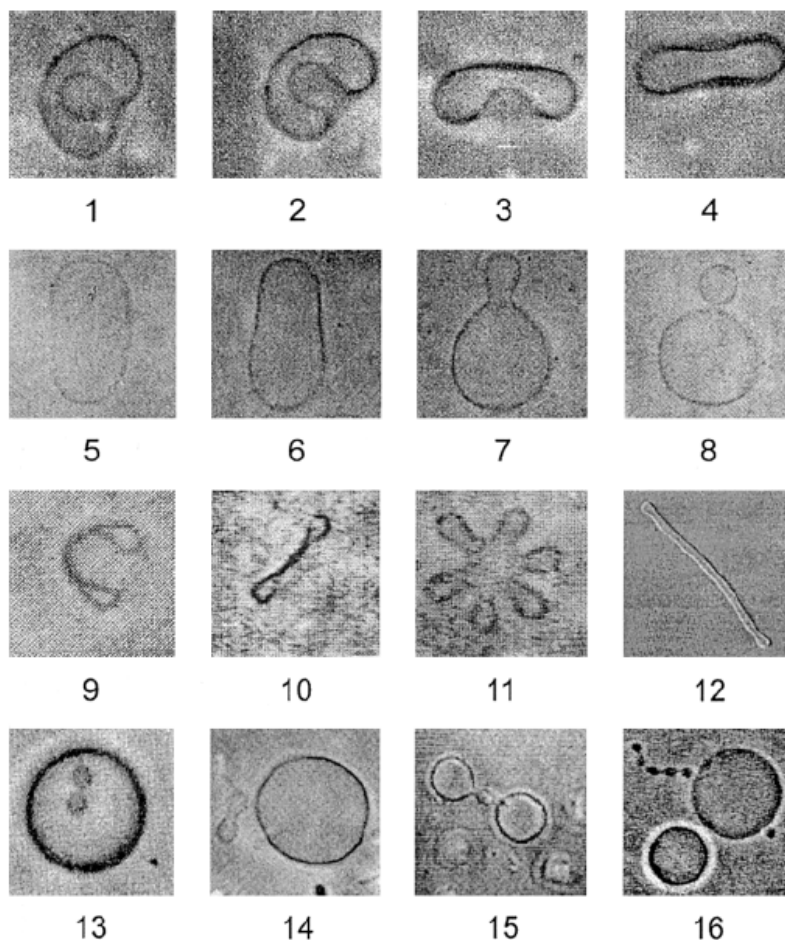
Uz navedene promjene može doći i do diskocitne/stomatocitne promjene (eng. *discocyte/stomatocyte transition*) pri kojoj iz spljoštenih oblika razbijanjem reflektivne simetrije nastaje oblik kojeg nazivamo diskocit (eng. *discocyte*). Posljedično iz diskocita povećanjima temperature ili osmotskog tlaka nastaju stomatociti (eng. *stomatocyte*). Na slici 1 vidimo da diskociti i stomatociti imaju oblike koji prepoznajemo kao crvene krvne stanice (eritrociti). Stoga su brojna eksperimentalna istraživanja vezana za promjene oblika membrana provedena na eritrocitima. Uz stomatocite, mogući oblici su i zvjezdasti (eng. *starfish*).

Na slici 2 prikazani su razni oblici membrana dobiveni eksperimentalno te snimljeni optičkim mikroskopom. Oblici 1-4 su karakteristični spljošteni (eng. *oblate*) oblici, dok su oblici 5-8 karakteristični izduljeni oblici. Oblici 9-12 su karakteristični za oblike manjih volumena. Posebno su zanimljivi oblici 13-16 koje karakteriziraju uski *vratovi* [5]. Takvi oblici strukturno imaju jednu (ili više) sferu *majku* od koje su *vratom* odvojene manje sfere. Te manje sfere mogu tvoriti lanac kao što je vidljivo na obliku 16.

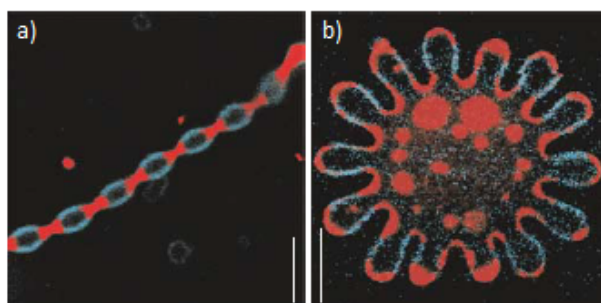
Lanac malih sfera vidimo i na slici 3 a) koja je dobivena dvofotonskom mikroskopijom. Dvofotonska mikroskopija omogućava kvalitetnije promatranje bioloških struktura te je značajan broj novih eksperimenata proveden tom metodom. Dvofotonska mikroskopija omogućava mjerenja na dva kanala (na slici crveni i plavi) te nam daje više informacija o strukturi tkiva. Na slici 3 tako vidimo da su područja veće zakrivljenosti označena crveno, a područja manje zakrivljenosti plavo. U današnje vrijeme koriste se i trofotonska i višefotonska mikroskopija. Na slici 3 b) vidimo vezikulu zvjezdastog oblika s više krakova. Takva struktura mnogo je kompleksnija od one na slikama 1 i 2. Snimljena je u uvjetima visoke temperature te nije stabilna kao i jednostavnije strukture, odnosno teško je održati uvjete takvima da ne kolabira u zvijezdu s manje krakova [6].

Promatrajući dobivene oblike uviđamo njihovu simetriju koja implicira da ovi oblici nastaju po točno određenom pravilu. Teoriju elastičnih svojstava membrane dao je Wolfgang Helfrich u svom radu 1973. Uz teoriju predložio je eksperimente koji se potvrdili njegovu teoriju. Uz predložene, provedeno je još eksperimenata te se pokazalo da i za oblike koje Helfrich u svom radu nije pretpostavio teorija daje dobar opis.

