

На правах рукописи

НОРИК Владимир Петрович

Мягкая порация бислойных фосфолипидных мембран при температуре фазового перехода липида из жидко-кристаллического состояния в гель

03.00.02 – Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2007

Работа выполнена на кафедре медицинской и биологической
Физики Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова

Научные руководители:

Доктор биологических наук, профессор Антонов Валерий Федорович

Доктор физико-математических наук, профессор Козлова Елена Карловна

Официальные оппоненты:

Доктор физико-математических наук, профессор Иванов И.И.

Кандидат физико-математических наук, Соколов В.С.

Ведущая организация – Институт Теоретической и экспериментальной
биофизики РАН, Пущино.

Защита состоится 24 мая 2007 года

На заседании Диссертационного Совета

Д. 501.001.96 при Московском Государственном университете
им. М.В.Ломоносова

Адрес: 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ, Биологический факультет,
аудитория Новая

Автореферат разослан « ____ » _____ 2007 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

профессор

Т.Е.Кренделева

Актуальность проблемы. Бимолекулярный слой липидов в клеточной мембране определяет барьерные функции живой клетки. В области биофизики ионных каналов в течение последних лет достигнут существенный прогресс. Частично это обусловлено достижениями рентгеноструктурных исследований мембранных белков и липидов (Michel, 1983), обнаружение генетически обусловленного контроля синтеза некоторых канальных белков (Agre, 2002), а также компьютерного моделирования работы одиночных ионных каналов (Mouritsen, 1998). Однако происхождение и эволюция чисто липидных пор остаются до настоящего времени слабо изученными.

В последнее время широкое применение в экспериментальной биологии и медицине получила электропорация клеточных мембран, обусловленная электрическим пробоем липидного бислоя (Абидор и др. 1982).

Ранее в нашей лаборатории было обнаружено принципиальное сходство в эволюции липидных пор, возникающих при электропорации и при фазовом переходе липидов. Мягкая порация бислоя, не требующая электрической предобработки мембран, обнаружена при фазовом переходе мембранных липидов (Антонов В.Ф. и др., 1992, Антонов В.Ф., 1998) и осмотическом набухании липидных везикул (Taupin C. et al., 1975). Одиночные липидные проводящие поры в плоских бислойных липидных мембранах (пБЛМ), обнаруженные впервые при фазовом переходе дистеароилфосфатидилхолина из жидкокристаллического состояния в гель (Antonov et al, 1980), имеют общий с электропорацией механизм возникновения, обусловленный превращением исходно гидрофобной поры в гидрофильную с последующим закрытием ее или разрывом бислоя. Разрыв бислоя теоретически был предсказан Дерягиным и сотрудниками на основе концепции критической поры (Дерягин и Гутоп, 1962, Дерягин и Прохоров, 1981).

Цель и задачи исследования. Основной целью работы являлось экспериментальное исследование явления мягкой порации липидных мембран, основанного на структурных перестройках липидного бислоя в результате фазового перехода мембранных фосфолипидов из жидкокристаллического состояния в гель-состояние. Важной особенностью мягкой порации в отличие от электропорации является то, что помимо отсутствия электрического пробоя бислоя, структурные перестройки клеточных мембран, сопряженные с фазовыми переходами мембранных липидов, протекают при физиологических температурах. В случае изотермического фазового перехода заряженного бислоя, обусловленного ионами Ca^{2+} , требуются физиологические концентрации двухвалентных ионов (Антонов В.Ф. и др., 1992.). В связи с этим основной задачей исследования было экспериментальное изучение механизма рождения и эволюции липидных пор в условиях фазового перехода липидов в пБЛМ из жидкокристаллического состояния в гелеобразное при малом непоробойном электрическом напряжении на мембране. В качестве объекта изучения был выбран синтетический дипальмитоилфосфатидилхолин, один из основных фосфолипидов клеточной мембраны, а также гидрогенизированный яичный лецитин.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- исследовать электрические характеристики (интегральную проводимость, флуктуации тока и электрическую емкость) пБЛМ при фазовом переходе липида;
- провести калибровку размера одиночных липидных пор с использованием в качестве пробных частиц электронейтральных полимерных молекул полиэтиленгликоля в диапазоне радиусов от 0,60 нм (ПЭГ300) до 2,10 нм (ПЭГ6000) с шагом $\sim 0,15$ нм;
- исследовать ионную селективность одиночных липидных пор в ряду одновалентных катионов: Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ .

Научная новизна

Предложен способ мягкой порации липидного бислоя, основанный на фазовом переходе мембранных фосфолипидов из жидкокристаллического состояния в гель. В отличие от электропорации метод мягкой порации позволяет получать липидные поры в условиях физиологических значений мембранного потенциала (10-100 мВ).

Установлено, что при температуре фазового перехода дипальмитоилафосфатидилхолина (ДПФХ) имеет место снижение электрической емкости пБЛМ приблизительно на 14 %, что согласуется с данными рентгеноструктурного анализа по толщине бислоя из ДПФХ для фазового перехода жидкое-твердое (Геннис П., 1997).

Показано, что значительные флуктуации тока, свидетельствующие о рождении липидных пор при температурном фазовом переходе, обусловлены структурными перестройками бислоя в относительно узком температурном интервале ± 2 °С относительно температуры основного фазового перехода.

Исследована проводимость одиночных липидных пор в ряду одновалентных катионов $G_{Li}:G_{Na}:G_{K}:G_{Rb}:G_{Cs}=1:0,9:0,4:0,4:0,3$. Данный ряд соответствует XI ряду в классификации Эйзенмана (Eisenmann G., 1962). Катионы подразделяются на две группы: относительно высокая проводимость для Li^+ и Na^+ и низкая для K^+ , Rb^+ и Cs^+ . Обнаруженный ряд селективности свидетельствует о том, что пора является гидрофильной. Гидрофильность поры подтверждается линейным характером вольтамперных характеристик пор.

Впервые проведена калибровка размера липидных пор. Экспериментальное определение размеров пор производилось путем регистрации флуктуаций тока в пБЛМ, находящихся в 20%-ном водном растворе полиэтиленгликоля определенной молекулярной массы. Определено, что радиус липидной поры лежит в пределах радиуса молекул ПЭГ-1450, ПЭГ-2000 и ПЭГ-3350 (от 1,22нм до 1,63нм).

