

Биоэлектрохимия бислойных липидных мембран

Ю. А. Ермаков

ЮРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ ЕРМАКОВ — доктор физико-математических наук, заместитель заведующего лабораторией биоэлектрохимии Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН. Область научных интересов: электростатика, механика и термодинамика липидных мембран, адсорбция и встраивание в мембраны биологически активных веществ, электрическая структура границ липидных мембран в присутствии синтетических высокомолекулярных соединений.

119071 Москва, Ленинский проспект, 31, стр. 5, тел. (7-495)952-55-82, E-mail yermakov@elchem.ac.ru

Введение

К биоэлектрохимии обычно относят биохимические процессы, в которых принимают участие стенки клеток и внутриклеточных органелл (биологические мембраны), представляющие собой двумерный «раствор» белков в фосфолипидном окружении. Биомембраны создают жизненно важный барьер, регулирующий обмен веществ на клеточном уровне. Биоэлектрохимические методы незаменимы при изучении мембранного транспорта, связанного с переносом заряженных молекул и ионов. Исследования последних лет свидетельствуют о регуляторной функции липидного матрикса таких мембран, которая определяется его составом и физико-химическими характеристиками. Проницаемость биомембран, их электрические и механические свойства, интенсивно исследуют на модельных бислойных липидных мембранах (БЛМ), которым посвящено множество обзоров и монографий (см., например, [1—6]). Не претендуя на полноту цитирования, здесь дан анализ методов исследования электрической структуры межфазных границ этих мембран, которые были разработаны и интенсивно используются в нашей лаборатории [7, 8].

Основное внимание будет уделено взаимодействию БЛМ с неорганическими ионами, от которых зависит степень ионизации, гидратации и фазовое состояние липидного бислоя. Для анализа мембранной активности разнообразных биологически важных амфифильных веществ, белков и полипептидов потребовалось бы значительно больше места, чем можно себе позволить в кратком обзоре методического характера. Важно отметить, что контролируемый состав и особые физико-химические свойства липидных мембран создают уникальные возможности для решения типичной для электрохимии задачи. С их помощью удастся оценить параметры диффузной части двойного электрического слоя (ДЭС), выделить вклад в межфазный потенциал его плотной части, а также связать эти потенциалы с молекулярной природой поверхности мембран. Можно надеяться, что использованные при этом подходы и полученные результаты представляют интерес и для специалистов в области коллоидных систем широкого профиля.

Липидная компонента клеточных мембран состоит в основном из фосфолипидов, и модельные мембраны представляют собой бислойные структуры, сформированные из липидов, углеводородные цепи которых обращены друг к другу, а полярные группы экспонированы в водные растворы по обе стороны мембраны.

Современные представления о распределении электрического поля на границах таких мембран иллюстрирует рис. 1. Различие диэлектрических свойств отдельных областей примерно отражает их молекулярное строение. Электрохимические методы позволяют измерять средние значения электрического потенциала в плоскостях, положение и физический смысл которых зависят от применяемого метода и условий регистрации. Кроме того, эти методы позволяют контролировать только изменения разности потенциалов между этими эквипотенциальными поверхностями и электродом сравнения, расположенным в растворе [9].

Падение потенциала в диффузной части двойного электрического слоя, поверхностный потенциал Φ_s , отражает состояние ионизации полярных групп и их экранирование ионами электролита. Для описания связи этого потенциала с составом электролита оказалось возможным ограничиться простой моделью Гуи—Чепмена, дополненной условием адсорбции ионов по изотерме Ленгмюра (модель Штерна) [10]. Не все исследователи принимают столь упрощенное описание диффузной части двойного электрического слоя [11]. Тем не менее, как следует из проведенного анализа [12], ограниченная точность измерений делает немногие ее параметры вполне достаточными и даже избыточными для описания большинства экспериментальных данных. Падение потенциала внутри полярной области мембраны, где расположены гидрофильные группы фосфолипидов (заштрихована на рисунке), зависит от ориентации дипольных моментов полярных групп липидов и ассоциированных с ними молекул воды, положения плоскости адсорбции гид-

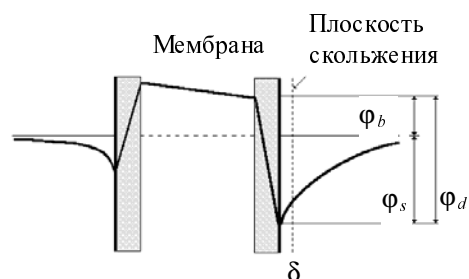


Рис. 1. Распределение электрического поля на обеих границах мембраны при совпадении потенциалов (коротком замыкании) в двух отсеках ячейки.