U ovom radu ćemo se upoznati sa Helfrichovom teorijom elastičnih svojstava membrane te vidjeti kakve uvjete zadovoljavaju oblici koji su eksperimentalno dobiveni. U prvom dijelu rada ćemo razmatrati problem dvodimenzionalne ravne membrane. Nakon toga, u drugom dijelu, posvetit ćemo se problemima zatvorene membrane, odnosno vezikula.



Slika 2: *Mogući oblici vezikula dobiveni mikroskopijom kontrasta faze. Oblici 1-3 su klase oblika posude (eng. cup-shape), oblik 4 ima oblik diska (eng. disc-shape). Oblik 5 spada u klasu oblika cigarete (eng. cigar-shape), a oblici 6-8 u klasu oblika kruške (eng. pear-shape). Oblik 9 se naziva kodocit (eng. codocyte), 10 torocit (eng. torocyte), 11 zvijezda (eng. starfish), a 12 crv (eng. worm). Oblici u posljednjem redu prikazuju vratove koji spajaju gotovo sferne vezikule. Oblik 13 sadrži dva manja sferna oblika u unutrašnjosti, oblik 14 dva manja sferna oblika s vanjske strane. Oblik 15 prikazuje dva veća sferna oblika između kojih se nalazi jedan manji, a oblik 16 niz od pet malih sfera te još jedne male sfere s druge strane majke sfere. (Slika preuzeta iz [5].)*



Slika 3: *Vezikule snimljene dvofotonskom mikroskopijom prikazane superpozicijom plavog i crvenog kanala. Slike su dobivene na temperaturama a) 44°C i b) 50°C. Skala iznosi 5 μm . (Slika preuzeta iz [6].)*

2 Model elastičnosti membrane [3]

Prije nego što krenemo s razmatranjem kako određeni uvjeti pogoduju oblicima koje ostvaruje vezikula potrebno je definirati ponašanje 2D membrane. Idući model predstavljamo pomoću ideje membrane koja je razložena poput lista papira, tj. planarna, ne tvori vezikulu, te je njena debljina značajno manja od odstale dvije dimenzije, odnosno spada u 2D objekte.

2.1 Energija lokalne zakrivljenosti u klasičnom modelu

Promatramo membranu kao 2D površinu $\mathbf{R}(s_1, s_2)$ razapetu u (trodimenzijskom) 3D prostoru, gdje su s_1 i s_2 proizvoljne unutarnje koordinate. Takva površina okarakterizirana je s dva polumjera zakrivljenosti R_1 i R_2 . Na slici 4 prikazani su polumjeri zakrivljenosti proizvoljne točke na zakrivljenoj površini. Definiramo glavnu zakrivljenost H te Gaussovu zakrivljenost K preko zadanih polumjera:

$$H \equiv \frac{\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}}{2}, \quad (2.1)$$

$$K \equiv \frac{1}{R_1 R_2}. \quad (2.2)$$

Potrebno je uvesti tangencijalni vektor

$$\mathbf{R}_i = \partial_i \mathbf{R}(s_1, s_2), \quad i = s_1, s_2, \quad (2.3)$$

iz kojeg dobijemo metrički tenzor

$$g_{ij} = \mathbf{R}_i \mathbf{R}_j. \quad (2.4)$$

Determinantu tenzora označavamo s $g \equiv \det(g_{ij})$. Ona doprinosi elementu površine

$$dA = \sqrt{g} ds_1 ds_2. \quad (2.5)$$

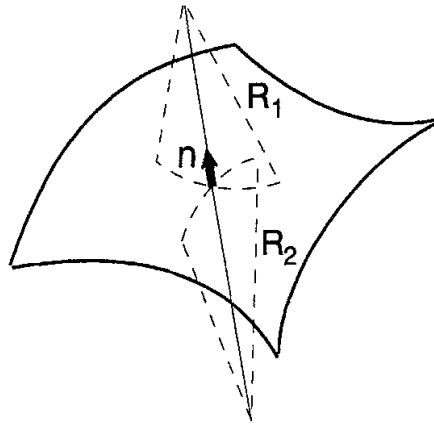
Gustoća slobodne energije lokalne zakrivljenosti u klasičnom modelu je definirana kao

$$f_0 \equiv \frac{\kappa}{2} (2H)^2 + \kappa_G K, \quad (2.6)$$

gdje je κ elastični modul savijanja koji opisuje opiranje membrane savijanju i κ_G Gaussov elastični modul savijanja, oba dimenzije energije [2].

2.2 Gotovo planarne membrane, duljina postojanosti

Nakon što smo defnitali geometrijske elemente zakrivljenosti potrebno je izračunati tu zakrivljenost. Koristimo se *Mongeovom parametrizacijom* koja je pogodna za prosječno



Slika 4: Shematski prikaz zakrivljenosti 2D površine pomoću dvaju polumjera R_1 i R_2 . Vektor \mathbf{n} normala je na površinu u odabranoj točki površine. (Slika preuzeta iz [3].)

horizontalne površine bez prevjesa. Mongeova paramterizacija svakoj točki površine u prostoru dodjeljuje visinu h od ravnine kao funkciju ortonormiranih koordinata x i y ravnine [7]. Definiramo pomak $h(\mathbf{x})$ orijentiran u ravnini $z = 0$, $\mathbf{x} = (x, y)$. Glavna zakrivljenost unutar Mongeove mjerne vrijednosti dana je s

$$\begin{aligned} 2H &= -\frac{\nabla^2 h + (\partial_x h)^2 \partial_y^2 h + (\partial_y h)^2 \partial_x^2 h - 2\partial_x h \partial_y h \partial_x \partial_y h}{[1 + (\nabla h)^2]^{\frac{3}{2}}} \\ &= -\nabla^2 h \{1 + O[(\nabla h)^2]\}, \end{aligned} \quad (2.7)$$

a Gaussova zakrivljenost s

$$K = \frac{\partial_x^2 h \partial_y^2 h - (\partial_x \partial_y h)^2}{[1 + (\nabla h)^2]^2}. \quad (2.8)$$