Практическая значимость работы

Основной областью приложения результатов работы является липосомология. Способность липосом взаимодействовать с клетками, перенося свое содержимое через барьер плазматической мембраны в цитоплазму, привлекает к ним исследователей, занимающихся клеточной биологией. Этот процесс используется для изучения слияния клеток, в генной инженерии - для введения внутрь клетки генетического материала, в фармакологии - для обычного и направленного транспорта лекарственных соединений. Термочувствительность липосом широко используется в онкологии при гипертермическом воздействии на опухоли.

Апробация работы

Результаты работы были опубликованы в 7 научных статьях в журналах «Биофизика» и «European Biophysics Journal», обсуждены на III Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), II Евразийском конгрессе по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2005» Москва 21-24 июня 2005 г, на заседаниях секции биофизики Московского общества испытателей природы 2000-2003г.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 108 страницах рукописи и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов, обсуждения, выводов и списка литературы.

Материалы и методы исследования

Для формирования пБЛМ и липосом были выбраны цвиттерионный дипальмитоилфосфатидилхолин (Avanti) и природный липид - гидрированный яичный лецитин (Avanti).

Термодинамические характеристики фазового перехода в липидном бислое определялись с помощью метода калориметрии. В работе использовался дифференциальный адиабатный сканирующий микрокалориметр ДАСМ-4 (Пушино).

Плоские бислойные липидные мембраны формировали по методике Мюллера и др. (1962). В качестве растворителя использовался н-декан.

Регистрацию флуктуаций тока в режиме фиксации напряжения проводили с помощью прибора для измерения ионных токов (Пушино).

Оценка радиуса пор производилась тремя независимыми способами. Радиус одиночных пор оценивали по амплитуде флуктуаций тока в режиме фиксации напряжения. Достаточно большое значение проводимости позволили оценить размер пор методом, предложенным в работе (Eldridge C., Morowitz, 1978), в которой учитывается влияние электроосмоса. Впервые использован метод оценки радиуса пор в липидном бислое по их проводимости в присутствии гидрофильных молекул полиэтиленгликоля различной молекулярной массы (ПЭГ300, ПЭГ600, ПЭГ1450, ПЭГ2000, ПЭГ3350 и ПЭГ6000 фирмы Sigma), гидродинамический радиус которых сравним с предполагаемыми радиусами липидных пор и достаточно хорошо определен (Моровец, 1967., Kuga, 1981).

Результаты

1.Термограммы БЛМ из ДПФХ в растворах одновалентных катионов.

На рис. 1 представлена типичная термограмма суспензии липосом из ДПФХ в растворах 1 М хлоридов Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ . На кривой видны два пика: пик предперехода при $35,5^{\circ}\text{C}$ и пик основного фазового перехода из ЖКС в гель при 41°C .

Положение пиков одинаково для всех солей, кроме LiCl . На рис. 1б показано смещение обоих пиков в область более высоких температур при формировании БЛМ в растворе 1 М LiCl : пик основного фазового перехода смещается до 43°C и пик предперехода до 40°C . Это свидетельствует о более сильном взаимодействии Li^+ с полярными группами молекул ДПФХ по сравнению с другими катионами, что, возможно, приводит к более плотной упаковке бислоя. Аналогичный сдвиг ранее наблюдался Cunningham et. al., (1986).

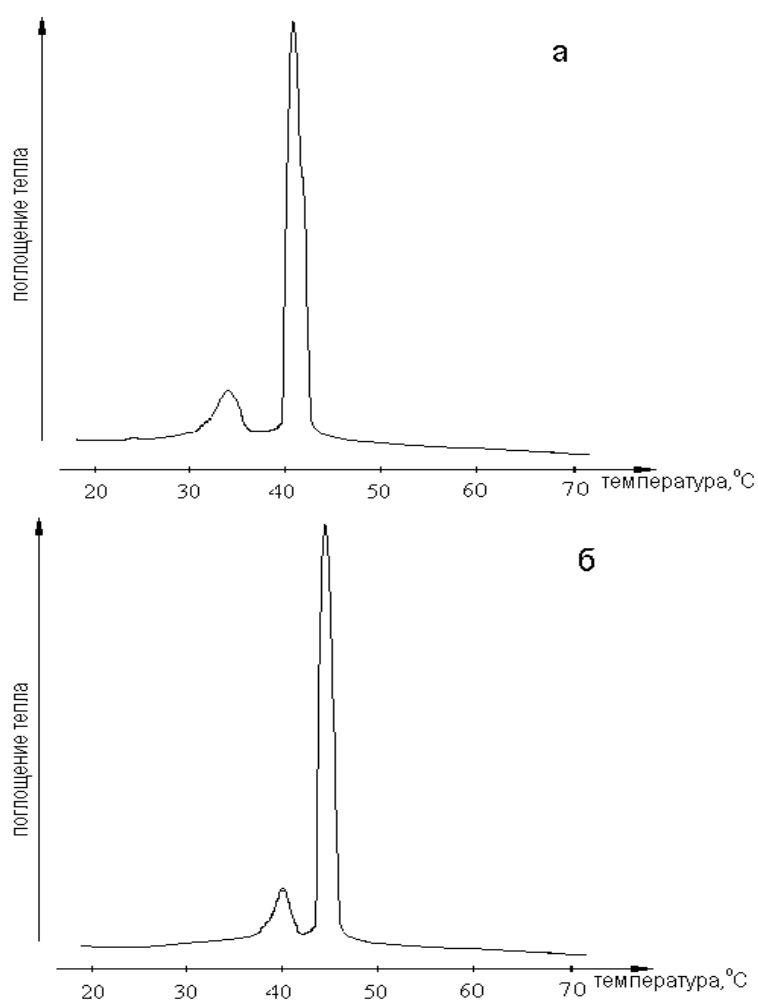


Рис. 1. Термограммы дисперсии ДПФХ в водных 1 М растворах электролитов (без буфера, pH 6,9): а) NaCl, KCl, RbCl, CsCl,; б) LiCl.

Таблица 1. Используемые в исследованиях липиды и их термодинамические параметры.