Полярная область мембраны заштрихована. Вертикальная пунктирная линия указывает положение плоскости скольжения в области диффузной части двойного электрического слоя при электрокинетических измерениях

рофобных ионов и ионизованных групп молекул органических веществ, адсорбированных на поверхности мембраны и т.п. Эта часть граничного потенциала имеет в основном дипольную природу и наименее изучена. Полная разность электрического потенциала между объемом водной фазы и внутренней гидрофобной областью мембраны (граничный потенциал) может быть представлена двумя компонентами: поверхностным и дипольным потенциалами: $\varphi_b = \varphi_s + \varphi_d$.

Измерение граничного потенциала липидных мембран. Метод компенсации внутримембранного поля (КВП)

Плоские БЛМ могут быть сформированы из растворов фосфолипидов (метод Мюллера—Рудина [13]) или путем сведения двух монослоев (метод Монталла [14]) на отверстиях в тефлоновой перегородке ячейки с двумя отсеками. В результате образуется бислойный участок мембраны с диаметром менее 1 мм. Физико-химические аспекты формирования таких структур подробно были исследованы уже в первых разработках экспериментальной техники БЛМ [15]. Условия ее формирования обычно электростатически симметричны, и разность граничных потенциалов ($\Delta\varphi_b$) между сторонами мембраны близка к нулю. Значение $\Delta\varphi_b$ может меняться при адсорбции заряженных молекул и/или изменения условий экранирования поверхностного заряда с одной стороны мембраны.

В определенных условиях $\Delta\varphi_b$ можно контролировать, измеряя падение напряжения между отсеками ячейки, так называемый мембранный потенциал, непосредственно с помощью электрометра в условиях открытой цепи. Мембранный потенциал зависит главным образом от селективной проницаемости мембраны для ионов электролита. Он близок к разности граничных потенциалов только в короткий промежуток времени (10—100 с), в течение которого происходит перераспределение заряда между поверхностями мембраны и устанавливается стационарное распределение поля. Для непрерывной регистрации изменений граничных потенциалов этот метод непригоден.

При условии короткого замыкания потенциалы в объеме двух отсеков ячейки совпадают, а различие граничных потенциалов по обе стороны БЛМ приводит к скачку потенциала внутри ее гидрофобной части. Для измерения этого скачка потенциала его можно скомпенсировать внешним источником напряжения, используя явление электрострикции — зависимости электрической емкости мембраны от приложенного напряжения. В этом и состоит принцип измерения разности граничных потенциалов при компенсации внутримембранного поля — метод КВП.

В ранних исследованиях на плоских БЛМ была обнаружена зависимость электрической емкости от приложенного напряжения (U). Минимум емкости смещается в шкале потенциалов при наличии разности граничных потенциалов с обеих сторон мембраны [16, 17]. Простейшее описание этого эффекта дает механистическая модель упругого конденсатора, пластины которого соединены пружиной [18, 19]: его заряженные пластины сближаются и увеличивают емкость настолько, насколько это позволяют упругие свойства пружины. В качестве альтернативной модели были предложены модели вязкоупругого конденсатора [20] и более сложная модель, в которой внешнее поле

меняет спектр тепловых флуктуаций мембраны [21]. Кроме того, увеличение емкости БЛМ может быть связано и с увеличением ее площади за счет мениска и микролинз. Однако характерная продолжительность этого процесса составляет десятки и сотни секунд, тогда как уменьшение толщины мембраны благодаря электрострикции происходит в течение десятков микросекунд [22].