Uvodimo Fourierov transformat

$$h(\mathbf{x}) \equiv \int \frac{d^2 q}{(2\pi)^2} h_{\mathbf{q}} e^{i\mathbf{q}\mathbf{x}}. \quad (2.9)$$

Tada nam je energija savijanja (eng. *bending energy*), dobivena uvrštavanjem (2.7), (2.8) i (2.9) u izraz (2.6), dana izrazom

$$\begin{aligned} F_0 &= \int dx dy \sqrt{g} f_0(x, y) = \int dx dy \sqrt{g} \left(\frac{\kappa}{2} (2H)^2 + \kappa_G K \right) = \frac{\kappa}{2} \int dx dy \sqrt{g} (-\nabla^2 h)^2 \\ &\approx \frac{\kappa}{2} \int \frac{d^2 q}{(2\pi)^2} q^4 h_{\mathbf{q}} h_{\mathbf{q}}^* \equiv \frac{1}{2} \int \frac{d^2 q}{(2\pi)^2} E_0(q) h_{\mathbf{q}} h_{\mathbf{q}}^*, \end{aligned} \quad (2.10)$$

gdje je sa $*$ označen kompleksno konjugirani izraz, a energija moda savijanja definirana kao $E_0(q) \equiv \kappa q^4$. Izraz za Gaussovu zakrivljenost totalna je divergencija tako da njen integral

iščezava. Iz izraza (2.10) očekivana termalna vrijednost $\langle h_{\mathbf{q}} h_{\mathbf{q}}^* \rangle$ definirana preko Boltzmannove težine $\exp(-F_0/k_B T)$ iznosi

$$\langle h_{\mathbf{q}} h_{\mathbf{q}}^* \rangle = \frac{k_B T}{E_0(q)} (2\pi)^2 \delta(\mathbf{q} - \mathbf{q}'). \quad (2.11)$$

Slijedi

$$\langle (\nabla h)^2 \rangle = \int \frac{d^2 q}{(2\pi)^2} \int \frac{d^2 q'}{(2\pi)^2} \mathbf{q} \mathbf{q}' \langle h_{\mathbf{q}} h_{\mathbf{q}'}^* \rangle = \frac{k_B T}{2\pi\kappa} \int_{1/L}^{1/a} \frac{dq}{q} = \frac{k_B T}{2\pi\kappa} \ln\left(\frac{L}{a}\right), \quad (2.12)$$

gdje je L linearno proširenje membrane, a a molekularni odsječak reda veličine nekoliko nanometara. U izrazu (2.10) zanemarujemo izraze višeg reda ukoliko je zadovoljen uvjet $\langle (\nabla h)^2 \rangle \ll 1$. Stoga govorimo o gotovo planarnim membranama samo ako je $L \ll L_p$, gdje je duljina postojanosti L_p dana izrazom

$$L_p \equiv a e^{\frac{2\pi\kappa}{k_B T}}. \quad (2.13)$$

Ukoliko izraze višeg reda u jednadžbi (2.10) tretiramo perturbativno možemo formulirati elastični modul savijanja ovisan o duljini [3]

$$\kappa(L) = \kappa - \frac{c}{4\pi} k_B T \ln\left(\frac{L}{a}\right). \quad (2.14)$$

Tipični interval vrijednosti elastičnog modula savijanja iznosi $(10 - 25)k_B T$. Po izrazu (2.13) vrijednosti L_p su tada u približnom rasponu $a e^{(60-150)}$. Usporedimo eksperimentalno dobiveni elastični modul savijanja sa onim nama poznatih materijala. Uzmemo li vrijednost Youngova modula elastičnosti za neki materijal između gume i plastike od približno 10^7 N/m² te mu odredimo debljinu $h = 5$ nm, dobijemo da je vrijednost elastičnog modula savijanja K približno jednaka $6k_B T$ što je nešto niža vrijednost od one dobivene za membrane [1].

2.3 Problem lipidnog dvosloja

Dubljom analizom izraza (2.6) pokazuje se da taj izraz ne može opisati tipične promjene oblika zbog toga što pri definiranju izraza nije uzeta u obzir struktura lipidnog dvosloja. Kako bismo iz reprezentacije monosloja prešli u reprezentaciju dvosloja potrebno je definirati nove fizičke veličine.

Definiramo gustoće broja molekula $\Phi^\pm(s_1, s_2)$ te gustoću broja molekula u ravnoteži Φ_0 , pri čemu svako odstupanje od ravnoteže doprinosi energiji

$$f_1^\pm \equiv \frac{k^m}{2} \left(\frac{\Phi^\pm}{\Phi_0 - 1} \right)^2, \quad (2.15)$$

gdje k^m interpretiramo kao modul elastične kompresije unutar svakog monosloja. Definiramo neutralno područje monoslojeva na udaljenosti d od središta dvosloja. Da bismo centralni problem u središte dvosloja tražimo projekciju gustoća na tu površinu

$$\Phi^\pm = \phi_{\text{proj}}^\pm (1 \mp 2dH + O(d^2K)). \quad (2.16)$$

Za malu zakrivljenost jednadžbu (2.15) možemo zapisati kao

$$f_1^\pm = \frac{k^m}{2} (\rho^\pm \mp 2dH)^2 \quad (2.17)$$

uvođenjem reducirane devijacije gustoće

$$\rho^\pm \equiv \frac{\Phi_{\text{proj}}^\pm}{\Phi_0 - 1}. \quad (2.18)$$

Ukupna energija simetričnog dvosloja je tada dana kao zbroj pojedinačnih doprinosa

$$f \equiv f_0 + f_1^+ + f_1^- = \frac{\kappa}{2} (2H)^2 + \kappa_G K + \frac{k^m}{2} [(\rho^+ - 2dH)^2 + (\rho^- + 2dH)^2]. \quad (2.19)$$

