

На правах рукописи

Финогенова Ольга Александровна

**ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ НА ГРАНИЦАХ
ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ПРИ АДСОРБЦИИ
ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ И СИНТЕТИЧЕСКИХ
ПОЛИКАТИОНОВ**

03.00.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва - 2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
Ермаков Юрий Александрович

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор
Яковенко Леонид Владимирович

доктор физико-математических наук, профессор
Соболев Владимир Дмитриевич

Ведущая организация:

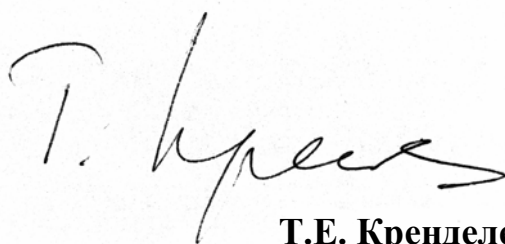
Учреждение Российской академии наук Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН.

Защита состоится 9 апреля 2009 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д501.001.96 при кафедре биофизики Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Воробьевы Горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, Новая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан “ 7 ” марта 2009 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д501.001.96,
доктор биологических наук, профессор



Т.Е. Кренделева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Транспортные явления и функционирование мембранных белков в значительной мере зависят от наличия зарядов на поверхности мембраны и в ее окрестности. Распределение электрического поля в этой области и его участие в работе белков, контролируемых энергетические и транспортные процессы, является предметом биофизических исследований. Основным вклад в электростатические явления вносят неорганические ионы, присутствующие в растворе, ионизованные полярные группы фосфолипидов и гликопротеинов, а также те белковые цепи, которые выходят за пределы гидрофобной части клеточных мембран. Структура клеточных мембран весьма сложна для экспериментального изучения, однако в некоторых случаях оказывается достаточным исследовать их известные липидные модели – липосомы и плоские бислоиные липидные мембраны (БЛМ). Поверхностный заряд таких мембран можно регулировать, варьируя содержание отрицательно заряженных фосфолипидов. Объемный заряд вблизи мембран, в известной мере моделирующий гликокаликс клеточных мембран, можно создавать, адсорбируя на поверхности синтетические полимеры с разной длиной молекулярной цепи, с заряженными и гидрофобными боковыми группами. Разработка липидных моделей и методов их изучения ведется в разных лабораториях многие годы, однако это направление исследований остается по-прежнему актуальным как с теоретических позиций, так и для различных биомедицинских приложений. В данной работе изучаются биофизические свойства липидного матрикса клеточных мембран с помощью бислоиных липидных моделей разного уровня сложности.

Одна из важнейших задач, которая может быть решена с использованием такого модельного подхода, состоит в регистрации структурных изменений в полярной области клеточных мембран. Такие изменения могут быть инициированы адсорбцией ионов и молекул различной природы, и могут существенным образом влиять на функционирование мембранных белков. В

литературе уже известен ряд фактов, когда изменения в упаковке липидов, вызванные адсорбцией многовалентных катионов, влияют на конформационную подвижность, например, механочувствительных каналов разного типа [1]. Представляет определенный интерес уточнить, может ли присутствие одновалентных неорганических катионов или малых органических молекул также приводить к похожим изменениям структуры липидного бислоя. Наиболее удобным индикатором структурных перестроек в полярной области мембраны могут служить изменения в распределении электрического поля на границе мембрана/раствор.

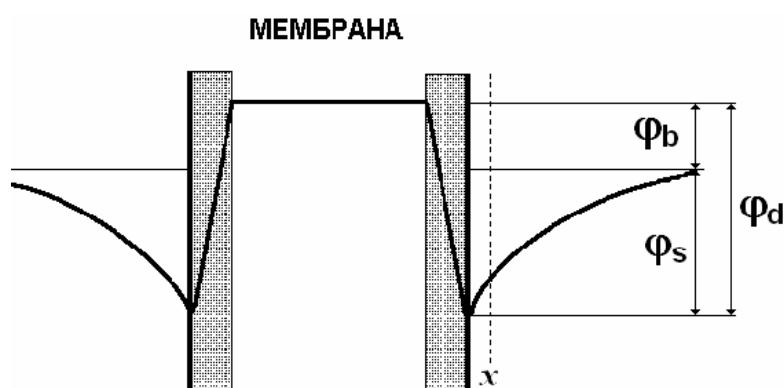


Рис. 1. Схематическое изображение распределения электрического поля на границах липидной мембраны. Пунктиром отмечено положение плоскости скольжения, в которой определяется значение дзета-потенциала (ζ). Φ_b - граничный потенциал, Φ_s - поверхностный потенциал, Φ_d - дипольная компонента граничного потенциала.

Межфазный скачок потенциала на границах мембраны, граничный потенциал, включает в себя падение потенциала в диффузной части двойного электрического слоя, и так называемую дипольную компоненту потенциала, которая непосредственно связана с ориентацией полярных групп фосфолипидов и с наличием в этой области ориентированных молекул воды. Состояние ионизации фосфолипидов отражается на величине заряда и потенциала на поверхности мембраны, тогда как изменение дипольной компоненты граничного потенциала позволяет регистрировать влияние ионов и макромолекул на гидратацию и упаковку липидов в более глубокой полярной области бислоя. Эти явления регулируются межмолекулярными взаимодействиями в липидной мембране и, конечно, должны отражаться на ее термодинамических и механических характеристиках.

Многие фармакологически важные препараты имеют макромолекулярную природу, и их связывание с клеточными мембранами может вызвать значительные изменения в упаковке липидов в бислое вплоть до образования в нем необратимых дефектов. Есть основание полагать, что разрыв клеточных мембран при адсорбции некоторых синтетических полимеров с выраженным цитотоксическим действием, является как раз следствием структурных изменений в липидном матриксе [2]. В частности, достаточно крупные синтетические поликатионы способны вызвать значительные изменения в латеральном распределении фосфолипидов в мембране [3]. Поэтому одной из актуальных задач для развития биомедицинских приложений является оценка эффективности адсорбции заряженных макромолекул на поверхности липидного бислоя и их способности менять его свойства. Хорошей модельной системой для изучения биологически важных следствий структурных изменений в мембранах в присутствии полимеров является липидный бислой со встроенными грамицидиновыми каналами.

В литературе нет достаточно подробных сведений о влиянии размеров заряженных макромолекул на распределение электростатического потенциала на границе модельных и клеточных мембран с водным окружением. Систематическое исследование этого вопроса возможно с использованием синтетических полипептидов с разной длиной молекулярной цепи, каждое из звеньев которой представляет собой аминокислоту лизин, а ее длина варьируется в широких пределах и регламентируется паспортом производителя (“Sigma”). Выбор полилизинов для исследования обусловлен их широким использованием в биомедицинской практике при формировании различного рода наногранул в комбинации с отрицательно заряженными макромолекулами и ДНК. Однако более значимым мотивом для их изучения является тот факт, что на основе полилизинов синтезируются многие препараты, обладающие иммуностимулирующими свойствами и имеющие определенные перспективы при лечении раковых заболеваний. В основе биологической активности подобных препаратов лежит их адсорбция на поверхности клеточных мембран

и влияние на транспортные процессы. Более того, хорошо известны природные белки, у которых имеется аминокислотная последовательность гомологичная пентализину, обеспечивающая связывание этих белков с поверхностью клеток. Важные сведения о механизмах взаимодействия полипептидов с мембранами могут быть получены при изучении условий образования слоя полилизина разной молекулярной массы на поверхности модельных липидных мембран разного состава.