Для практического использования метода КВП важно, что вблизи минимума емкости все перечисленные модели приводят к одинаковой параболической зависимости, как этого требует общее свойство минимума любой функции:

$$C = C_0[1 + \alpha(U - \Delta\varphi_b)^2] \quad (1)$$

где C_0 — емкость при нулевом падении потенциала в БЛМ; α — коэффициент электрострикции, который имеет величину около $0,1 \text{ В}^{-2}$, обратно пропорциональную упругости мембраны к поперечному сжатию ($\sim 10^7 \text{ Па}$), и зависит от состава липидов в мембране, типа и концентрации органического растворителя [23].

Поиск минимума емкости и процедура компенсации внутримембранного поля может быть обеспечена с помощью различных аппаратных средств: прямым измерением емкости синусоидальным генератором [18, 24, 25]; по форме импульсов тока в ответ на импульсы пилообразного напряжения [26] и др. Наиболее удобным оказалось применение высших гармоник емкостного тока, которые возникают из-за нелинейных свойств емкости. В этом случае индикатором минимума емкости и компенсации внутримембранного поля, при котором $U = \Delta\varphi_b'$, может служить равенство нулю амплитуды второй гармоники тока [18]. Более того, легко реализовать схему автоматической компенсации, если для отрицательной обратной связи использовать фазочувствительный детектор, выходное напряжение которого пропорционально амплитуде и фазе второй гармоники емкостного тока. Блок-схема достаточно проста и может быть реализована с применением как аналоговых, так и цифровых технологий [24, 25, 27]. Точность компенсации внутримембранного поля во многом зависит от коэффициента электрострикции, и наилучшие условия для метода КВП создаются для мембран, сформированных из декановых растворов липидов [23]. Типичная точность измерения граничного потенциала для таких БЛМ составляет около 1 мВ при амплитуде генератора переменного тока 30 мВ (300 Гц) [8].

Не останавливаясь на технических деталях, укажем основные достоинства и ограничения этого метода для регистрации граничных потенциалов. Для его применения необходимо выполнение нескольких условий. Во-первых, внешнее электрическое напряжение должно падать внутри гидрофобной области мембраны, которая определяет ее электрическую емкость, и не должно влиять на распределение граничного потенциала с обеих сторон БЛМ. Действительно, толщина гидрофобной области бимолекулярного слоя липидов составляет около 2—3 нм и имеет низкую диэлектрическую проницаемость. Электрическая емкость этой области оказывается намного меньше последовательно включенных в электрическую цепь емкостей полярной области мембраны и диффузной части электрического двойного слоя. Подробнее эти проблемы рассматрива-

лись в процессе разработки метода КВП [28]. Вторых, области падения диффузной (ϕ_d) и дипольной (ϕ_d) компонент граничного потенциала (ϕ_b) не должны перекрываться (см. рис. 1) и вносить заметный вклад в явление электрострикции. Как было показано в работе [29], это условие зависит от положения плоскости зарядов внутри мембраны и выполняется, если они погружены на небольшую глубину в полярной области мембраны.

Наличие проводимости у мембраны не мешает применению метода КВП до тех пор, пока она не зависит от приложенного напряжения, а емкостной ток превышает ток проводимости на частоте основной гармоники (300 Гц и выше). В большинстве случаев перечисленные выше условия выполняются, и применение метода КВП для изучения соответствующих электростатических эффектов вполне корректно.

Непрерывная регистрация изменений граничного потенциала позволяет отслеживать кинетику адсорбции и десорбции заряженных ионов и молекул [30], определять локализацию флуоресцентных зондов [31], регистрировать перенос заряда через БЛМ при фотореакциях и в присутствии электрогенных АТФаз [32], оценивать активность фосфолипаз [33, 34] и т.п. Кроме того, оказывается возможным проводить тест на обратимость связывания, например полиэлектролитов, путем быстрой перфузии ячейки фоновым раствором [35]. Метод КВП оказывается незаменимым при регистрации электростатических эффектов, которые сопровождают изменение упаковки липидов при фазовом переходе, индуцированном изменением температуры или многовалентными ионами [36].