Uvodimo razliku reducirane gustoće te devijaciju od vrijednosti u ravnoteži

$$\rho \equiv \frac{\rho^+ - \rho^-}{2}, \quad (2.20)$$

$$\bar{\rho} \equiv \frac{\rho^+ + \rho^-}{2}. \quad (2.21)$$

Uz izraze (2.20) i (2.21), jednadžbu (2.19) možemo zapisati u obliku

$$f = \frac{\kappa}{2} (2H)^2 + \kappa_G K + k^m [\bar{\rho}^2 + (\rho - 2dH)^2]. \quad (2.22)$$

Ovim pristupom rješavanju dobili smo *konstantu vezivanja* (eng. *coupling constant*) između ρ i H zadanu preko parametara materijala k^m i d . Ipak problem smo opet riješili dosta primitivno zanemarujući ikakve interakcije među slojevima dvosloja te smo udaljenost d fiksirali. Takvi napredni koraci u ovom radu nam nisu potrebni za shvaćanje obuhvaćene materije.

3 Zatvorena biološka membrana [3]

3.1 Energija zatvorene membrane

Do energije zatvorene membrane dolazimo integracijom izraza (2.22) po površini vezikule

$$F = \frac{\kappa}{2} \oint dA(2H)^2 + \kappa_G \oint dAK + k^m \oint dA(\rho - 2dH)^2 + k^m \oint dA\bar{\rho}^2 + F_V. \quad (3.1)$$

Prva dva doprinosa energiji predstavio je Helfrich u svom radu 1973. [2]. Svaki od doprinosa u jednadžbi (3.1) ćemo detaljno razraditi.

3.1.1 Gauss-Bonnetov teorem

Drugi integral jednadžbe (3.1) ne ovisi o obliku vezikule. Po Gauss-Bonnetovom teoremu vrijednost integrala je $\kappa_G 4\pi(1-g)$, gdje je g genus vezikule [3]. Za fiksnu topologiju energetski doprinos je zanemarivo malen. Formalno pridodajemo vrijednost $\kappa_G = 0$.

3.1.2 Osmotski tlak

Član F_V u jednadžbi (3.1) daje doprinos zbog prisustva molekula u otopini na koje je membrana nepropusna. Označimo ukupnu koncentraciju sa c [mol/m³], te definiramo osmotski tlak

$$\Pi \equiv R_g k_B T \left(\frac{n}{V} - c \right), \quad (3.2)$$

gdje je $R_g \simeq 8.31$ (mol K⁻¹) plinska konstanta, V volumen vezikule i n broj mola molekula unutar vezikule. Slijedi izraz za energiju

$$F_V(V) \equiv \int_{V_0}^V dV' \Pi(V') = R_g k_B T \left[n \ln \left(\frac{V}{V_0} \right) - c \left(\frac{V}{V_0} \right) \right] \approx \frac{R_g k_B T c V_0}{2} \left(\frac{V}{V_0} - 1 \right)^2. \quad (3.3)$$

Za aproksimaciju $V/V_0 \ll 1$, gdje je $V_0 \equiv n/c$, osmotski tlak, kao i njegov doprinos, iščezava.

3.1.3 Minimalizacija s obzirom na gustoću lipida

Uzimamo u obzir da je broj lipida u svakom od slojeva lipidnog dvosloja očuvan. Koristeći izraz

$$N^\pm = \oint dA \phi_{\text{proj}}^\pm \quad (3.4)$$

te izraze (2.18), (2.20) te (2.21) očuvanje je primjenjivo na ograničenja integrala

$$\int dA\bar{\rho} = \int dA \left[\frac{\phi_{\text{proj}}^+ - \phi_{\text{proj}}^-}{\phi_0 - 1} \right] = \frac{N^+ - N^-}{2\phi_0} - A, \quad (3.5)$$

gdje je A površina vezikule i vrijedi

$$\int dA\rho = \frac{1}{2} \int dA \frac{\phi_{\text{proj}}^+ - \phi_{\text{proj}}^-}{\phi_0} = \frac{N^+ - N^-}{2\phi_0}. \quad (3.6)$$

Dodamo li ova ograničenja Lagrangeovim multiplikatorima za energiju F , minimalizacija ustaljenog oblika vodi konstantnoj glavnoj gustoći danoj izrazom

$$\bar{\rho} = \frac{N^+ + N^-}{2\phi_0 A} - 1. \quad (3.7)$$

Minimalizacija isto tako ukazuje da razlika gustoća prati lokalnu glavnu zakrivljenost

$$\rho(s_1, s_2) - 2dH(s_1, s_2) = -\frac{2dM}{A} + \frac{N^+ - N^-}{2\phi_0 A}, \quad (3.8)$$

gdje je $M \equiv \oint dAH$ glavna zakrivljenost koja određuje i promjenu površine između slojeva dvosloja

$$\Delta A = 4dM + O(d^2). \quad (3.9)$$

Ta promjena se većinom razlikuje od optimalne promjene

$$\Delta A_0 \equiv \frac{N^+ - N^-}{\phi_0}, \quad (3.10)$$

koja je određena brojem molekula u slojevima. Uvrstimo li izraze (3.7) i (3.8) u izraz (3.1) slijedi izraz za energiju

$$F \equiv \frac{\kappa}{2} \oint dA(2H)^2 + \frac{k^m}{4A}(\Delta A - \Delta A_0)^2 + k^m A \left(\frac{N^+ + N^-}{2\phi_0 A} - 1 \right)^2 + \frac{R_g k_B T c V_0}{2} \left(\frac{V}{V_0} - 1 \right)^2. \quad (3.11)$$

3.1.4 Efektivna ograničenja površine i volumena

Treći izraz u jednadžbi (3.11) ovisi uvelike o površini vezikule dok su prva dva izraza reda veličine κ . Uzmemo li jako veliku vezikulu površine $A = 1000 \mu\text{m}^2$ i konstante za materijal $k = 10^2 \text{ erg cm}^{-2}$ i $\kappa = 10^{12} \text{ erg}$, dobijemo da vrijedi da je $k^m A \simeq 10^9 \kappa$ što je puno više od energije zakrivljenosti. Iz ovog razloga površina A može se odrediti uz uvjet da treći član u

jednadžbi iščezava. Definiramo ograničenje površine

$$A = \frac{N^+ + N^-}{2\phi_0} \equiv 4\pi R_0^2, \quad (3.12)$$

gdje je R_0 polumjer ekvivalentne sfere.