Цель и задачи исследования

Исследование направлено на развитие представлений о влиянии адсорбированных на поверхности клеточных мембран ионов и макромолекул на распределение заряда и электрического поля в полярной области мембран и в их ближайшем окружении. В качестве основных объектов исследования выбраны неорганические катионы, полиэлектролиты различной молекулярной структуры, синтезированные в разных лабораториях для медико-биологических приложений, а также полилизинны разной молекулярной массы.

Основная цель работы - экспериментально исследовать и количественно описать связь электростатических эффектов, вызванных адсорбцией ионов и заряженных молекул на поверхности мембран, с молекулярной природой и структурными особенностями межфазной границы мембрана/электролит.

Для достижения поставленной цели в работе выделено несколько самостоятельных этапов:

1. Определение поверхностного заряда и падения потенциала в диффузной части двойного электрического слоя в присутствии одновалентных ионов, малых молекул и поликатионов, и выделение дипольной компоненты граничного потенциала.

2. Измерение и теоретическая оценка вклада диффузной части двойного электрического слоя в модуль изгиба мембран с варьируемым поверхностным зарядом.

3. Экспериментальное изучение адсорбции поликатионов разного типа, синтезированных с медико-биологическими целями, а также полилизинов различной молекулярной массы, на мембранах, заряд которых обусловлен присутствием отрицательно заряженных фосфолипидов. Сравнение полимеров по кинетике их адсорбции и десорбции на поверхности мембран и по их влиянию на упаковку липидов в бислое. Количественная оценка электростатических характеристик полимерного слоя.

Научная новизна и практическая ценность работы

Результаты работы опираются на новые экспериментальные факты, большая часть которых получена с использованием двух взаимодополняющих методов. Сравнение результатов двух методов позволило зарегистрировать изменения дипольного потенциала в присутствии некоторых одновалентных ионов и молекул пентализина. Метод компенсации внутримембранного поля оказался особенно полезным для регистрации кинетики не только адсорбции, но и десорбции молекул с поверхности БЛМ при непрерывной замене раствора с одной стороны мембраны. Тем самым стало возможным непосредственно сравнить эффективность и обратимость связывания с мембранами макромолекул разной степени полимеризации. Была сделана количественная оценка плотности заряда внешней поверхности слоя полилизинов и установлена ее связь с составом мембраны.

В процессе выполнения работы был разработан и использован ряд новых экспериментальных методик и способов анализа данных: а) предложен способ приготовления гигантских липосом в электролитах заданного состава, б) разработан алгоритм проведения измерений и обработки электрокинетических данных для оценки констант и плотности центров связывания одновалентных катионов; в) установлены условия адсорбции и десорбции на поверхности мембран поликатионов, обладающих фармакологическими и цитотоксическими свойствами. Эти условия могут определять эффективность подобных полимерных препаратов в биомедицинских приложениях.

Апробация работы

Результаты работы доложены на 8 всероссийских и международных конференциях, в том числе на III Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004); 5th EBSA International Biophysical Congress (Montpellier, 2005), 6th European Biophysics Congress (London, 2007), на VII и VIII Международных Фрумкинских симпозиумах (Москва, 2000, 2005), на XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007), на III Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (Москва, 2008), а также на конференции-конкурсе молодых ученых ИФХЭ РАН (Москва, 2008)

Публикации

Основные результаты работы опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных списком ВАК (4 статьи) и в 10-ти тезисах российских и международных научных конференций.

Структура диссертации Диссертация включает в себя пять глав, в которых содержатся обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описаны некоторые медико-биологические проблемы, в решении которых существенную роль играют биофизические методы изучения клеточных мембран с применением их липидных моделей.

В первой главе приведен обзор литературы, даны основные определения и сформулированы задачи, связанные с изучением влияния различных веществ на распределение электрического поля на границе липидных мембран. Особое внимание уделяется возможным механизмам возникновения дипольной компоненты граничного потенциала, величина которой для большинства липидных мембран достигает 300 мВ. Судя по литературным данным, дипольные моменты и их расположение в молекулах фосфолипидов существенным образом влияют на дипольную составляющую межфазного потенциала, но его связь с состоянием ионизации и гидратации полярных групп липидов по-прежнему остается предметом дискуссий. Наиболее изученными являются эффекты, указывающие на значительные изменения дипольной компоненты потенциала в присутствии многовалентных катионов с высоким сродством к фосфолипидам [4]. Их участие в латеральной конденсации липидов представляется весьма вероятной причиной изменения дипольного потенциала, который тем самым оказывается удобным индикатором подобных структурных изменений в бислое. Тем не менее, остается открытым вопрос, в какой мере эти структурные изменения могут контролироваться одновалентными катионами, концентрация которых в биологических клетках особенно высока.

Одна из проблем, обсуждаемых в литературном обзоре, связана с механохимическими свойствами липидного бислоя, которые безусловно зависят от наличия заряда на его поверхности. В обзоре приведены две наиболее цитируемые теоретические работы, предсказывающие характер этой зависимости [5,6]. Однако эти модели не учитывают тот факт, что упаковка липидов также может меняться в зависимости от состояния ионизации полярных групп. Насколько такое упрощение справедливо может выяснять

только экспериментальное исследование механических свойств мембран в условиях, корректных с точки зрения биофизики заряженных мембран.

Намного более сложными, но одновременно и более интересными объектами в практических приложениях являются заряженные макромолекулы на поверхности липидных мембран. В соответствующем разделе обзора приведены некоторые, наиболее значимые для данной работы литературные факты. В большинстве случаев они получены на полимерах, синтезированных с медико-биологическими целями. Из них в частности следует, что в основе взаимодействия поликатионов с отрицательно заряженными мембранами лежат электростатические взаимодействия, а адсорбция крупных молекул сопровождается образованием кластеров в липидном бислое [3,7]. Регистрация изменений дипольной компоненты потенциала и в этом случае могла бы оказаться полезной для наблюдения подобных изменений в структуре мембран. И особенно интересным и малоизученным остается вопрос, насколько крупной должна быть молекула полимера, чтобы ее адсорбция и влияние на липидный бислой существенно отличались от влияния простых ионов и малых молекул.

В заключительном разделе главы сформулированы основные цели и задачи исследования.

Во второй главе перечислены использованные в экспериментах материалы и описаны основные методы.