В этих экспериментах неприменимы альтернативные методы, основанные на измерении подвижности в мембране гидрофобных ионов. Преимущества метода КВП становятся существенными и в тех случаях, когда асимметрия зарядов на мембране оказывается настолько большой, что внутримембранное поле способно привести к электрическому пробое мембраны. Автоматическая компенсация этого поля внутри мембраны в течение всего измерения устраняет эту опасность и повышает стабильность БЛМ. Одновременная регистрация амплитуды первой и высших гармоник емкостного тока дает возможность одновременно контролировать адсорбцию ионов (по 2-й гармонике тока), вызванных ими изменений натяжения мембраны (основная гармоника) и упругости поперечного сжатия мембраны (3-я гармоника) [30].

Диффузная компонента граничного потенциала

Эмпирический подход, изложенный выше [12], позволяет оценить параметры диффузной части двойного электрического слоя в рамках наиболее простой модели, разработанной в начале прошлого века Гуи [37] и Чепменом [38]. Эта модель подробно изложена в учебниках, например [9], и читатель без труда найдет там вывод основных аналитических формул. Приложение теории электрического двойного слоя к электрокинетическим измерениям изложено в специализированных монографиях, например [39], а подробное описание и исчерпывающее цитирование ранних исследований электростатики липидных мембран приведено в обзорах [2, 40].

Состояние ионизации поверхностных групп фосфолипидов непосредственно связано с составом окружающего мембраны электролита. Согласно представлениям, развитым в модели Штерна [41], эта связь вытекает из закона действующих масс. В рамках модели Гуи—Чепмена—Штерна (ГЧШ) для описания адсорбции ионов вводятся константы равновесия и максимальная поверхностная плотность центров связывания, которая обычно выражается через плотность заряда. Несмотря на то, что с этими центрами обычно ассоциируются вполне конкретные группы молекулы с известной геометрией, по-прежнему предполагается, что их заряды равномерно распределены по поверхности. Чтобы не отвлекаться на обсуждение правомерности и противоречивости такого допущения, как и других постулатов модели ГЧШ, читателям предлагается ознакомиться со статьей на эту тему [11].

Большинство экспериментов осуществляется на мембранах, в состав которых входят отрицательно заряженные липиды (фосфатидилсерин PS) и незаряженные, цвиттерионные молекулы фосфатидилхолина (PC). Применение модели ГЧШ к таким мембранам было тщательно разработано Маклафлином [4], который предложил считать центрами конкурентного связывания катионов отрицательно заряженные группы фосфолипидов. В случае одновалентных катионов изотерма адсорбции одновалентных ионов имеет вид:

$$\frac{\sigma}{\sigma_{\max}} = \frac{1}{1 + K_1 c_1 + K_2 c_2} \quad (2)$$

где K_i и c_i — константа диссоциации и равновесная концентрация каждого из адсорбирующихся катионов непосредственно у поверхности.

Данное выражение изотермы Ленгмюра отличается от общепринятого только тем, что в нем отражена не доля свободных центров, а величина поверхностного заряда, которая меняется по мере адсорбции катионов. Максимальная плотность заряда σ_{\max} соответствует полностью ионизованной поверхности. Изотерма конкурентной адсорбции одновалентного ($z = 1$) и многовалентного ($z = z_2$) катионов на центрах связывания при стехиометрии 1 ион на молекулу липида может быть представлена в аналогичном виде:

$$\frac{\sigma}{\sigma_{\max}} = \frac{(z_2 - 1)K_2 c_2 - 1}{1 + K_1 c_1 + K_2 c_2} \quad (3)$$

В случае цвиттерионных липидов (например фосфатидилхолина, PC) адсорбцией одновалентных ионов в присутствии многовалентных обычно можно пренебрегать и изотерма связывания при той же стехиометрии принимает более простой вид:

$$\frac{\sigma}{\sigma_{\max}} = \frac{z_2 K_2 c_2}{1 + K_2 c_2} \quad (4)$$

В тех случаях, когда катионы имеют высокое сродство к поверхности мембран, полное количество ионов в ячейке, отнесенное к ее объему (c_{tot}), может существенно отличаться от их концентрации в объеме электролита (c_{bulk}). Эти эффекты были обнаружены нами в суспензии коллоидных частиц (липосом), где общая поверхность частиц весьма велика. При этом

потребовалось дополнить приведенные выше уравнения условием материального баланса [42, 43]:

$$c_{tot} = c_{bulk} + c_{dif} + c_{ads} \quad (5)$$

Оно учитывает ионы, расположенные в диффузной части двойного электрического слоя вблизи поверхности или адсорбированные на ней и отнесенные к объему ячейки V , которым соответствуют эффективные концентрации c_{dif} и c_{ads} . Избыточное количество ионов, находящихся в диффузном слое в пределах заряженной поверхности, площадь которой равна A , определяется отношением:

$$\frac{c_{dif}}{c_{bulk}} = \Omega \frac{A}{V} \quad (6)$$

где Ω — удельная избыточная концентрация ионов на единице площади.