Slično, uzmemo li energetska osmotskog doprinosa za standardne vrijednosti $R_0 = 10 \mu\text{m}$ i $c = 10^{-4} \text{ mol m}^3$ za šećer dobijemo vrijednost $Rk_B T c V_0 / 2 \simeq 10^3 \kappa$. Volumen ograničavamo na $V_0 = n/c$ za koji osmotski tlak iščezava.

3.1.5 ADE model

Zamijenimo li izraze u jednadžbi (3.11) sa ograničenjima koje smo uveli dobijemo model elastičnosti iz razlike površina ili ADE-model (eng. *Area-difference-elasticity model*). Energija u ADE-modelu dana je izrazom [3]

$$W \equiv \kappa \left[G + \frac{\alpha\pi}{8Ad^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \right], \quad (3.13)$$

gdje je G bezdimenzionalna lokalna energija savijanja

$$G \equiv \frac{1}{2} \oint dA (2H)^2 \quad (3.14)$$

i α bezdimenzionalni parametar materijala

$$\alpha \equiv \frac{2k^m d^2}{\pi\kappa}. \quad (3.15)$$

3.2 Mogući oblici vezikule

Vezikule će poprimiti oblik pri kojem je njihova energija zakrivljenosti s obzirom na ograničenja minimalna. Kako bismo našli minimalnu energiju rješavamo Euler-Lagrangeovu jednadžbu koja će nam dati skup stacionarnih oblika. Uzmimo u obzir općenitu varijacijsku slobodnu energiju

$$\Phi[S] = \kappa G[S] + \Sigma A[S] + PV[S] + QM[S], \quad (3.16)$$

gdje je G definiran izrazom (3.14), a $[S]$ označava ovisnost o obliku (eng. *shape*) S . Definiramo stacionarni uvjet gdje je δ^1 prva varijacija

$$\delta^1 \Phi[S] = \kappa \delta^1 G[S] + \Sigma \delta^1 A[S] + P \delta^1 V[S] + Q \delta^1 M[S] = 0. \quad (3.17)$$

Tako definiramo skup stacionarnih oblika S_Φ koji ispunjavaju uvjet za varijacije Σ , P i Q koje definiramo kao Lagrangeove multiplikatore koji u modelu dvoslojnog para (eng. *Bilayer-couple*

model; BC model) zadovoljavaju relacije

$$\begin{aligned}\frac{\Sigma}{\kappa} &= - \left. \frac{\partial G}{\partial A} \right|_{V,M}, \\ \frac{P}{\kappa} &= - \left. \frac{\partial G}{\partial V} \right|_{A,M}, \\ \frac{Q}{\kappa} &= - \left. \frac{\partial G}{\partial M} \right|_{A,V}.\end{aligned}\tag{3.18}$$

Skup S_Φ sadrži podskup stacionarnih oblika S_B koji pripadaju energiji B općeg oblika

$$B \equiv \kappa G + g(A, V, M),\tag{3.19}$$

gdje je $g(A, V, M)$ proizvoljna funkcija. Novi stacionarni uvjet za energiju B glasi

$$\delta^1 B = \kappa \delta^1 G + \frac{\partial g}{\partial A} \delta^1 A[S] + \frac{\partial g}{\partial V} \delta^1 V[S] + \frac{\partial g}{\partial M} \delta^1 M[S] = 0.\tag{3.20}$$

Slijedi da su parametri $\Sigma = \partial g / \partial A$, $P = \partial g / \partial V$ i $Q = \partial g / \partial M$ po uzoru na dobivene parametre iz stacionarnog uvjeta u jednadžbi (3.17). P je Lagrangeov multiplikator koji osigurava ograničenja površine, a zbog povijesnog razvoja teorije Q često zamjenjujemo sa $-2\kappa C_0$, gdje je C_0 *spontana zakrivljenost* koja uzima u obzir potencijalne asimetrije membrane.

Definiralno male devijacije oko stacionarnog oblika

$$\mathbf{R}(s_1, s_2) = \mathbf{R}_0(s_1, s_2) + \epsilon(s_1, s_2) \mathbf{n}(s_1, s_2),\tag{3.21}$$

gdje je \mathbf{n} lokalni vektor normale. Iz jednadžbe (3.17) stacionarni uvjet $\delta\Phi / \delta\epsilon(s_1, s_2) = 0$ postaje

$$P + 2\Sigma H - 2\kappa[2H(H^2 - K) + C_0 K - \Delta H] = 0,\tag{3.22}$$

gdje je Δ Laplace-Beltramijev operator na površini definiran kao

$$\Delta \equiv \frac{q}{\sqrt{g}} \partial_i (g^{ij} \sqrt{g} \partial_j).\tag{3.23}$$

Dobili smo parcijalnu diferencijalnu jednadžbu četvrtog reda. Energija lokalne zakrivljenosti G ne ovisi o veličini vezikule već samo o njenom obliku. Ukoliko je \mathbf{R}_0 rješenje jednadžbe (3.22), onda je to i skalirano rješenje \mathbf{R}_0 / λ , $\lambda > 0$, za $\Sigma \rightarrow \lambda^2 \Sigma$, $P \rightarrow \lambda^3 P$ i $C_0 \rightarrow \lambda C_0$. Za $\lambda = 1 + \epsilon$ stacionarni uvjet (3.17) daje relaciju homogenosti

$$2\Sigma A + 3PV + QM = 0.\tag{3.24}$$

Pošto nam skala ne utječe na ishod dovoljno je uzeti u obzir rješenja za fiksiranu vrijednost