Липид	$T_{пп}$, °C	$T_{фп}$, °C	$\Delta H_{предперехода}$, ккал/моль	$\Delta H_{основного}$ перехода, ккал/моль	Размер кооперативной единицы
Дипальмитоилфос фатидилхолин (ДПФХ)	35,5	41,5	1,6	8,7	100
Гидрированный яичный лецитин (ГЯЛ)	—	51	—	4,6	80

$T_{пп}$ – температура предперехода ДПФХ, $T_{фп}$ – температура основного фазового перехода ДПФХ.

2.Электрическая емкость пБЛМ при температуре фазового перехода ДПФХ.

По данным рентгеноструктурного анализа (Геннис П., 1997) толщина липидного бислоя из ДПФХ при фазовом переходе из ЖКС в гель возрастает от 3,9 до 4,7 нм, т.е. приблизительно на 17%. Поскольку состояние основного растворителя мембраны н-декана при этой температуре не изменяется, то можно ожидать приблизительно такого же уменьшения емкости в предположении постоянства диэлектрической проницаемости и площади пБЛМ. Полученные экспериментально данные, показанные на рис. 2, подтверждают это предположение.

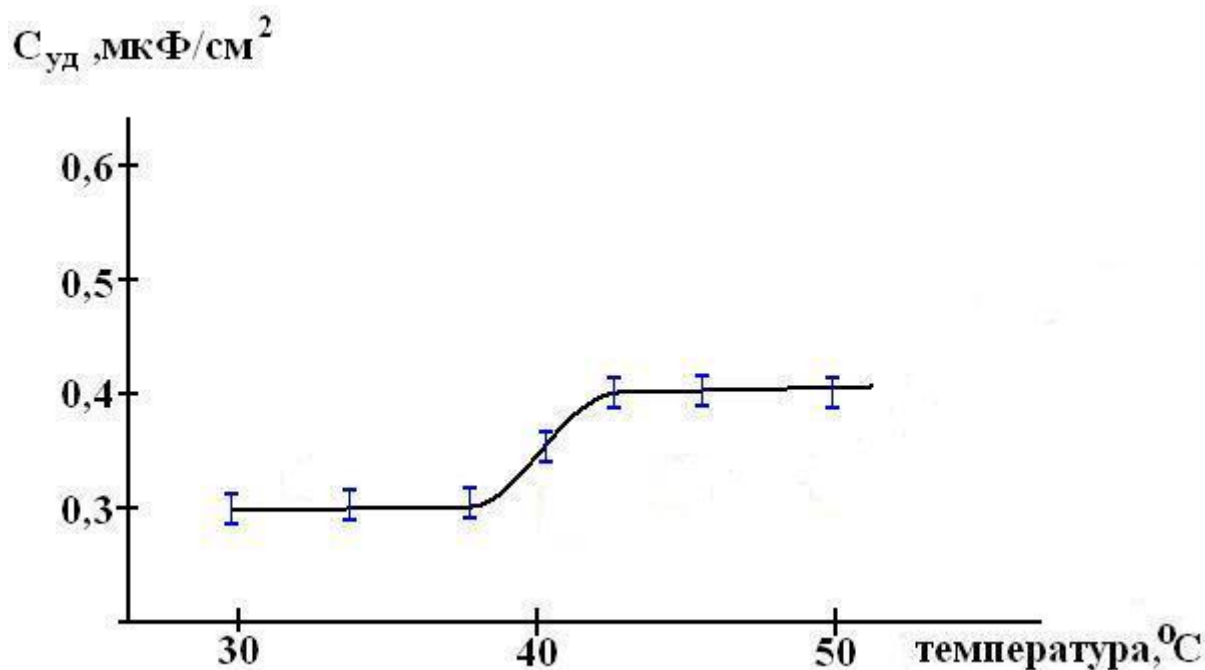


Рис. 2. Температурные изменения удельной емкости пБЛМ из ДПФХ в водном 1 М растворе LiCl, без буфера, pH 6,9.

На рисунке видно, что действительно, в области основного фазового перехода ДПФХ имеет место снижение электрической емкости приблизительно на 14 %, что можно считать хорошим совпадением с данными рентгеноструктурного анализа (Геннис П., 1997), свидетельствующими об утолщении бислоя в результате перехода жирнокислотных радикалов в полностью транс-конформацию.

3. Флуктуации тока пБЛМ при температуре фазового перехода из ЖКС в гель.

Ранее было обнаружено, что снижение температуры БЛМ из индивидуального динасыщенного 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина сопровождается появлением флуктуаций тока в области температуры основного фазового перехода, что свидетельствует о рождении чисто липидных пор (Antonov et al, 1980). Эти данные были подтверждены в работе (Boheim et al., 1980) с другим цвиттерионным фосфолипидом 1-стеароил-3-миристоил-глицеро-2-фосфохолином при температуре фазового перехода этого липида. Позднее удалось сформировать пБЛМ из фосфатидной кислоты и наблюдать флуктуации тока, индуцированные ионами Ca^{2+} в изотермическом режиме (Antonov et al, 1985).

На рис. 3 представлены записи отдельных флуктуаций тока, регистрируемые нами в режиме фиксации напряжения на пБЛМ из ДПФХ при различных фиксированных температурах. Как видно на рис. 3а, флуктуации тока при температуре, превышающей температуру фазового перехода ($50^{\circ}C$) практически отсутствуют и на гистограмме распределения тока (справа) единственный максимум лежит в области нулевых значений тока. Флуктуации тока отсутствуют и при температуре ниже фазового перехода.

При температуре основного фазового перехода, поддерживаемой термостатом с точностью $0,5^{\circ}C$, наблюдаются хорошо разрешенные флуктуации тока большой амплитуды. Длительность одиночных флуктуаций может достигать нескольких секунд (рис. 3б). Помимо одиночных регистрируются двух и трехуровневые флуктуации тока. На гистограмме токов (справа), помимо нулевого значения, видны два максимума распределения. Этот результат указывает на формирование кластера и/или коалесценцию пор. Такое предположение подтверждается видом гистограммы токов при 1,5 и 3 нА.