Значение Ω может быть найдено с учетом соотношения Больцмана и профиля потенциала в диффузном слое:

$$\Omega = \int \left(\frac{c(x)}{c_{bulk}} - 1 \right) dx \quad (7)$$

где x — расстояние от заряженной поверхности.

Если все молекулы липида, эффективная концентрация которых в ячейке равна c_{lip} , а площадь, занимаемая каждой молекулой в монослое A_{lip} , доступны для ионов, то численное значение отношения A/V (m^{-1}) определяется площадью монослоя, построенного из всех молекул фосфолипидов:

$$A/V = N_A A_{lip} c_{lip} \cdot 1000 = 3,6 \cdot 10^8 c_{lip},$$

где N_A — число Авогадро.

В опытах, результаты которых приведены ниже, использованы данные измерения электрофоретической подвижности липосом различного состава, которые проводились на коммерческом приборе «Zetasizer-2» (УК) методом регистрации динамического светорассеяния, допускающим измерения с коллоидными частицами субмикронных размеров. Однако, независимо от применяемого электрокинетического метода, результатом измерения является электрофоретическая подвижность коллоидных частиц (здесь липосом) μ . Если измерения проводят с частицами, размеры которых намного превышают характерную длину дебаевского экранирования, то теория позволяет (см., например [39]), связать эту подвижность с дзета-потенциалом (ζ) в плоскости скольжения с помощью известной формулы Смолуховского, в которой учтены вязкость (η) и диэлектрические свойства ($\epsilon\epsilon_0$) водного раствора:

$$\zeta = \mu \frac{\eta}{\epsilon\epsilon_0} \quad (8)$$

Принимая во внимание приведенные выше уравнения, можно выделить несколько параметров двойного электрического слоя, которые должны быть найдены экспериментально, причем только часть из них доступна для электрокинетических методов. Для изучения ионного равновесия вблизи поверхности необходимо определять потенциал и плотность заряда непосредственно на поверхности частицы, которые в

посредственно на поверхности частицы, которые в свою очередь зависят от расстояния плоскости скольжения δ от поверхности. Численная оценка этого расстояния оказалась возможной при совместном использовании электрофоретических измерений и метода КВП на мембранах одинакового состава.

Адсорбция неорганических ионов

Типичная процедура анализа экспериментальных данных включает в себя расчет поверхностного потенциала и оценку поверхностной плотности заряда с помощью изотерм адсорбции, вид которых зависит от состава электролита. Эти изотермы содержат по крайней мере два параметра — плотность центров связывания σ_{max} и константу K . Несложный анализ показывает [12, 44], что оба параметра даже в случае одновалентных ионов оказываются взаимозависимыми из-за недостаточной точности экспериментальных данных. Поэтому требуются дополнительные условия при постановке экспериментов, чтобы оценить оба параметра независимым образом. Предложенный способ позволил решить эту задачу [44].

Результаты измерения электрофоретической подвижности в суспензии липосом для растворов 1:1 электролитов в одинаковой концентрации, но с различными катионами, приведены на рис. 2. Варьируя относительное содержание отрицательно заряженного центра связывания катионов фосфатидилсерина (PS), удается независимым образом определить степень ионизации этих центров и константу K . Грубая оценка максимальной плотности центров связывания σ_{max} может быть сделана из следующих соображений: однократно заряженные молекулы липида площадью $0,7 \text{ nm}^2$ соответствуют максимальной плотности заряда, $\sigma_{max} = 0,23 \text{ Кл/м}^2$. Однако экспериментальная оценка этой величины в растворах щелочных металлов оказалась почти вдвое меньшей [44]. В то же время для органического катиона тетраметиламмония (ТМА)