C_0 . Tada rješenje jednadžbe (3.22) ovisi samo o parametrima ΣC_0^2 i PC_0^3 . Uvodimo reducirani volumen

$$v \equiv \frac{V}{\frac{4\pi}{3}R_0^3} \leq 1, \quad (3.25)$$

gdje jednakost vrijedi u slučaju sfere i integriranu glavnu zakrivljenost $m > 0$ za koji vrijedi

$$m \equiv \frac{M}{R_0}. \quad (3.26)$$

3.2.1 Ekspanzije oko sfere

Jedino poznato analitičko rješenje izraza (3.22) je sfera. Uvrstimo li sferu polumjera R_0 pokaže se da je rješenje sfera ukoliko je zadovoljen uvjet

$$PR_0 + 2\Sigma - \kappa \frac{C_0}{R_0} = 0. \quad (3.27)$$

Blago deformiranu sferu parametriziramo pomoću kuglinih funkcija $Y_{lm}(\theta, \phi)$

$$R(\theta, \phi) = R_0 \left[1 + \sum_{l \geq 0, m} u_{l,m} Y_{lm}(\theta, \phi) \right], \quad (3.28)$$

gdje je $|m| \leq l$ i $u_{l,-m} = (-1)^m u_{l,m}^*$ pomoćni Legendreovi polinomi. Druga varijacija od Φ tada iznosi

$$\delta^2 \Phi = \frac{\kappa}{2R_0^2} \sum_{l \geq 0, m} |u_{l,m}|^2 [l(l+1) - 2][l(l+1) - C_0 R_0 - PR_0^{\frac{3}{2}} \kappa]. \quad (3.29)$$

Kad god druga varijacija iščezava oko sfere, iz nje se računaju stacionarni oblici [3]. Druga varijacija ne ovisi o m kako bismo dobili simetriju i jednaka je nuli za $l = 1$. Definiramo kritični tlak $P_c(l)$

$$P_c(l) \frac{R_0^3}{\kappa} \equiv 2l(l+1) - 2C_0 R_0 \quad (3.30)$$

za koji sfera postaje nestabilna. Za $l \geq 3$ oblici nastali od sfere su nestabilni. Preostaje nam promatrati samo oblike za koje je $l = 2$.

3.2.2 Osnosimetrični oblici

Kako bismo promatrali evoluciju oblika iz sfere pri kritičnom tlaku trebamo pronaći rješenja parcijalne diferencijalne jednadžbe četvrtog reda (3.22) numerički. U potpunosti ta rješenja još nisu pronađena, ali problem možemo značajno pojednostavniti ograničimo li se na promatranje osnosimetričnih oblika. Tada jednadžba postaje obična diferencijalna jednadžba višeg reda. Za račvanja $l = 2$ nalazimo spljoštene i izdužene oblike. Malo je poznato o oblicima za koje je l

veći pošto su u okolini sfere vrlo nestabilni. Njihova stabilnost mogla bi se povećati smanjenjem reduciranog volumena.

Da bi se vezikula sastojala od dvije sfere koje spaja *vrat* koji je gotovo dimenzije nula potrebno je zadovoljiti uvjet *priljubljenosti* (eng. *kissing condition*). On nalaže da je gustoća energije zakrivljenosti $(2H - C_0)^2$ jednaka za oba sferna segmenta.

3.3 Fazni dijagram oblika

Računom smetnje (eng. *Perturbation theory*) na sfernoj granici pokazano je da su spljošteni oblici koji se pojavljuju kao stacionarni oblici nestabilni te da ne postoje stacionarni oblici koji nisu osnosimetrični elipsoidi. Sistematičnom analizom stabilnosti utvrđene su vrijednosti reduciranog volumena za koje možemo pronaći određene oblike. Spljoštene oblike možemo pronaći za vrijednosti $v < v_c^{ob} \simeq 0.75$ gdje je v_c^{ob} kritični reducirani volumen za spljoštene oblike. Izduženi oblici nemaju ograničenja za reducirani volumen.

Drugi uvjet oblika postavljamo za vrijednost glavne zakrivljenosti m . Za veće vrijednosti m pronalazimo izdužene oblike i oblike kruške, a spljoštene oblike te stomatocite za manje vrijednosti m .

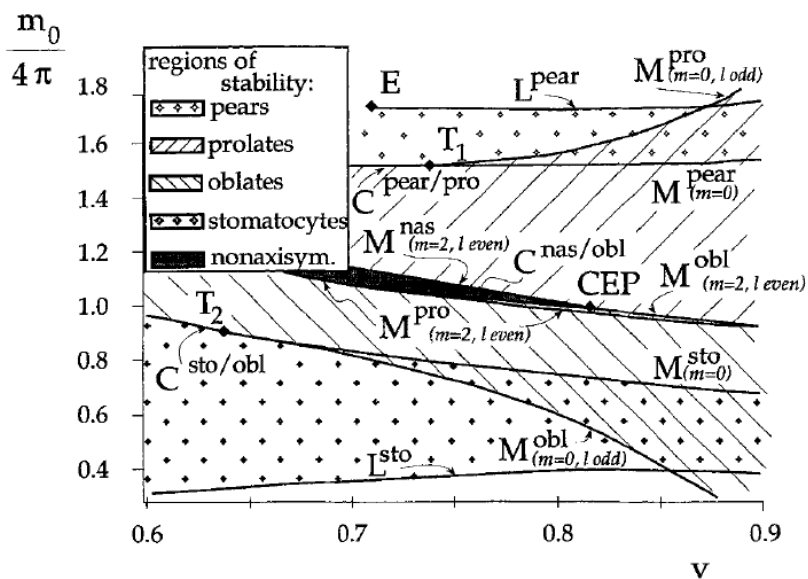
Sakupljanjem podataka o v i m možemo odrediti granice u 2D faznom dijagramu koje će nam odrediti koji oblik je membrana ostvarila. Primjer je prikazan na slici 5 gdje su prikazana područja stabilnosti i metastabilnosti mogućih oblika membrana za vrijednosti v i m . Naznačeno je i područje u kojem oblici nisu osnosimetrični. Linije na slici 5 označene slovom C su linije kontinuiranih prijelaza među oblicima, dok linije označene slovom L predstavljaju ograničenja. Slovom M označene su spinodalne linije lokalne stabilnosti [3].