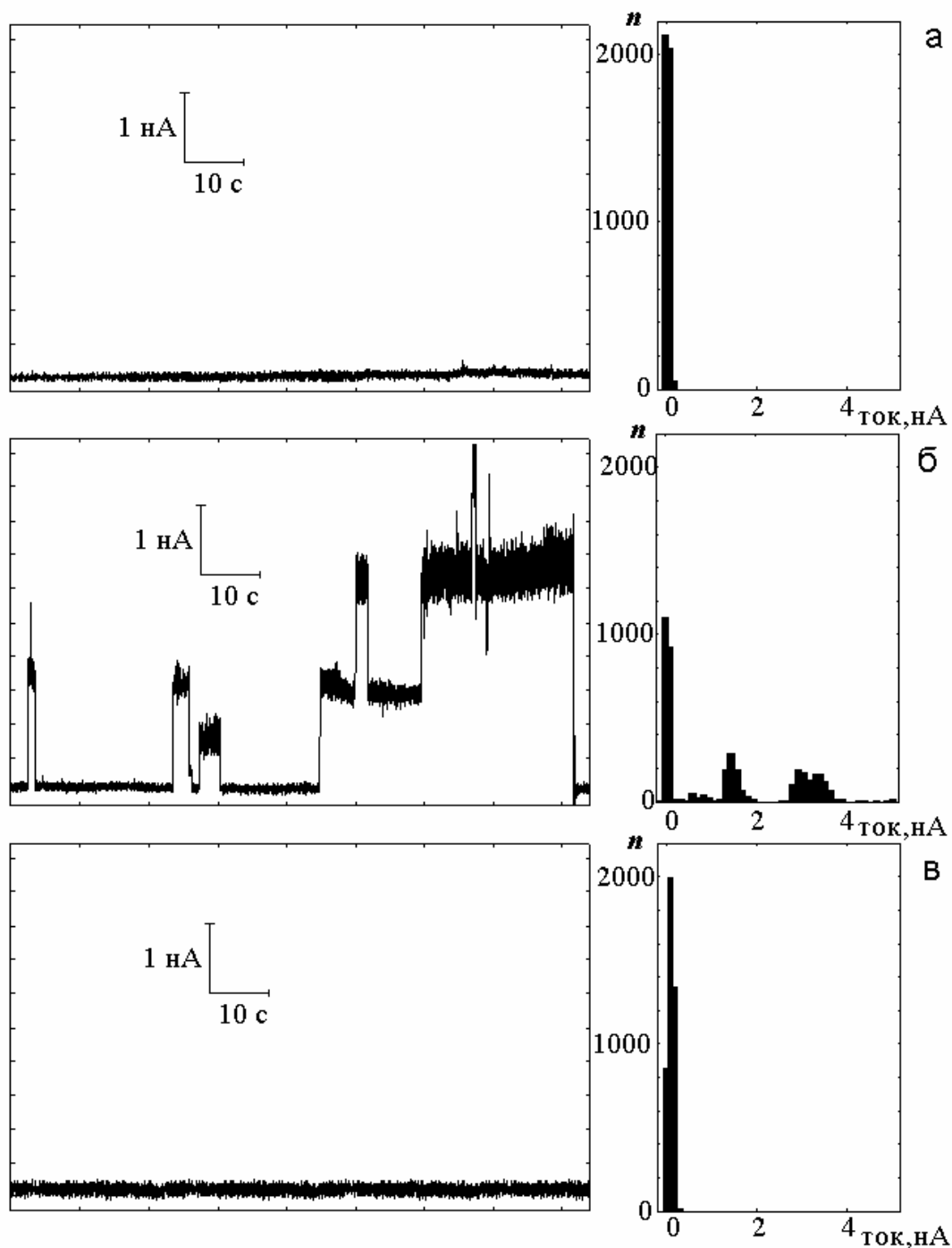


Рис. 3. Флуктуации и гистограммы тока в пБЛМ (при фиксированном напряжении 50 мВ) из ДПФХ в 1 М водном растворе LiCl, (без буфера, pH 6,9) при различных фиксированных температурах: а - 50°C (температура T выше температуры $T_{\Phi\Pi}$ основного фазового перехода $T > T_{\Phi\Pi}$); б - 43°C ($T = T_{\Phi\Pi}$); в - 33 °C ($T < T_{\Phi\Pi}$). n – частота попадания значений тока в заданный интервал. Частота стробирования 80 Гц.

Ранее в опытах с пБЛМ из гидрированного яичного лецитина было установлено (Аносов и др. 1999), что флуктуации тока, обусловленные

одинокими липидными порами, имеют экспоненциально распределенные времена жизни пор в закрытом состоянии, что свидетельствует о независимом появлении липидных пор. С учетом этого предполагалось независимое существование пор. В наших опытах с ДПФХ (рис.3б) видно, что поры могут открываться последовательно, а закрываться одновременно, что указывает на возможность их взаимодействия.

Для подтверждения этого предположения рассмотрим распределение Пуассона для одиночных импульсов тока. Как видно на рис. 3б(распределение флуктуаций в пределах пика считается гауссовым) уравнение Пуассона для этого случая имеет вид:

$$P_n = (v\tau)^n \exp(-v\tau) / n! \quad (1)$$

где v - средняя скорость возникновения импульсов тока, τ - средняя длительность импульсов.

Следовательно, вероятность открытия двух пор P_2 , отнесенная к вероятности открытия одной поры P_1 , будет равна:

$$P_2/P_1 = v\tau/2. \quad (2)$$

Для среднего времени жизни поры в открытом состоянии $\tau=2\text{с}$ и $v=0,23\text{с}^{-1}$ $P_2/P_1=0,23$, из чего следует, что вероятность одновременного существования двух пор в мембране должно быть приблизительно в четыре раза меньше вероятности существования одной поры. Однако сравнение площадей под пиками гистограммы (см. гистограммы на рис.3б) показывает, что их площади приблизительно равны, что противоречит предположению о независимости липидных пор. Эти данные свидетельствуют о зависимом существовании пор и это вывод согласуется с гипотезой Freeman et.al., (1994) о коалесценции пор.

Таким образом полученные нами данные указывают на то, что структурные перестройки липидного бислоя при температуре основного фазового перехода липида сопровождается появлением долгоживущих гидрофильных пор с тенденцией к их слиянию.

4. Вольтамперная характеристика пБЛМ из ДПФХ при температуре основного фазового перехода.