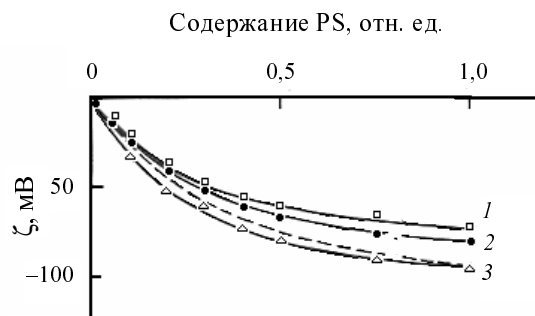


Рис. 2. ζ -потенциалы липосом с разным содержанием фосфатидилсерина (PS), измеренные при одинаковой концентрации (50 мМ) электролитов:

NaCl (1), KCl (2) и хлорида тетраметиламмония ТМА-Cl (3) [44]. Теоретические кривые построены при оптимальных значениях максимальной поверхностной плотности заряда σ_{max} и константы K . Эти значения для указанных кривых найдены равными $\sigma_{max}(\text{Кл/м}^2) = -0,159, -0,155$ и $-0,217$ и $K(\text{М}^{-1}) = 0,53, 0,19$ и $0,05$, соответственно. Пунктирная кривая рассчитана для индифферентного электролита при $K = 0$ и $\sigma_{max} = 0,16 \text{ Кл/м}^2$

экспериментальная и теоретическая оценка максимальной плотности заряда σ_{\max} оказываются близкими. Отсюда был сделан вывод, что катионы ТМА отличаются от катионов щелочных металлов не только эффективностью связывания с молекулами липида, но и своим влиянием на состояние упаковки этих липидов в бислое. Вероятнее всего крупные катионы ТМА, в отличие от неорганических катионов, увеличивают гидратацию полярных групп. Этот вывод, сделанный на основе электростатических измерений, хорошо согласуется с данными дифференциальной сканирующей калориметрии [1].

В случае адсорбции двухвалентных катионов на поверхности отрицательно заряженных мембран равновесная константа диссоциации без особого труда может быть найдена по положению точки нулевого заряда. Из уравнения (3) прямо следует связь этой константы с концентрацией двухвалентного катиона, при которой электрофоретическая подвижность, а значит и поверхностная плотность заряда равна нулю. Для мембран из фосфатидилсерина этот результат был получен практически со всеми двухвалентными катионами, и тем самым был подтвержден формальный механизм связывания, описываемый выражением (3). Этот вывод никак не зависит от положения плоскости скольжения, которое надо учитывать во всех остальных случаях.

Адсорбция двухвалентных катионов на поверхности липосом из нейтральных липидов (фосфатидилхолин) демонстрирует немонотонное изменение ζ -потенциала. Результаты наших опытов с катионами бериллия скомбинированы на рис. 3 с аналогичными литературными данными для ряда других двухвалентных катионов, приведенных в обзоре [45]. Форма кривых и

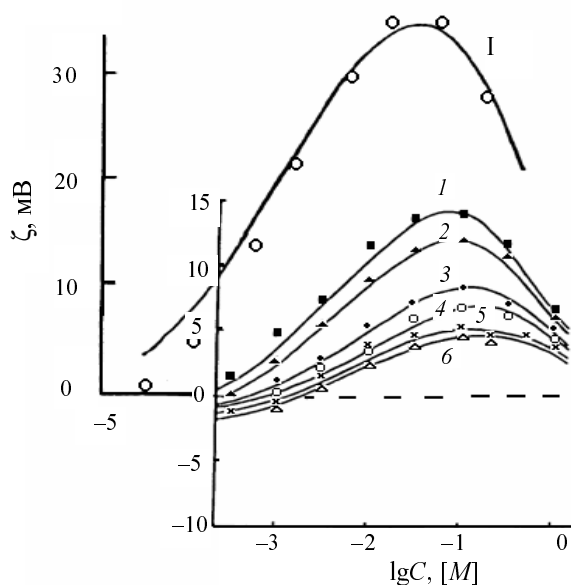


Рис. 3. Сопоставление собственных (I) [12] и литературных [45] (1–6) данных измерений электрокинетического ζ -потенциала липосом из фосфатидилхолина в растворах:

I — BeSO_4 , 1 — CaCl_2 , 2 — MgCl_2 , 3 — SrCl_2 , 4 — BaCl_2 ,
5 — BaBr_2 , 6 — $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$

положение максимума для всех кривых весьма близки. Это означает, что при высокой концентрации электрокинетический ζ -потенциал уменьшается одинаково из-за экранирования поверхностного заряда ионами электролита.