В работе использовались соли KCl («Fluka») и LiCl («Рехим», х.ч.), а также хлорид тетраметиламмония (TMACl) и сахароза («Sigma-Aldrich»). Состав растворов указан в подписях к рисункам. Липидные мембраны готовились из фосфолипидов разных фирм (Sigma; Avanty Polar Lipids Inc, США и ЗАО «Биолек», Украина) без дополнительной очистки: фосфатидилсерин (PS), димиристоил фосфатидилсерин (DMPS), кардиолипин (CL) и яичный лецитин (PC). В работе использовали поликатионы, на основе полилизина (Lys-75) с незаряженными боковыми цепями полиэтиленоксида (ПЭО) с молекулярной массой 4 и 20 кД, имеющие медико-биологическое применение, синтезированные на кафедре полимеров Химического факультета

МГУ. А также вторичные и третичные полидиаллиламмониевые соли трифторацетата (ПДДА) с высокой биоцидной активностью, синтезированные в Институте нефтехимсинтеза по методике, защищенной патентом (Тимофеева Л.М., Клещева Н.А. Пат. 2272045 Россия. 2006). Характеристики коммерческих полилизинов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Используемые в работе реактивы и их параметры по каталогу Sigma (США):

Обозначение	Название	Количество звеньев: vis; MALLS	Молекулярный вес: vis; MALLS
Lys, монолизин	L(D)-Lysine, hydrochloride	1	182.65
Lys-5	LYS-LYS-LYS-LYS-LYS	5	658.9
Lys-12	Poly-D-lysine hydrobromide	12; 8	2500; 1770
Lys-130	»	130; 84	27200; 17600
Lys-211	»	211; 179	44100; 37400
Lys-598	»	598; 488	125100; 102100
Lys-1435	»	1435; 910	300000; 190200

Среди экспериментальных методов наиболее широко использовался метод регистрации электрокинетической подвижности липосом, который позволяет измерять падение потенциала в диффузной части двойного электрического слоя. А также метод компенсации внутримембранного поля (КВП) плоских БЛМ, который был разработан в нашей лаборатории и позволяет измерять изменения граничного потенциала, включая его поверхностную и дипольную компоненты. Применение данного метода позволило нам во многих случаях регистрировать кинетику адсорбции и десорбции веществ при непрерывной смене (перфузии) раствора в одном из отсеков ячейки. В данной главе приведена также методика формирования гигантских липосом в условиях, которые позволяют контролировать состояние ионизации поверхности. Эта методика была использована в тех экспериментах, в которых была найдена зависимость модуля изгиба мембраны от ее заряда.

В третьей главе приведены результаты исследования влияния одновалентных катионов на дипольную компоненту граничного потенциала. Для ее регистрации в традиционной постановке опытов необходимо варьировать концентрацию ионов в растворе и сравнивать изменение поверхностного (дзета) потенциала липосом и граничного потенциала плоских

БЛМ. В наших экспериментах мы использовали мембраны, сформированные из PS, и варьировали pH водного раствора разных электролитов. Изменения граничного потенциала плоских БЛМ в широком диапазоне pH с хорошей точностью совпадают в разных электролитах (KCl, LiCl, TMACl) (рис. 2а). Форма кривых позволяет найти значение $pK=3$ карбоксильной группы фосфатидилсерина, которое хорошо согласуется с литературными данными. Поверхностный потенциал, измеренный в суспензии липосом в тех же условиях, существенно различается в разных электролитах при нейтральных и щелочных значениях pH (рис. 2б).

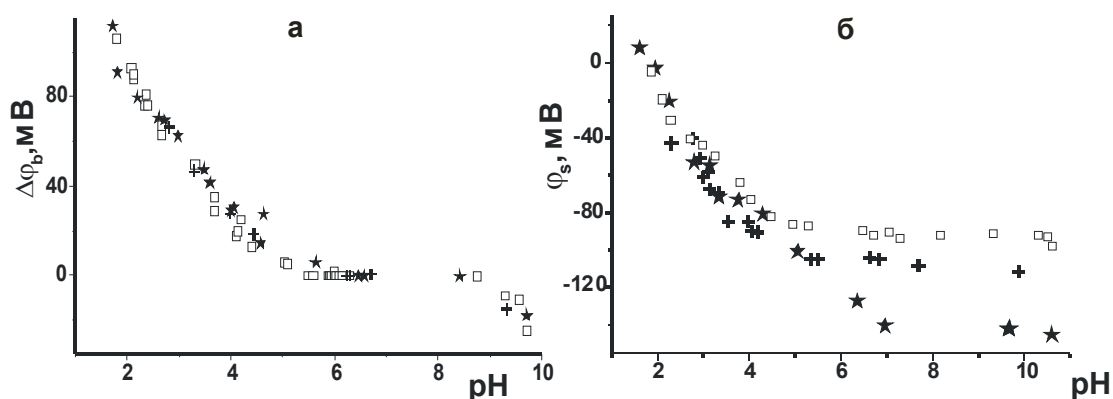


Рис. 2. Изменения граничного потенциала плоских БЛМ (а) и поверхностного потенциала липосом (б), сформированных из PS, при изменении pH в растворе KCl (квадраты), LiCl (крестики) и TMACl (звездочки). Концентрация электролитов 0.05 М.

Для определения дзета-потенциала, ζ , здесь и далее была использована формула Смолуховского: $\zeta = \mu \frac{\eta}{\varepsilon \varepsilon_0}$, где μ - измеренная электрофоретическая подвижность коллоидных частиц (липосом), η - вязкость электролита, $\varepsilon \varepsilon_0$ - диэлектрические постоянные вакуума и воды. При расчете поверхностного потенциала, φ_s , вносилась поправка на положение плоскости скольжения ($x=0.2$ нм) по известной формуле теории Гуи-Чепмена:

$$\tanh\left(\frac{e\zeta}{4kT}\right) = \exp(-\kappa x) \tanh\left(\frac{e\varphi_s}{4kT}\right)$$

где e – заряд электрона, k - константа Больцмана, T – температура, $\kappa = \sqrt{\frac{2e^2c}{\varepsilon \varepsilon_0 kT}}$ обратная дебаевская длина экранирования, c – концентрация электролита в объеме раствора.

Обнаруженное в опытах различие поверхностных потенциалов (рис.2б) может быть отнесено к разным значениям констант связывания катионов с карбоксильной группой фосфатидилсерина. Важно отметить, что на нейтральных мембранах (РС) изменения граничного и поверхностного потенциалов во всех электролитах практически совпадают в пределах ошибки измерений (3-5 мВ).

Влияние катионов на дипольную компоненту граничного потенциала удается обнаружить только в «дифференциальной» постановке опытов с применением метода непрерывной перфузии ячейки и заменой типа катиона с одной стороны мембраны (рис. 3).

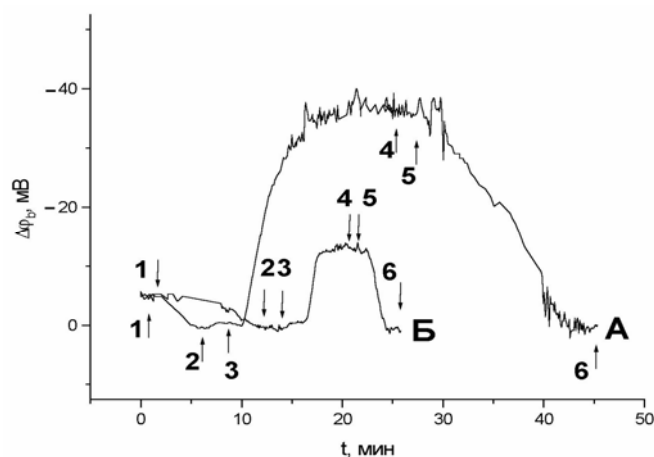


Рис. 3. Типичные эксперименты по замене одного фонового электролита другим с одной стороны БЛМ из PS. Перед началом опыта проводили перфузию фоновым электролитом LiCl до достижения стационарного значения (стрелки 1 и 2 – начало и остановка перфузии). Затем осуществляли замену LiCl на KCl (кривая А) или TMACl (кривая Б) (стрелки 3 и 4). Для контроля систему возвращали в исходное состояние путем перфузии электролитом LiCl (стрелки 5 и 6). Концентрация электролитов 0.05 М (рН=7.0).