Primjer faznog dijagrama oblika s naznačenim dobivenim eksperimentalnim vrijednostima prikazan je na slici 6 gdje su označene dvije teorijske linije prijelaza oblika. Na slici su označene točke koje određuju pri kojim su uvjetima eksperimentalno pronađeni oblici. Na primjeru linije S koja predstavlja prijelaz između stomatocita i diskocita vidi se da teorija izvrsno opisuje eksperimentalno dobivene vrijednosti.

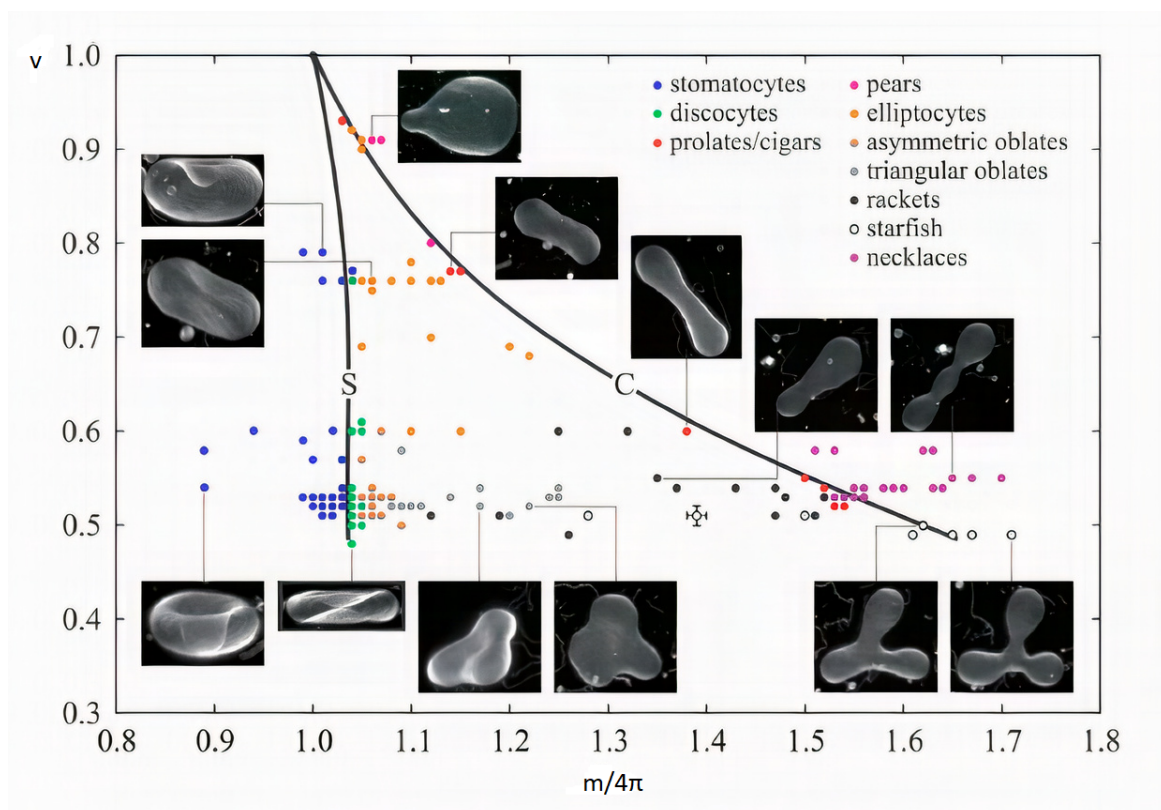
Primjećujemo i da su zadovoljeni uvjeti za vrijednost v spljoštenih oblika, kao i da stomatociti na dijagramu zauzimaju područja manje vrijednosti m od izduženih oblika.

Zanimljivo je promotriti i položaj oblika zvijezde na dijagramu. Zauzimaju područje vrlo niske vrijednosti v te vrlo visoke vrijednosti m . Niska vrijednost reduciranog volumena pridonosi stabilnosti takvih oblika (kao što smo komentirali prethodno), a visoka vrijednost glavne zakrivljenosti daje vrlo zanimljiv oblik.

Oblike zvijezda na faznom dijagramu možemo bolje promotriti na slici 7. Sukladno prethodno navedenoj tvrdnji, oblike sa više krakova pronalazimo u područjima manjeg