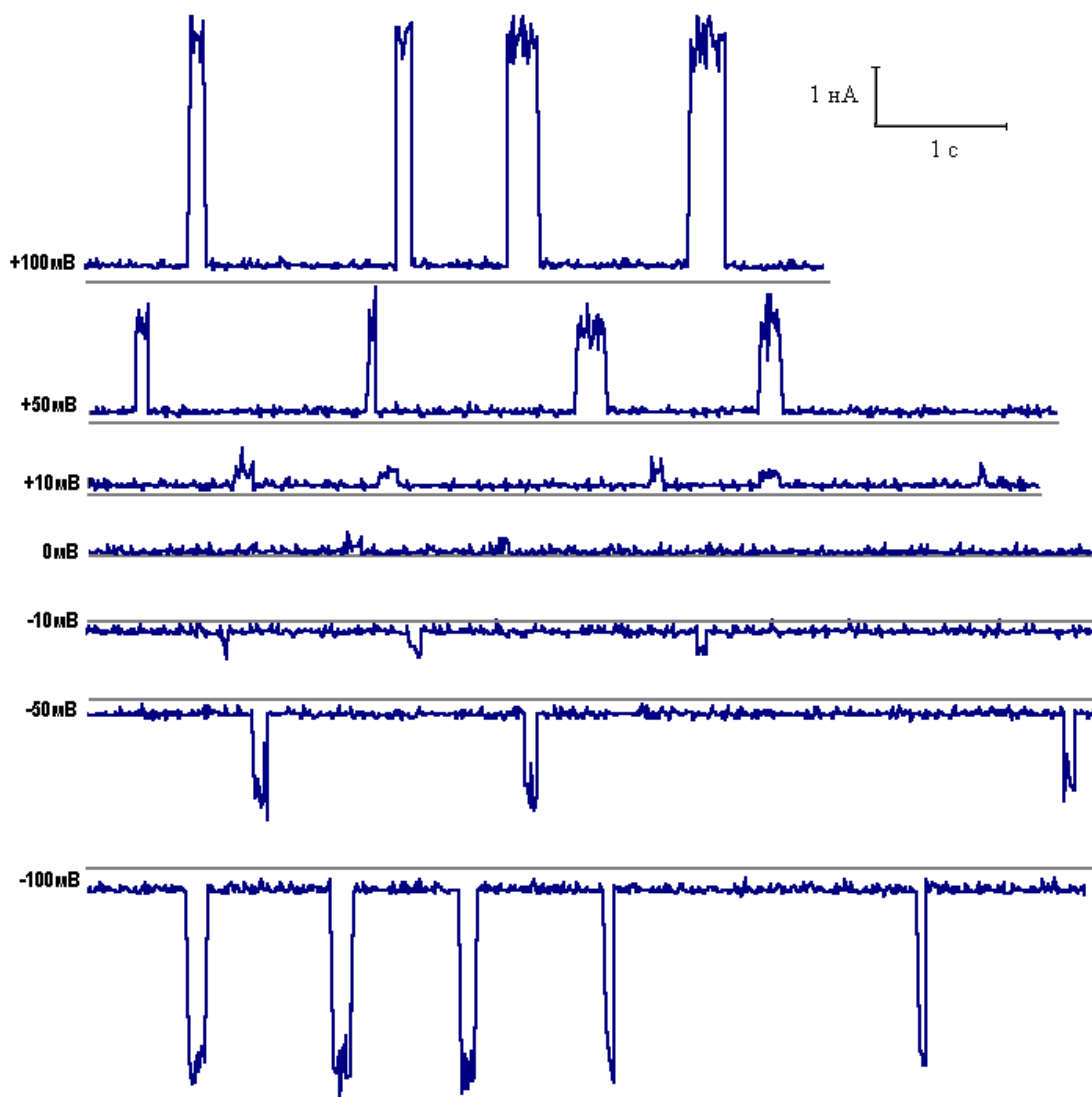


Рис.4. Флуктуации тока в пБЛМ из ДПФХ при фиксированной температуре $43,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ при различных значениях фиксированного напряжения на мембране. Горизонтальные линии - нулевой уровень. Среда содержала водный раствор 1М LiCl, без буфера, pH 6,9.

В ходе эксперимента пБЛМ из ДПФХ формировались при температуре выше температуры основного фазового перехода – $T_{\text{фп}}$, после чего температура снижалась до $T_{\text{фп}}$ и поддерживалась термостатом в течение всего эксперимента.

На рисунке 4 представлены типичные записи флуктуаций тока, регистрируемых в пБЛМ при различных значениях фиксированного мембранного потенциала. Можно видеть снижение амплитуды флуктуаций с уменьшением напряжения (рис. 4 а, б, в), исчезновение флуктуаций при нулевом потенциале и нарастание амплитуды флуктуаций тока противоположного направления при смене знака напряжения (три нижних записи).

Как видно на рисунке 5 ВАХ пБЛМ при $T_{\text{фп}}$ линейны в диапазоне напряжений ± 100 мВ и проходит через начало координат. Крутизна ВАХ сохраняя линейный характер, снижается с уменьшением концентрации электролита (не показано). Линейный характер ВАХ свидетельствует о независимости проводимости липидной поры от напряжений в изученном диапазоне.

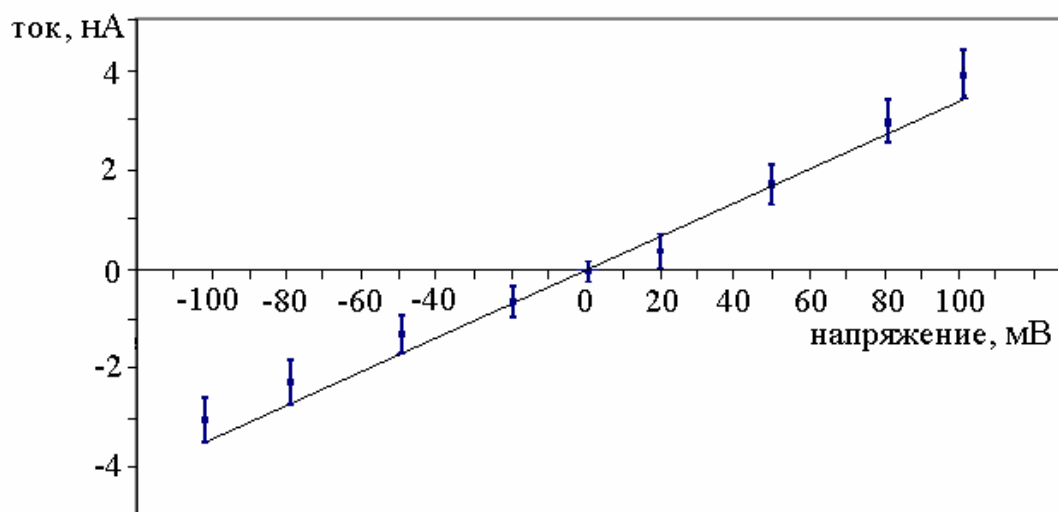


Рис. 5. Вольтамперная характеристика одиночной поры в пБЛМ из ДПФХ при температуре фазового перехода (каждая точка построена по 150 измерениям). Среда: 1 М LiCl, без буфера, рН 6,9.