При одинаковой концентрации электролита с обеих сторон мембраны разность потенциалов на БЛМ определяется только особенностью взаимодействия с мембраной катионов разного типа. В опыте, результаты которого приведены на рис. 3, замена катионов Li^+ на TMA^+ и K^+ приводит к изменению граничного потенциала разной амплитуды, но одинакового знака. В то же время, значения поверхностного (дзета) потенциала, измеренные в электролитах KCl и TMACl, отличаются от случая LiCl в противоположных направлениях (рис. 2б). Сравнивая результаты, полученные на плоских БЛМ и липосомах можно сделать вывод, что катионы K^+ и TMA^+ сдвигают дипольный

потенциал в разные стороны по отношению к его величине в растворе LiCl на -50 и 21 мВ, соответственно (таблица 2).

Таблица 2. Приращения потенциалов при замене электролита (мембраны из PS)* :

Исходный раствор	Замена на KCl			Замена на TMACl		
	$\Delta\phi_b$, мВ	$\Delta\phi_s$, мВ	$\Delta\phi_d$, мВ	$\Delta\phi_b$, мВ	$\Delta\phi_s$, мВ	$\Delta\phi_d$, мВ
LiCl	-35	15	-50	-13	-34	21
KCl				+14	-49	64

* Средняя ошибка измерения потенциалов 5 мВ

Одно из возможных объяснений различия дипольных потенциалов в использованных нами электролитах состоит в разном положении плоскости адсорбции катионов, по сравнению с анионами хлора. Однако более естественным представляется влияние катионов, адсорбированных на поверхности мембран, на состояние упаковки фосфолипидов и гидратации полярной области бислоя. Наличие дипольных молекул воды в этой области в значительной степени компенсирует дипольные моменты самих молекул липидов. При адсорбции катионов заряд поверхности уменьшается и происходит сближение молекул в латеральном направлении, что должно приводить к их дегидратации. Примерно такой процесс наблюдается при фазовом переходе от жидкого к твердому состоянию липидного бислоя. В частности, измерения на липидных монослоях показывают, что увеличение плотности упаковки липидов при «замерзании» липидного бислоя сопровождается увеличением дипольного потенциала [4]. Судя по полученным нами данным, присутствие калия уменьшает дипольный потенциал в полярной области мембраны и потому должно способствовать гидратации липидов, в отличие от тетраметиламмония. Конечно, только электростатические измерения не в состоянии доказать справедливость этой гипотезы. Для этого необходимы прямые измерения количества молекул воды, ассоциированных с липидами.

В четвертой главе приведены результаты исследования зависимости модуля изгиба мембраны от величины поверхностного заряда. Экспериментальные данные были получены в совместном проекте с

Институтом физики твердого тела Болгарской академии наук в рамках межакадемического сотрудничества. Модуль изгиба мембран измеряли методом всасывания гигантских липосом в микропипетку. Гигантские липосомы обычно формируются только в безионной среде, чаще всего в растворах сахарозы. Поэтому, чтобы сформировать такие липосомы в присутствии электролита заданного состава потребовалось дополнить стандартную процедуру введением электролита в суспензию уже сформированных липосом, замещая им часть сахарозы при сохранении осмотического давления в среде. Заряд мембран варьировали, меняя содержание заряженного липида (PS) в мембране. Величина заряда была нами найдена экспериментально при измерении электрокинетической подвижности мультислойных липосом, приготовленных в аналогичных условиях.

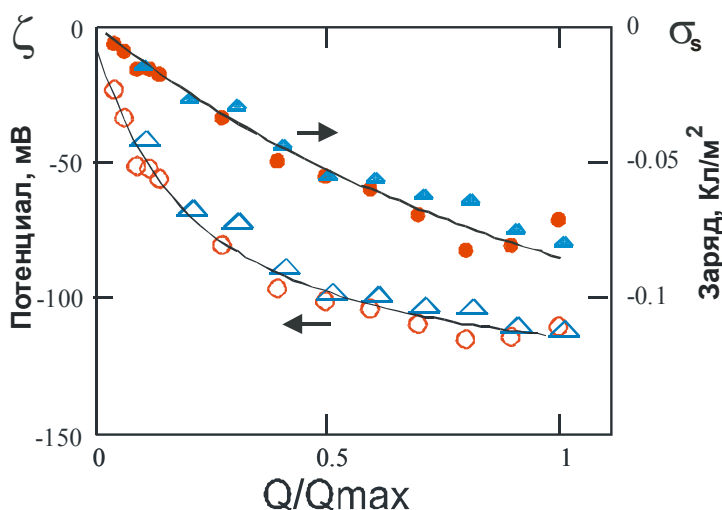


Рис. 4. Дзета-потенциал (светлые точки) и поверхностный заряд (темные точки) липосом из смеси PC:PS в растворе 0.01 М KCl и 0.17 М сахарозы (кружочки) и без сахарозы (треугольники). Параметры адсорбции калия $Q_{\max} = -0.125 \text{ Кл/м}^2$, $K_1 = 0.22 \text{ М}^{-1}$.

На рис. 4 приведены данные измерения дзета-потенциала и рассчитанные значения плотности заряда липосом из смеси PS и PC в фоновом электролите 0.01 М KCl, а также в присутствии 0.17 М сахарозы. Значения поверхностной плотности заряда, σ_s , были найдены по известной формуле теории Гуи-Чепмена:

$$\sigma_s = \sqrt{8kT \varepsilon \varepsilon_0 c} \sinh\left(\frac{e \phi_s}{2kT}\right).$$

Теоретические кривые построены с учетом изотермы Ленгмюра для адсорбции катионов и оптимальных значений константы связывания калия (K_1) и плотности центров связывания (Q_{\max}).

$$\frac{\sigma_s}{Q_{\max}} = \frac{-1}{1 + K_1 C_1}$$

Здесь приповерхностная концентрация калия $C_1 = c \exp(-e\phi_s/kT)$.

На рис. 5 приведены экспериментальная зависимость модуля изгиба мембран гигантских липосом разного состава, и рассчитанные по теоретическим моделям.

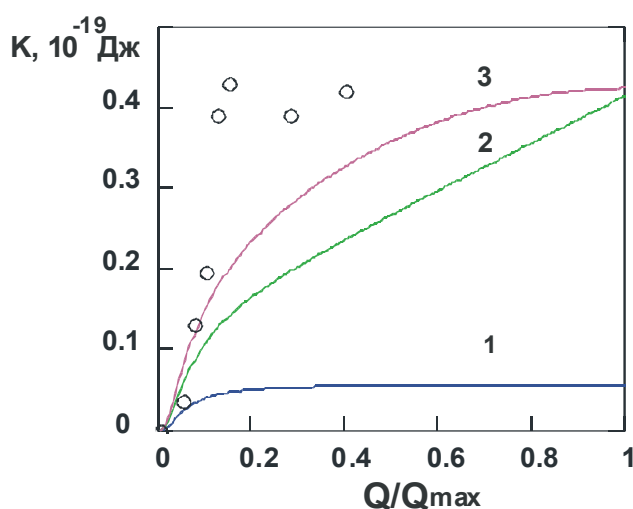


Рис. 5. Зависимость модуля изгиба от величины поверхностного заряда в растворе 0.01 М КСl и 0.17 М сахарозы. Сплошные линии – теоретические кривые (см. текст). Расчеты проведены для концентрации 0.01 М КСl и максимальной плотности поверхностного заряда $Q_{\max} = -0.23 \text{ Кл/м}^2$.