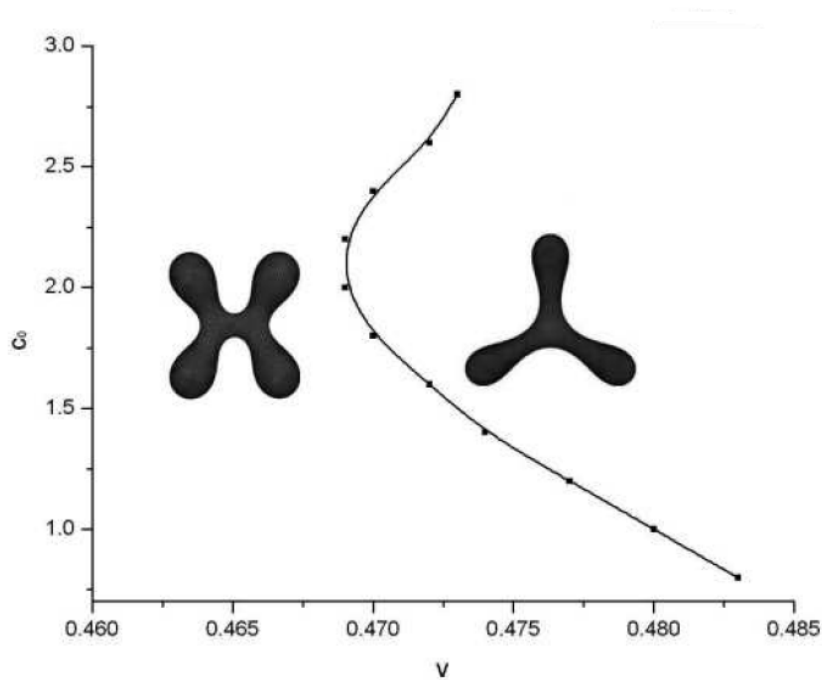


Slika 5: Fazni dijagram prijelaza oblika membrana u ovisnosti o v i m . Prikazane su teorijske linije koje ograničavaju područja stabilnosti za pojedine moguće oblike membrana. (Slika preuzeta iz [3].)



Slika 6: Fazni dijagram prijelaza oblika membrana u ovisnosti o v i m . Teorijska linija S označava prijelaze između stomatocita i diskocita, a teorijska linija C položaj oblika cigarete. Na slici su prikazani eksperimentalno dobiveni podaci. (Slika preuzeta iz [4].)

reduciranog volumena. Primjećujemo i da je za vrijednosti $C_0 < 0.8$ teško pronaći stabilne oblike zvijezde [8].



Slika 7: Fazni dijagram prijelaza oblika zvijezda membrana u ovisnosti o v i C_0 . Linija označava prijelaze između zvijezde sa tri i sa četiri kraka. (Slika preuzeta iz [8].)

Teorija je dobro opisala eksperiment te se svi oblici sa poznatim izmjerenim parametrima slažu na fazni dijagram unutar ograničenja za oblike. Kao što smo vidjeli na slici 5, a može se primijetiti i na slici 6, u određenim dijelovima faznog dijagrama moguće je pronaći više različitih oblika u metastabilnim stanjima. Izrazito dobro poklapanje smo dobili unatoč jednostavnim konceptima i kompleksnosti bioloških membrana.

4 Zaključak

Biološke membrane sačinjava lipidni dvosloj čija smo elastična svojstva proučavali. Cilj nam je bio eksperimentalna promatranja opisati teorijski. Polazeći od osnovnih koncepata diferencijale geometrije i mehanike definirali smo elastičnost gotovo planarne membrane teorijom koju je razvio Helfrich 1973. godine. Nakon što smo odredili svojstva 2D membrane fokus smo usmjerili na zatvorene biološke membrane, odnosno vezikule. Definirali smo energiju vezikule te postavili ograničenja na površinu i volumen. Dva modela koja smo koristili su jednostavniji BC-model i ADE-model koji uzima u obzir kompresibilnost lipidnog monosloja. Konačno smo pokazali moguće oblike vezikule pomoću dvaju parametara koji razapinju dvodimenzijски fazni dijagram oblika. Analizom stabilnosti utvrđene su vrijednosti parametara za koje dobivamo određene oblike. Definiramo teorijske linije u faznom prostoru oblika koje označavaju uvjete transformacije oblika iz jednog u drugi. Vratimo li se na eksperimentalna promatranja i odredimo li njihove položaje na faznom dijagramu oblika dobijemo poklapanje eksperimenta i teorije. Samim time potvrdili smo valjanost teorije. Daljnjim usavršavanjem eksperimenata poboljšali bismo kvalitetu slika i podataka, a potencijalno i pronašli nove oblike. Teorija još nije razvijena za oblike koji nisu osnosimetrični. Osim rješavanja tog problema mogao bi se osmisliti i napredniji model promatranja elastičnosti membrana koji bi uzimao u obzir još više parametara. Mjesta za napredak ima i u eksperimentu i u teoriji. Ipak je potrebno naglasiti kako smo sada s velikim uspjehom kompleksnu strukturu i ponašanje biološke membrane opisali koristeći jednostavne prve principe mehanike i elastičnosti.

5 Literatura

- [1] M. Deserno, *Fluid lipid membranes - a primer* (2007),
https://www.cmu.edu/biolphys/deserno/pdf/membrane_theory.pdf.
- [2] W. Helfrich, *Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments*,
Zeitschrift für Naturforschung C vol. 28c, 693-703 (1973)
- [3] U. Seifert, *Configurations of fluid membranes and vesicles*, *Advances in Physics*, 46:1,
13-137 (1997)
- [4] M. Yanagisawa, M. Imai, T. Taniguchi, *Shape Deformation of Ternary Vesicles Coupled
with Phase Separation*, *Physical Review Letters* 100, 148102 (2008)
- [5] S. Svetina, B. Žekš, *Shape Behavior of Lipid Vesicles as the Basis of Some Cellular
Processes*, *The Anatomical Record* 268:215-225 (2002)
- [6] T. Baumgart, S. T. Hess, W. W. Webb, *Imaging coexisting fluid domains in biomembrane
models coupling curvature and line tension*, *Nature* vol. 425, 821-824 (2003)
- [7] M. Deserno, *Notes on Differential Geometry* (2004),
https://www.cmu.edu/biolphys/deserno/pdf/diff_geom.pdf
- [8] X.-H. Zhou, S.-G. Zhang, L.-Q. Xie, F. Zheng, *Stable phase diagrams of several starfish
vesicles*, *International Journal of Modern Physics B* Vol. 22, No. 17, 2769-2779 (2008)