На рис. 4 приведены экспериментальные данные, полученные при изучении адсорбции катионов бериллия на липосомах и плоских БЛМ двумя методами. Чтобы рассчитать поверхностный потенциал была использована изотерма (4) с поправкой потенциалов на положение плоскости скольжения. Сравнивая полученные значения ζ -потенциала с величиной изменения граничного потенциала, измеренного на плоских БЛМ методом КВП, можно видеть, что используя значение $\delta = 0,2$ нм, достигается практически полное совпадение данных этих двух принципиально различных методов. Выбранное значение δ совпадает с литературными данными, полученными иными методами [4]. Это значение близко и часто даже меньше размеров молекул и ионов, принимающих участие в формировании двойного электрического слоя. Даже в случае малых неорганических ионов едва ли можно пренебрегать их влиянием на гидратацию поверхности, ориентацию приповерхностных молекул воды и т.п. (подробнее об этом см. в работе [12]). Это означает, что анализ данных в рамках модели Гуи—Чепмена сводится по существу к формальному эмпирическому их описанию, в котором о положении плоскости скольжения можно судить лишь постольку, поскольку параметр δ имеет размерность расстояния. По нашему мнению основное преимущество простейшей модели Гуи—Чепмена состоит только в использовании малого числа параметров, имеющих при этом наглядный физический смысл.

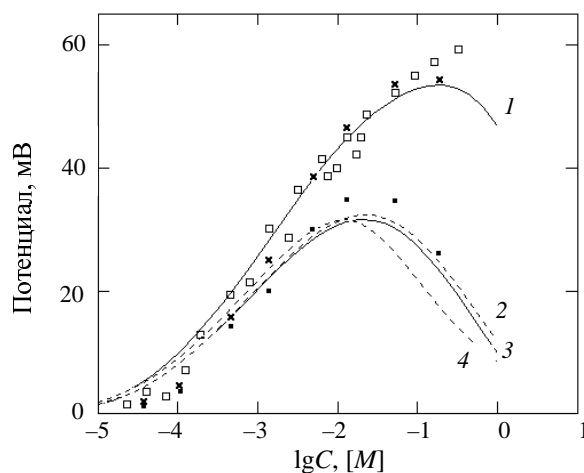


Рис. 4. Адсорбция катионов Be^{2+} на незаряженных мембранах из молекул фосфатидилхолина (по данным [8, 12, 48]):

— данные метода КВП для изменения граничного потенциала, отражающие изменения потенциала на поверхности;
● — значения ζ -потенциалов; × — значения ζ -потенциалов после их коррекции на плоскость скольжения на расстоянии 0,2 нм от поверхности мембраны.

Теоретические кривые поверхностного (1, 2) и ζ -потенциалов (3, 4) построены для значений σ_{\max} ($\text{Кл}/\text{м}^2$) и константы (K, M^{-1}), которые составляли 0,2 и 400 (кривые 1, 3); 2 и 40 (кривая 2), 0,02 и 4000 (кривая 4), соответственно

Достаточно хорошее количественное совпадение теоретических и экспериментальных результатов достигается при значительном варьировании одновременно двух параметров модели — плотности центров и константы связывания двухвалентных катионов. Как можно видеть на рис. 4, стократное изменение этих параметров при фиксированном значении их произведения, приводит почти к одинаковому результату. Следовательно, и в этом случае выбор значения $\sigma_{\max} = 0,2$ Кл/м² (а значит и константы связывания) не следует прямо из электростатических измерений, но только из достаточно произвольных геометрических соображений о стехиометрии связывания: 1 ион на 1 липид. Доказательства такой стехиометрии не могут быть получены электрохимическими методами.