Расчеты были проведены в рамках моделей, описанных в работах [5] и [6] по формулам, приведенным ниже:

$$K(x) := \left[\frac{2 \cdot (k \cdot T)}{e} \right]^2 \cdot \frac{(\varepsilon \cdot \varepsilon_0)}{\kappa} \cdot \frac{(q(x) - 1)}{[q(x) \cdot (q(x) + 1)]} \cdot \left[(q(x) + 2) - 2 \cdot \frac{H}{q(x) + H} \right]$$

(кривая 1)

$$K(x) := \frac{k \cdot T}{\pi \cdot Q \cdot \kappa} \cdot \frac{(q(x) - 1)}{(q(x) + H)} \cdot \left[\frac{(q(x) + 2 + H)}{(q(x) + 1)} + 4 \cdot \kappa \cdot (\delta - \eta) + 2 \cdot \kappa^2 \cdot (q(x) + 1) \cdot (\delta - \eta)^2 \right]$$

(кривые 2 и 3).

Здесь электрическое взаимодействие монослоев предполагается пренебрежимо малым ($H=0$), разность δ - η описывает глубину погружения нейтральной поверхности в каждый из монослоев липидного бислоя,

$$p(\mathbf{x}) := 2 \cdot \pi \cdot Q \cdot \frac{\mathbf{x}}{k \cdot e}, \quad q(\mathbf{x}) := \sqrt{p(\mathbf{x})^2 + 1}$$

параметры, зависящие от заряда (\mathbf{x}), а

$$Q := \frac{e^2}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon \cdot k \cdot T}$$

характерная длина Bjerrum.

В рамках модели, предложенной в работе [5], учитывается только вклад диффузной части электрического двойного слоя, а нейтральная поверхность совпадает с плоскостью зарядов на поверхности (кривая 1). Модель, предложенная в работе [6] кроме наличия электрического заряда предполагает, что нейтральная поверхность и плоскость ионизованных групп в полярной части молекул фосфолипидов не совпадают. При построении кривой 2 нейтральная поверхность была расположена нами в мембране на глубине 1.1 нм при любом составе смеси. При расчете кривой 3 мы полагали, что эта глубина линейно уменьшается от 1.6 нм (мембрана из PC) до 1.1 нм (мембрана из PS). Этот фактор был назван нами «стерическим» и его величина для PC предполагается большей, чем для PS, что примерно отражает различие в размерах полярных головок этих фосфолипидов. Понятно, что этот фактор должен учитывать не только геометрическую форму молекул, но и другие свойства (состояние ионизации, гидратацию и т.п.), а также вероятно более сложное поведение этих молекул в смеси. Тем не менее, проведенные нами эксперименты и теоретические оценки позволяют сделать важный качественный вывод – вклад в энергию изгиба мембраны электрического двойного слоя заметно меньше, чем стерического фактора.

В пятой главе приведены результаты изучения свойств липидных мембран в присутствии положительно заряженных макромолекул и поликатионов разной структуры. В первом разделе приведены данные, полученные при измерении электрокинетической подвижности липосом

разного состава в присутствии синтетических поликатионов, имеющих медико-биологическое применение. Образцы представляли собой полимеры, синтезированные на основе полилизина с незаряженными боковыми цепями полиэтиленоксида (ПЭО). Адсорбция изучалась на липосомах, отрицательный заряд которых определялся присутствием кардиолипина (20% CL) или встроенными молекулами О-пиромилитин грамицидина. Во всех случаях было обнаружено изменение знака заряда липосом, причем положение точки нулевого заряда оставалось примерно одинаковым в шкале, отражающей отношение концентрации заряженных звеньев поликатиона к полной концентрации отрицательно заряженных групп кардиолипина в суспензии липосом. Однако, наличие и размеры нейтральных цепей ПЭО у адсорбированного полимера существенно снижало способность к латеральному взаимодействию ионных каналов грамицидина. Наиболее вероятно, что группы ПЭО препятствуют латеральному разделению заряженных и нейтральных компонент в мембране и образованию кластеров, возникающих при адсорбции крупных молекул полилизина.

Похожие зависимости, однако с значительно более высокой амплитудой перезарядки мембран, были зарегистрированы при адсорбции поликатионов вторичных и третичных ПДАА, обладающих сильным цитотоксическим эффектом и различающихся молекулярной массой. В ряде опытов мы сопоставили морфологическую картину этих полимеров на поверхности липосом и клеток бактерий *E. Coli*, которая оказалась очень похожей в случае, когда липидные мембраны содержали отрицательно заряженные фосфолипиды. Во всех измерениях с такими липосомами наблюдалась крутая зависимость электрокинетической подвижности вблизи точки нулевого заряда, которая располагалась в области микромолярных концентраций полимеров. Эти результаты стимулировали нас продолжить исследования с поликатионами, длина цепи которых значительно различается при сохранении структуры и заряда отдельного звена. Наилучшим объектом такого рода являются

коммерчески доступные полилизины с хорошо охарактеризованным свойствами.

Изучение взаимодействия полилизинов разной молекулярной массы с поверхностью липидных мембран было проведено при варьировании существенных для адсорбции параметров – поверхностного заряда мембран и ионной силы электролита. Адсорбцию монолизина рассматривали как естественный контроль в этих исследованиях. Его адсорбция проявлялась в изменении электрофоретической подвижности липосом и граничного потенциала плоских БЛМ. Полученные экспериментальные результаты и теоретические кривые приведены на рис. 6.

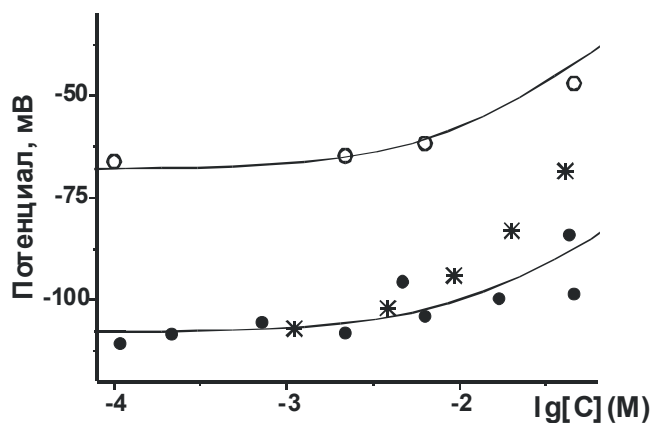


Рис. 6. Дзета-потенциал липосом из смеси CL:PC в соотношении 1:0 (темные точки) и 2:8 (светлые точки), измеренный при разной концентрации монолизина в 0.01 М KCl. Изменения граничного потенциала БЛМ, сформированных из CL (крестики), смещены на величину исходного потенциала мембран. Теоретические кривые построены в рамках модели равновесного распределения молекул лизина между мембраной и водным раствором с константой $K_2=10^{-5} \text{ M}^{-1}$. Максимальная плотность заряда мембраны из CL принята равной $Q_{\text{max}}=0.15 \text{ Кл/м}^2$ с учетом адсорбции калия ($K_1=3 \text{ M}^{-1}$).