5.Ионная селективность одиночной липидной поры.

Единичные флуктуации тока в режиме фиксации напряжения, которые были использованы для оценки катионной селективности одиночных липидных пор, регистрировали в одномолярных растворах LiCl, NaCl, KCl,

RbCl, CsCl. Ранее было показано, что пБЛМ из фосфолипидов при $T=T_{\text{фп}}$ обладают катионной селективностью (Петров и др. 1976), однако систематических опытов в ряду всех физиологически важных одновалентных катионов не проводилось.

Результаты исследования проводимости отдельных пор в растворах различных катионов представлены в табл. 2. Показаны средние значения проводимости пор при $T=T_{\text{фп}}$ в растворе соответствующего катиона.

Таблица 2. Проводимость одиночных липидных пор в пБЛМ из ДПФХ при температуре основного фазового перехода ДПФХ. Среда содержала 1 М соответствующего хлорида, рН 6,9, без буфера.

Катион	Проводимость поры, нСм
Li^+	31 ± 15 (250)*
Na^+	28 ± 16 (90)
K^+	12 ± 2 (80)
Rb^+	12 ± 4 (49)
Cs^+	10 ± 6 (40)

* в скобках указано число пор.

Как видно, катионы подразделяются на две группы: относительно высокая проводимость для Li^+ и Na^+ и низкая для K^+ , Rb^+ и Cs^+ . Проводимость одиночных липидных пор в ряду одновалентных катионов $G_{\text{Li}}:G_{\text{Na}}:G_{\text{K}}:G_{\text{Rb}}:G_{\text{Cs}}=1:0,9:0,4:0,4:0,3$. Данный ряд соответствует XI ряду в классификации Эйзенмана (Eisenmann G., 1962). Обнаруженный ряд селективности свидетельствует о том, что пора является гидрофильной. Об этом свидетельствует также омический характер проводимости

6. Количественная оценка радиуса липидной поры.

Экспериментальное определение размеров пор производилось тремя независимыми методами. В первом случае применяли метод, предложенный Merzliak et al. (1991) путем регистрации флуктуаций тока в ионных каналах из белка порина, встроенных в пБЛМ, находящихся в растворе соли с

добавлением 20% полиэтиленгликоля (ПЭГ) определенной молекулярной массы. На рис.7 представлены записи тока на мембране в серии опытов с частицами ПЭГ различного гидродинамического радиуса.

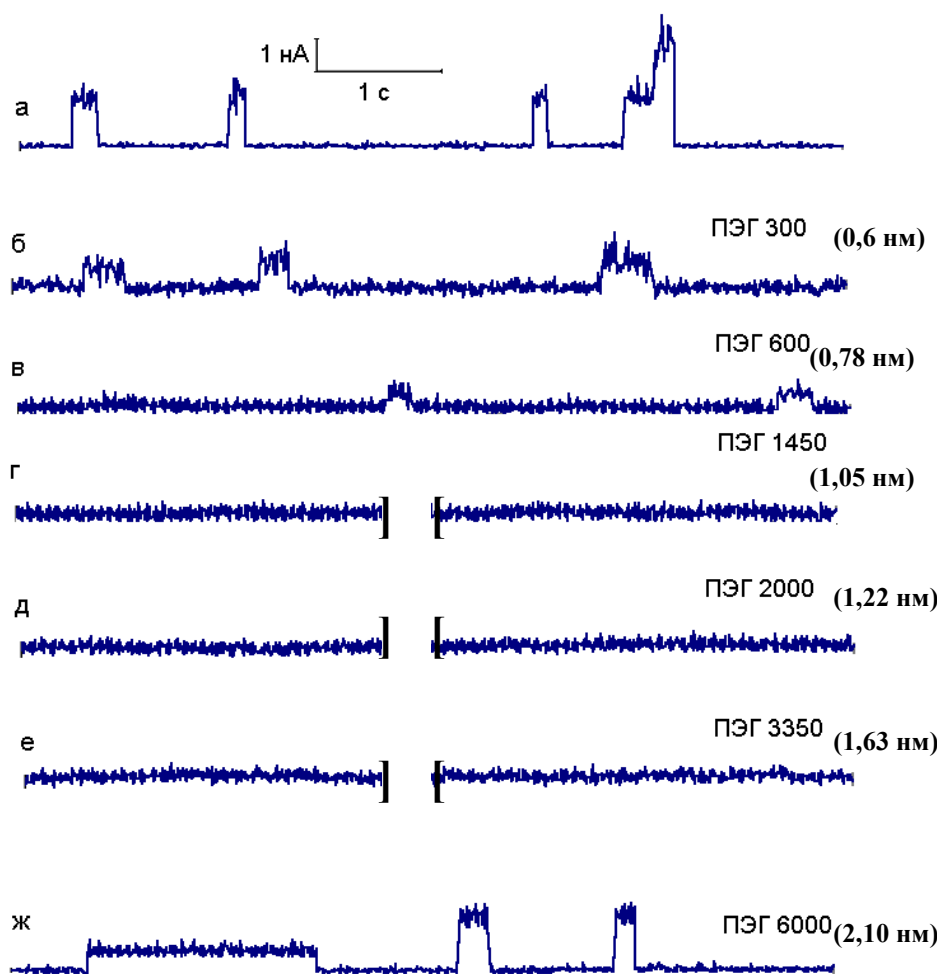


Рис. 6. Флуктуации тока в режиме фиксации напряжения на пБЛМ из ДПФХ с содержанием в среде 20 % по весу полиэтиленгликолей (ПЭГ) различной молекулярной массы при $43 \pm 0,5^\circ\text{C}$: а - базовый раствор (1 М LiCl, без буфера, рН 6,9); б, в, г, д, е, ж - в базовый раствор добавлены ПЭГ. Фиксированное напряжение 50 мВ. Разрывы на кривых г, д, е составляют не менее 25 минут. Среднее время жизни пБЛМ при температуре фазового перехода ~ 30 мин.