Для количественного описания адсорбции монолизина оказалось возможным использовать простейшую модель, в которой распределение молекул между мембраной и водным раствором пропорционально их концентрации вблизи поверхности. В приведенной ниже расчетной формуле первое слагаемое описывает уменьшение плотности отрицательно заряженных центров связывания при адсорбции катионов фонового электролита (здесь K^+), а второе – появление на поверхности положительно заряженных молекул лизина в результате их распределения между мембраной и водным раствором:

$$\frac{\sigma_s}{\alpha Q_{\max}} = \frac{-1}{1 + K_1 C_1} + K_2 C_2$$

Здесь C_1 , C_2 и K_1 , K_2 – приповерхностные концентрации и константы связывания калия и лизина, соответственно, α – доля заряженного липида в смеси, Q_{\max} и σ_s – максимальная и переменная плотности поверхностного заряда мембраны. При малой эффективности связывания такое упрощенное описание адсорбции вполне оправдано и не требует учета возможной конкуренции заряженных молекул лизина с катионами фонового раствора. Данные приведенные на рис. 6 демонстрируют достаточно хорошее согласие двух методов измерения потенциалов между собой, а также с предсказаниями простейшей теоретической модели.

Важно отметить тот факт, что адсорбция монолизина и полимерных молекул на его основе становится заметной только на мембранах, содержащих отрицательно заряженные фосфолипиды. Это означает, что во взаимодействии таких молекул с поверхностью мембран основное участие принимают электростатические силы. В тех случаях, когда ионизованные органические молекулы проявляют гидрофобные свойства (в наших опытах это были положительно заряженные молекулы бис-ретиная, А2Е), их адсорбция становится заметна и на нейтральных липидных мембранах.

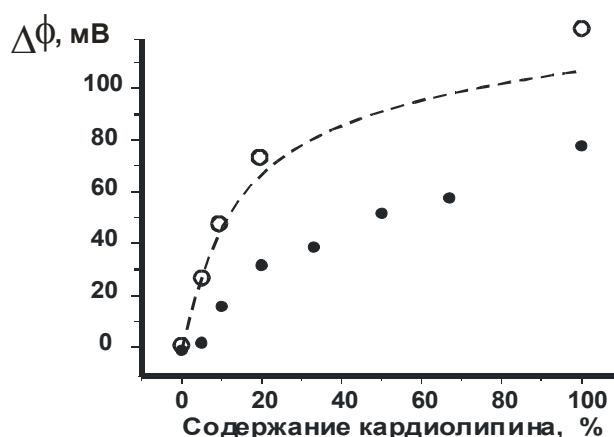


Рис. 7. Изменение дзета-потенциала (светлые точки) и граничного потенциала (темные точки) мембран с разным содержанием CL и PC при насыщении поверхности пентализинном. Пунктиром для сравнения показана абсолютная величина потенциала диффузной части двойного электрического слоя вблизи заряженной поверхности липосом до введения пентализина в раствор. Фоновый электролит 0.01 М KCL.

В отличие от монолизина, при адсорбции пентализина изменения поверхностного и граничного потенциалов существенно различаются по амплитуде (рис. 7). Эта разность потенциалов может быть отнесена к изменению дипольной компоненты граничного потенциала и тем самым связана с влиянием адсорбированных молекул пентализина на упаковку липидов в бислое. Отрицательный знак изменения дипольного потенциала при адсорбции пентализина указывает на некоторую латеральную декомпрессию фосфолипидов и увеличение гидратации полярной области мембраны.

Изучение кинетики адсорбции и десорбции макромолекул на плоских БЛМ возможно лишь до тех пор, пока мембрана остается стабильной. Это условие выполнялось только в опытах с моно и пентализином. Их адсорбция сопровождалась увеличением граничного потенциала. При последующей непрерывной перфузии ячейки фоновым электролитом наблюдалась практически полная десорбция этих молекул, и потенциал возвращался к исходному значению. Адсорбция более крупных полилизиннов происходила значительно медленнее, а при последующей длительной (около часа) перфузии ячейки фоновым электролитом граничный потенциал не изменялся, то есть адсорбция макромолекул была практически необратима. К сожалению, при повышении концентрации высокомолекулярных полилизиннов плоская БЛМ теряла устойчивость, и граничный потенциал в насыщении поверхности этими поликатионами измерить не удалось.

В общем случае для количественного анализа адсорбции крупных макромолекул на поверхности частиц требуется модель, учитывающая не только распределение электрического потенциала в полимерном слое, но и гидродинамические особенности движения таких частиц во внешнем электрическом поле. Однако в тех случаях, когда поверхность липосом максимально заполнена полимером (в области плато), можно предположить, что плоскость скольжения находится за пределами достаточно плотного полимерного слоя. Только при этом условии мы вправе использовать теорию Смолуховского для расчета дзета-потенциала и простую модель двойного

электрического слоя Гуи-Чепмена для оценки поверхностного потенциала и плотности заряда на внешней поверхности полимерного слоя. Справедливость такого подхода не может быть строго доказана в рамках имеющихся у нас методов, поэтому мы используем его здесь и далее главным образом для удобства представления данных и для возможности их сравнения с простейшими моделями.

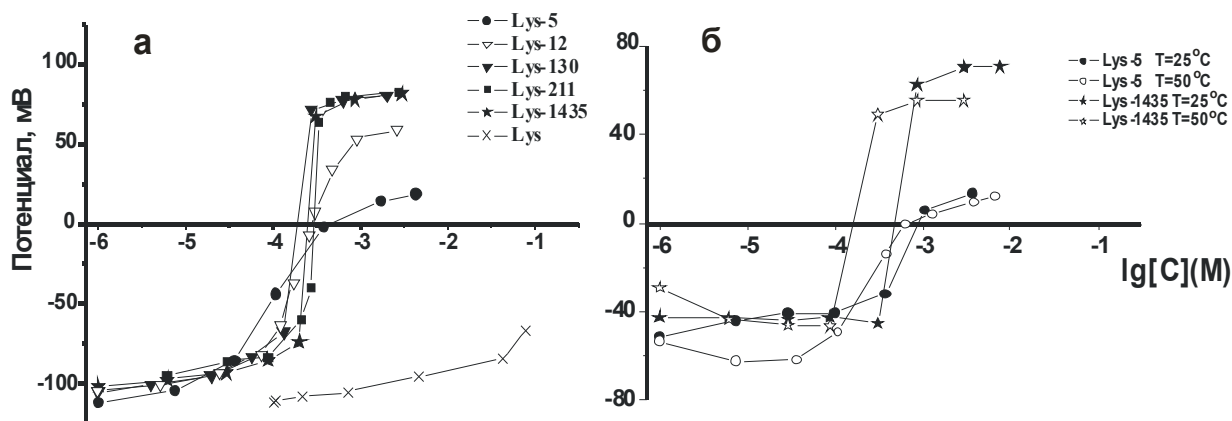


Рис. 8. Дзета-потенциал липосом, сформированных в растворе 0.01 М КСl из CL (а) и DMPS при температурах ниже (25°C) и выше (50°C) температуры фазового перехода (около 40°C) (б), измеренный при последовательном увеличении в ячейке количества монолизина и полилизинов разного молекулярного веса.

Результаты измерения электрофоретической подвижности (дзета потенциала) липосом, содержащих отрицательно заряженные липиды CL и DMPS, при увеличении концентрации полилизинов разного молекулярного веса, приведены на рис. 8. По оси абсцисс отложена суммарная концентрация полимеров, выраженная в весовых единицах и нормированная на число звеньев полимера. Форма кривых и их положение для полилизинов и монолизина существенно различаются (рис. 8а). Полипептиды с высокой степенью полимеризации приводят к значительной перезарядке мембраны и изменению знака потенциала, предельная величина которого в области плато зависит от молекулярного веса полимера. Точка нулевого заряда, в случае мембран из CL (рис. 8а), практически совпадает для всех полилизинов. В опытах с липосомами из DMPS (рис. 8б) положение кривых зависит от температуры в ячейке (фазового состояния липида).