В контроле регистрировали флуктуации тока пБЛМ в растворе LiCl при температуре основного фазового перехода ДПФХ (рис. 6а). Последовательное добавление ПЭГ-300 и ПЭГ-600 приводит к постепенному снижению амплитуды флуктуаций. (рис. 6б и 6в). В растворах ПЭГ-1450, ПЭГ-2000 и ПЭГ-3350 флуктуации тока исчезают (рис. 6г, д, е). В растворе ПЭГ-6000 вновь появились флуктуации тока с амплитудой близкой к

исходной. Полученные данные следует трактовать следующим образом. Исходно электрический ток в порах переносится в основном катионами Li^+ . Добавление в раствор ПЭГ-300 и ПЭГ-600 сопровождается вхождением нейтральных молекул полиэтиленгликоля в просвет поры и снижением тока через пору. В растворах ПЭГ-1450, ПЭГ-2000 и ПЭГ-3350 липидные поры заполняются молекулами полиэтиленгликоля, и ток через мембрану блокируется. Отметим, что полная блокада липидных пор молекулами ПЭГ строго определенного размера обнаружена впервые. Принципиально важным является следующий результат, где молекулы большего размера ПЭГ-6000 с радиусом 2,10 нм восстанавливают картину флуктуаций тока, близкую к исходной. Эффект блокирования-деблокирования липидных пор молекулами ПЭГ свидетельствуют о чисто стерическом взаимодействии молекул ПЭГ с липидными порами. Исходя из этого, можно утверждать, что размер пор лежит в пределах от 1,05 нм до 1,63 нм.

Второй и третий способы суммированы в таблице 3.

Таблица 3. Радиусы липидных пор в пБЛМ из ДПФХ, регистрируемых при температуре основного фазового перехода ДПФХ в 1М растворах одновалентных катионов. Толщина бислоя 5 нм.

Катион	Расчет радиуса поры по проводимости отдельных пор, нм	Расчет радиуса поры по работе Илдридж, Морвиц, нм	Оценка радиуса поры по результатам эксперимента с ПЭГ, нм
Li^+	$2,1 \pm 0,9$	1,4	1,05 * ПЭГ-1440 1,22 ПЭГ-2000 1,69 ПЭГ-3550
Na^+	$1,9 \pm 0,8$	1,5	-
K^+	$1,0 \pm 0,2$	1,4	-
Rb^+	$1,0 \pm 0,3$	1,3	-
Cs^+	$0,9 \pm 0,4$	1,3	-
Среднее значение	-	$1,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,3$

*Гидродинамические радиусы молекул ПЭГ, блокирующих проводимость липидных пор (см рис. 6)

7. Краевое натяжение пор.

Основным отличием мягкой порации от электропорации является низкое (<100мВ) значение мембранного потенциала. Высокое пороговое значение напряжения (>230мВ) на мембране в случае электропорации сопровождается появлением большого количества пор: более 10^5 на пБЛМ площадью 1мм^2 (Glaser R.W. et al., 1988), что затрудняет возможность регистрации одиночных пор. В случае мягкой порации получено небольшое количество хорошо разрешенных пор.

Согласно Freeman et al., (1994) в стационарных условиях в нулевом приближении напряжения на мембране количество N одиночных липидных пор может быть найдено по формуле:

$$N=n_0\lambda_r\exp(-r/\lambda_r) \quad (3)$$

где $n_0=1,2\cdot 10^{24}\text{ м}^{-1}$ - начальное значение плотности вероятности рождения поры, $r=1\text{ нм}$ - радиус поры, $\lambda_r=kT/2\pi\gamma\approx 3\cdot 10^{-11}\text{ м}$ - характеристическая длина в пространстве радиусов, k - постоянная Больцмана, T - абсолютная температура, γ - краевое натяжение поры.

Как было показано ранее, в случае мягкой порации величина N поддается непосредственному подсчету(рис.3), что позволяет сравнить теорию с экспериментом.

Таблица 4. Количество и краевое натяжение одиночных липидных пор при температуре основного фазового перехода ДПФХ в 1М растворах одновалентных катионов.

Электролит	Количество пор, оцененных экспериментально по флуктуациям тока (на одну мембрану)	Краевое натяжение поры, Н ($\times 10^{-11}$)
LiCl	36 ± 7 (7)*	0,95
NaCl	12 ± 5 (7)	0,98
KCl	10 ± 4 (7)	0,98
RbCl	7 ± 3 (6)	1,00
CsCl	4 ± 2 (8)	1,02

*Количество пБЛМ. Время жизни мембран приблизительно одинаково.

Из табличных данных следует, что величина краевого натяжения поры хорошо согласуется с данными известными в литературе (см. Freeman et al., 1984). Данные позволяют сделать вывод о том, что теория Freeman et al. применима для оценки краевого натяжения чисто липидных пор в условиях мягкой порации, когда можно пренебречь мембранным потенциалом, амплитуда которого много ниже порогового значения электрического пробоя. В этот диапазон попадают все физиологически значимые мембранные потенциалы, включая потенциалы покоя и действия в электрофизиологии. Интересно отметить, что краевое натяжение чисто липидной поры обладает некоторой ионной избирательностью.

Популяция чисто липидных пор в плоской бислоидной липидной мембране из ДПФХ, сформированной по методике Мюллера и др. при фазовом переходе липида из жидкокристаллического состояния в гель, характеризуется следующими численными значениями:

Численные значения параметров при $T > T_{\text{фп}}$

Символ	Значение	Величина
A_m	Площадь пБЛМ	1 мм ²
$C_{\text{уд}}$	Удельная емкость мембраны	$0,31 \cdot 10^{-2} \text{Ф/м}^2$
h	Толщина бислоя	5 нм
$r_{\text{мин}}$	Минимальный радиус поры	1,3 нм
γ	Краевое натяжение поры	$1 \cdot 10^{-11} \text{Н}$
σ	Поверхностное натяжение бислоя	$1 \cdot 10^{-3} \text{Н/м}$
$r_{\text{крит}}$	Критический радиус поры	10 нм
$T_{\text{фп}}$	Температура основного фазового перехода	43°C

h – расчет по формуле плоского конденсатора из данных по емкости пБЛМ.