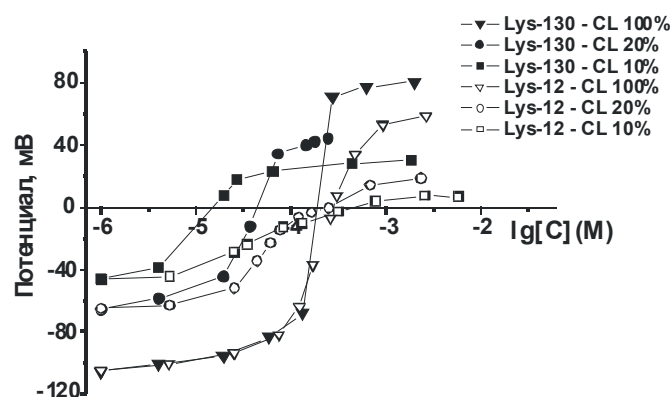


Рис. 9. Дзета-потенциал липосом из смеси CL:PC в соотношении 1:0 (треугольники), 2:8 (кружки) и (1:9) (квадраты), измеренный при последовательном повышении концентрации Lys-12 (светлые точки) и Lys-130 (темные точки) в растворе 0.01 М KCl.

Положение точки нулевого заряда смещается и в тех случаях, когда в составе мембраны присутствуют и заряженные и нейтральные липиды (рис. 9). Можно видеть, что полимеры с большей молекулярной массой сорбируются с большей эффективностью, что особенно отчетливо заметно на мембранах, содержащих 10% CL. Измеряемый в опыте потенциал в области насыщения зависит от состава мембраны и, судя по полученным данным может быть связан с латеральным разделением липидов на поверхности липосом.

Чтобы убедиться, что количество адсорбированного полимера зависит от доли поверхности, занятой отрицательно заряженным липидом (т.е. от поверхностной плотности заряда) была сделана оценка плотности заряда липосом до и после добавления полилизина в суспензию (рис. 10).

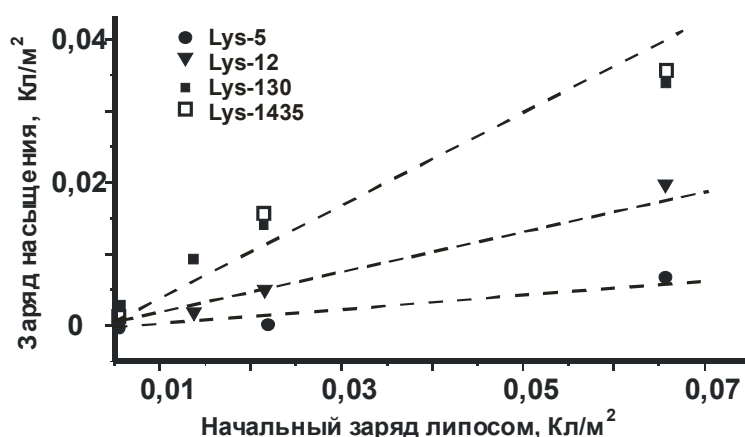


Рис. 10. Зависимость адсорбированного заряда в области насыщения от начального заряда липосом при адсорбции полилизина разного молекулярного веса.

При этом по-прежнему использовались теория Смолуховского и модель Гуи-Чепмена в предположении о наличии плотного полимерного слоя на

поверхности мембран. Некоторым оправданием такого допущения может служить тот факт, что согласно литературным данным метод атомной силовой микроскопии обнаруживает достаточно однородный плотный слой не очень крупных молекул полилизина на поверхности отрицательно заряженной слюды.

Как можно было ожидать, привнесенный полимерами положительный заряд практически линейно меняется с увеличением исходного отрицательного заряда липосом с наклоном, зависящим от молекулярного веса полимера. Наиболее крупные макромолекулы приносят на поверхность липидных мембран заряд, который превышает исходный заряд липосом примерно в 1.5-2 раза.

Ионная сила электролита является одним из важных факторов, влияющих на электрокинетические свойства коллоидных частиц, и конечно липосом, покрытых слоем полимера. Величина дзета-потенциала таких липосом в области насыщения полимерами разного молекулярного веса была измерена при нескольких концентрациях фонового электролита (рис. 11).

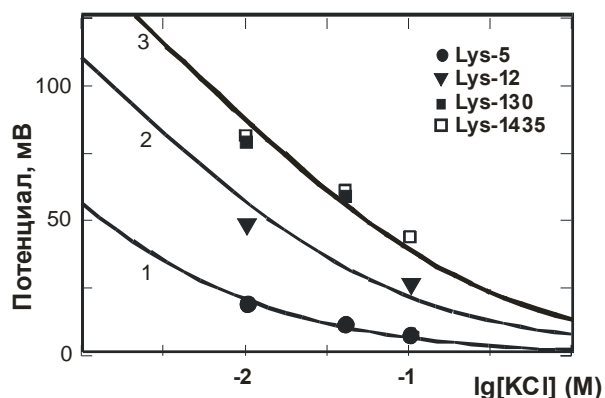


Рис. 11. Потенциал насыщения в зависимости от ионной силы фонового электролита KCl. Теоретические кривые 1-3 построены с применением модели Гуи-Чемпена при плотности поверхностного заряда, равной 0.005, 0.016 и 0.032 Кл/м², для полимеров с числом звеньев 5, 12 и более 130, соответственно.

Теоретические кривые, приведенные на рисунке, построены по формулам модели Гуи-Чемпена. Влияние фонового электролита в этой модели ограничивается экранированием поверхностного заряда без изменения его величины. Несмотря на очевидную грубость такой оценки плотности заряда на поверхности полимерного слоя, этот заряд не зависит от концентрации

электролита и даже от молекулярного веса достаточно крупных молекул полилизина (свыше 130 звеньев в молекуле). Этот факт в некоторой степени оправдывает сделанное выше допущение о липосомах, покрытых достаточно плотным слоем полимера, чтобы его суммарный поверхностный заряд зависел только от степени ионизации отдельных звеньев цепи, одинаковой для крупных макромолекул, и плотности отрицательных центров связывания на поверхности мембраны (см. рис. 10). Безусловно, для более адекватного описания электрокинетических свойств липосом, необходимо их связать с толщиной полимерного слоя, с количеством, размерами, степенью ионизации, проницаемостью адсорбированного полимера для ионов электролита и т.п. Однако полученные нами результаты не дают оснований для усложнения теоретической модели, так как для их количественного описания оказались достаточными всего несколько параметров простейшей модели Гуи-Чепмена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги нашего исследования отметим три важных вывода, которые следуют из приведенных выше экспериментальных данных. В наших опытах адсорбция одновалентных катионов сопровождалась изменением дипольной компоненты граничного потенциала. Этот факт, известный ранее для некоторых многовалентных катионов, представляется существенным для понимания роли ионного окружения и липидного матрикса в биохимических процессах. По всей видимости, адсорбция катионов на поверхности мембран сопровождается не только изменением их заряда и потенциала, но и плотности упаковки липидов в матриксе, индикатором которой является дипольный потенциал. Более того, даже механохимические свойства мембран (в наших опытах модуль изгиба) зависят не столько от состояния ионизации фосфолипидов, сколько от их упаковки в бислои и иных «стерических» особенностей. И, наконец, оказалось, что заряд внешней поверхности слоя крупных макромолекул на поверхности мембраны не зависит от состояния ионизации фосфолипидов, а определяется только свойствами самого полимера.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Изменения дипольной компоненты граничного потенциала обнаружены на мембранах из фосфатидилсерина при смене электролитов. Показано, что замена катионов Li^+ на K^+ и TMA^+ приводит к изменению дипольного потенциала на -50 и 21 мВ, соответственно. Этот эффект может отражать влияние катионов на упаковку и гидратацию липида.

2. Показано, что модуль изгиба мембран растет с увеличением содержания заряженного липида в мембране. Величина эффекта существенно превышает теоретически предсказанный вклад двойного электрического слоя на границе мембрана/раствор. Экспериментальный результат количественно описан в предположении о смещении нейтральной поверхности монослоев мембраны в зависимости от ее состава.

3. Изучена адсорбция на мембранах поликатионов разного типа и молекулярной массы, включая полимеры, обладающие фармакологическими и цитотоксическими свойствами. Показано, что адсорбция происходит только на отрицательно заряженных мембранах, причем электрофоретическая подвижность липосом в присутствии поликатионов меняет знак и достигает насыщения в области микромолярных концентраций.

4. Показано, что при адсорбции пентализина на мембранах с разным соотношением заряженного и нейтрального липидов появляется разница между изменениями граничного и поверхностного потенциалов (до -30 мВ), которая отражает изменение дипольного потенциала. Знак эффекта указывает на возможную гидратацию и декомпрессию липидов в бислое.

5. Показано, что характерное время адсорбции растет в ряду лизин – пентализин – полилизин. При последующей непрерывной перфузии фоновым электролитом наблюдается десорбция только низкомолекулярных соединений, а крупные поликатионы сорбируются практически необратимо.

6. Плотность заряда на внешней поверхности слоя полимеров, адсорбированных на липидных мембранах, рассчитана в рамках модели Гуи-

Чемпена. Показано, что средний заряд полимерного слоя на поверхности мембран пропорционален содержанию отрицательно заряженной компоненты в составе мембран. Максимальная плотность заряда полимерного слоя достигает 0.032 Кл/м^2 для полилизиннов с числом звеньев более 130.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Sukharev S., Betanzos M., Chiang C.S., Guy H.R. // *Nature*. 2001. V. 409. № 6821. P. 720-724.
2. Тимофеева Л.М., Клещева Н.А., Васильева Ю.А., Громова Г.Л., Тимофеева Г.И., Филатова М.П. // *Высокомолек. соед. А*. 2005. Т. 47. № 6. С. 916-933.
3. Ярославов А.А., Ефимова А.А., Лобышев В.И., Ермаков Ю.А., Кабанов В.А. // *Биологические мембраны*. 1996. V. 13. № 6. P. 628-633.
4. Ermakov Y.A., Averbakh A.Z., Yusipovich A.I., Sukharev S. // *Biophys. J*. 2001. V. 80. № 4. P. 1851-1862.
5. Winterhalter M., Helfrich W. // *J. Phys. Chem*. 1992. V.96. P. 327-330.
6. May S. // *J. Chem. Phys*. 1996. V. 105. № 18. P. 8314-8323.
7. Schwieger C., Blume A. // *Eur. Biophys. J*. 2007. V. 36. № 4-5. P. 437-450.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Vitkova V., Genova J., Finogenova O., Mitov M.D., Ermakov Y.A., Bivas I. Surface charge effect on the bending elasticity of lipid bilayers. *Compt. rend. Acad. Bulg. Sci*. 2004. V. 57 (11). P. 25-30.
2. Соколов В.С., Соколенко Е.А., Соколов А.В., Финогенова О.А., Донцов А.Е., Островский М.А. Взаимодействие бис-ретинолиден этаноламина (А2Е) с бислойными липидными мембранами в темноте и при действии света. *Биологические мембраны*. 2005. Т. 22 (4). С. 361-369.
3. Pashkovskaya A.A., Lukashev E.P., Antonov P.E., Finogenova O.A., Ermakov Y.A., Melik-Nubarov N.S., Antonenko Y.N. Grafting of polylysine with polyethylenoxide prevents demixing of o-pyromellitylgramicidin in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. V. 1758. P. 1685-1695.
4. Финогенова О.А., Филинский Д.В., Ермаков Ю.А. Электростатические эффекты при адсорбции и десорбции полилизиннов на поверхности липидных мембран разного состава. *Биологические мембраны*. 2008. Т. 25 (3). С. 217-226.

Тезисы

1. Юсипович А.И., Финогенова О.А., Ермаков Ю.А. Электростатические и упругие свойства липидных мембран при адсорбции гадолиния. VII Международный Фрумкинский симпозиум. Москва. 2000. Т. 1. С. 280-281.

2. Финогенова О.А., Ермаков Ю.А. Влияние поверхностного заряда на энергию изгиба липидных мембран. III Съезд биофизиков России. Воронеж. 2004. Т. 1. С. 289-290.

3. Соколенко Е.А., Соколов А.В., Финогенова О.А., Соколов В.С., Донцов А.Е. Влияние продуктов фотолиза зрительного родопсина на бислойные липидные мембраны. III Съезд биофизиков России. Воронеж. 2004. Т. 2. С. 458-459.

4. Sokolenko E.A., Sokolov V.S., Sokolov A.V., Finogenova O.A., Dontsov A.E., Ostrovsky M.A. Interaction of pyridinium bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. 15th IUPAB & 5th EBSA International Biophysical Congress. Montpellier, France. Eur. Biophys. J. 2005. V. 34[6]. P. 772.

5. Finogenova O., Vitkova V., Genova J., Mitov M.D., Bivas I., Ermakov Yu.A. The bending elasticity of charged lipid bilayers. 15th IUPAB & 5th EBSA International Biophysical Congress. Montpellier, France. Eur. Biophys. J. 2005. V. 34[6]. P. 696 (P-456).

6. Finogenova O.A., Kontarov N.A., Norik V.P., Ermakov Y.A. Bending elasticity of charged lipid bilayers: effect of sucrose. 8th International Frumkin Symposium. Moscow. 2005. P. 192.

7. Sokolenko E.A., Sokolov V.S., Sokolov A.V., Finogenova O.A., Dontsov A.E., Ostrovsky M.A. Interaction of bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. 8th International Frumkin Symposium. Moscow. 2005. P. 236.

8. Finogenova O.A., Filinsky D.V., Ermakov Y.A. Contribution of charged and neutral lipids to membrane elasticity and adsorption of polypeptides. 6th EBSA & British Biophysical Society Congress. London. Eur. Biophys. J. 2007. P. S70 (P-72).

9. Тимофеева Л.М., Клещева Н.А., Мороз А.Ф., Диденко Л.В., Финогенова О.А., Ермаков Ю.А. Вторичные и третичные полидиаллиламины:

мембранотропные свойства и биоцидная активность. XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Москва. 2007. Т. 4. С. 596.

10. Финогенова О.А., Тимофеева Л.М., Ермаков Ю.А. Электростатические эффекты при адсорбции и десорбции поликатионов на поверхности липидных мембран разного состава. III Международная конференция по коллоидной химии и физико-химической механике. Москва. 2008. С. 29 (ВР06).