$r_{\text{мин}}$ – расчет по проводимости единичной поры, определенной по флуктуациям тока. (Антонов, 1992)

γ – расчет по формуле Freeman et al (1984)

σ – расчет по формуле Лапласа. (Tien, 1974)

$r_{\text{крит}}$ – расчет по формуле Дерягина и др. (1987)

$T_{\text{фп}}$ – прямое измерение методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Обсуждение

Полученные нами экспериментальные данные об эволюции одиночных липидных пор в условиях мягкой порации позволяют ответить на несколько вопросов, связанных с порацией липидного бислоя в отсутствие белков-каналотформеров. При мягкой порации в условиях фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель удастся получить на мембране небольшое количество хорошо разрешенных и долгоживущих чисто липидных пор.

Поскольку в условиях мягкой порации мембранный потенциал не играет существенной роли в определении физического состояния липидного бислоя, торегистрируемые одиночные поры могут стабилизироваться только краевым натяжением поры. Количественная оценка краевого натяжения поры может быть произведена согласно Freeman et al (1984) по количеству пор приходящихся на одну мембрану. Проведенные нами расчеты показали хорошее соответствие полученных нами данных с оценками краевого натяжения пор известными в литературе.

Впервые проведенная количественная оценка радиуса чисто липидных пор тремя независимыми методами показала хорошее согласие между этими методами. Средняя величина равна 1,3 нм, что согласуется с оценкой одиночных липидных пор наблюдаемых при электропорации (Меликов, 2003).

Выводы.

1 Исследована электрическая проводимость плоских бислойных липидных мембран из дипальмитоилфосфатидилхолина при температуре основного фазового перехода липида. Обнаружена популяция чисто липидных одиночных пор, насчитывающая до 50 пор на одну мембрану площадью 1 мм². Поры не обнаруживаются при температурах выше и ниже температуры основного фазового перехода липида. Поры не обнаруживаются

также при добавлении в мембранный раствор холестерина в концентрации 50 мольных %, блокирующей фазовый переход липидов.

2 Проведена калибровка радиуса пор тремя независимыми методами: по проводимости одиночной поры, по методу Илдриджа и Моровица с учетом электроосмоса в поре и путем использования калиброванных частиц ПЭГ с радиусами от 0,6 до 21 нм. В последнем случае экспериментальное определение размеров пор производилось путем регистрации флуктуаций тока в пБЛМ, находящихся в водных растворах ПЭГ. Определено, что проводимость чисто липидной поры блокируется частицами ПЭГ с радиусами от 1,05 нм до 1,63 нм, что свидетельствует, по-видимому о соответствии радиуса поры радиусу частицы ПЭГ. Все три метода дали совпадающие результаты. Средний радиус поры оказался равным 1,3 нм.

3 Впервые экспериментально определены числовые параметры, необходимые для расчета краевого натяжения поры. В соответствии с теорией Freeman et al (1984) произведен расчет краевого натяжения поры равного $1 \cdot 10^{-11}$ Н, что совпадает с известными литературными данными. Расчетная величина краевого натяжения поры оказалась зависимой от одновалентных катионов в ряду $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$.

4 Исследована ионная селективность чисто липидных пор в ряду одновалентных катионов путем регистрации проводимости одиночных пор. Показано, что ряд селективности определенной по проводимости соответствует $G_{\text{Li}}:G_{\text{Na}}:G_{\text{K}}:G_{\text{Rb}}:G_{\text{Cs}}=1:0,9:0,4:0,4:0,3$.

5 Совокупность полученных и литературных данных подтверждает применимость концепции критической поры как критерия структурной прочности плоской БЛМ в условиях электрического пробоя и мягкой порации. В то время как при электрическом пробое стабильность БЛМ определяется в основном поверхностным натяжением бислоя, в случае мягкой порации основную роль играет линейное натяжение поры.

Список опубликованных статей по теме диссертации

1. Богатырева Н.Э., Норик В.П., Какушкина М.Л., Антонов В.Ф. Обнаружение фазы интердигитации в суспензии липосом из гидрированного яичного лецитина. Доклады МОИП. Общая биология 2001. Депонировано ВИНТИ №1565-В2001. С.11-13
2. Антонов В.Ф., Норик В.П., Аносов А.А., Корепанова Е.А., Смирнова Е.Ю. Electrical capacitance of lipid bilayer membrane of hydrogenated egg lecithin at the temperature phase transition. European Biophysics Journal (2003) 32 #1 P.55-59.
3. Антонов В.Ф., Аносов А.А., Норик В.П., Корепанова Е.А., Смирнова Е.Ю. Электрическая емкость бислойных липидных мембран из гидрированного яичного лецитина при фазовом переходе из жидкокристаллического состояния в гель. Биофизика М. 2003. Т. 48, № 2, С. 240-245
4. В.Ф.Антонов, А.А.Аносков, В.П.Норик, Е.Ю.Смирнова. Мягкая порация плоских бислойных липидных мембран из дипальмитоилфосфатидилхолина при температуре фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель Биофизика, 2005, Т.50, вып.5, с.867-877.
5. Valery F.Antonov, Andrej A.Anosov, Vladimir P.Norik, Elena Y.Smirnova Soft perforation of planar bilayer lipid membranes of dipalmitoylphosphatidylcholine at the temperature of the phase transition from liquid crystalline to the gel state European Biophysics Journal (2005)
6. В.Ф.Антонов, А.А.Аносков, В.П.Норик, В.А.Парнышков. Экспериментальное определение размеров липидных пор, возникающих при температуре фазового перехода липидов. III Съезд биофизиков России (Воронеж, 2004): Тезисы докладов, С 181
7. В.Ф.Антонов, А.А.Аносков, В.П.Норик, Е.Ю.Смирнова, О.Ю.Немченко. Мягкая порация мембран и адресная доставка лекарства. II Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2005» Москва 21-24 июня 2005 г.