Существенно более сложный анализ потребовался для описания адсорбции трехвалентных катионов, обладающих чрезвычайно высоким сродством к фосфолипидам [46]. Эти эксперименты были проведены нами с несколькими лантаноидами, но наиболее подробно с гадолинием [42, 43, 47]. На рис. 5 приведены данные электрофоретических измерений и скачка граничного потенциала, измеренного методом КВП. В последнем случае обнаруживается значительно большее, на 150—200 мВ, изменение, которое со всей очевидностью отражает изменение обеих компонент граничного потенциала. Высокое сродство к липидам проявляется уже в том факте, что точка нулевого заряда расположена в области микромолярных концентраций. Однако следует подчеркнуть, что именно по этой причине шкала концентраций на рисунке не отражает действительную концентрацию катиона в ячейке, а только полное количество добавленного в него катиона. Поэтому для выделения вклада диффузной и дипольной компонент необходимо дополнить модель ГЧШ условием материального баланса и проводить расчеты теоретических кривых с применением соотношений (5—7).

Модель ГЧШ, дополненная уравнением материального баланса (5), хорошо описывает положение точки нулевого заряда, крутой и пологий участки экспериментальной кривой, и тем самым позволяет оце-

нить падение потенциала в диффузной части двойного электрического слоя при всех концентрациях. Вычитая его из суммарного изменения граничного потенциала в опыте с плоскими БЛМ, оказалось возможным выделить дипольную компоненту и изучить ее связь с другими условиями опытов [42, 43]. Было обнаружено, в частности, что скачок дипольного потенциала пропорционален содержанию только ионизованной формы PS в мембранах, где их содержание варьировалось с pH или путем добавления незаряженных молекул PS. Из этих наблюдений был сделан вывод, что изменение дипольной компоненты потенциала служит индикатором конденсации фосфатидилсерина, инициированной многовалентными катионами [36, 43, 47, 48]. Этот вывод был подтвержден при изучении методом КВП кинетики адсорбции и десорбции гадолиния при перфузии ячейки, при котором резко увеличивается натяжение мембраны [30]. Важные сведения о таких процессах были получены недавно с применением техники липидных монослоев. Однако изложение этих весьма интересных результатов выходит за пределы поставленной здесь задачи.

Заключение

Представленные два метода — электрокинетические измерения и метод КВП — безусловно не исчерпывают экспериментальных возможностей исследования электростатических явлений на границах мембран. Есть все основания считать, что тонкая структура электрического поля в области полярных головок фосфолипидов отражает латеральное взаимодействие липидов в бислое и, в частности, состояние гидратации липидов. Появление значительных (100—200 мВ) скачков дипольного потенциала при переходе липидов в конденсированное твердое состояние вероятно обусловлено удалением части молекул воды, дипольный момент которых при меньшей плотности липидов снижал суммарный дипольный момент полярных головок фосфолипидов, а посторонние органические молекулы «провоцируют» дополнительную гидратацию липидов. Доказательства такого механизма и построение соответствующей количественной модели возможны при сочетании электростатических методов со спектральными и калориметрическими исследованиями.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ceve G., Marsh D.* Phospholipid Bilayers. Physical Principles and Models. New York, Wiley-Interscience Publication. Cell Biology: A Series of Monographs. Bittar, E. E. 1987, p. 442.
2. *Ceve G.* Biochim. Biophys. Acta, 1990, v. 1031, p. 311—382.
3. *Coster H.G.L. J.* Biol. Phys., 2003, v. 29, p. 363—399.
4. *McLaughlin S.* Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 1989, v. 18, p. 113—136.
5. *Богуславский Л.И.* Биоэлектрохимические явления и граница раздела фаз. М.: Наука, 1978, с. 360.
6. *Ивков В.Г., Берестовский Г.Н.* Липидный бислой биологических мембран. М.: Наука, 1982, с. 224.
7. *Соколов В.С., Кузьмин В.Г.* Биофизика, 1980, т. 25, с. 170—172.
8. *Ermakov Yu.A., Sokolov V.S.* In: Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications. Ed. H.T. Tien, A. Ottova. 2003, p. 109—142.
9. *Щукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А.* Коллоидная химия. М.: Высшая школа, 1992, с. 445.

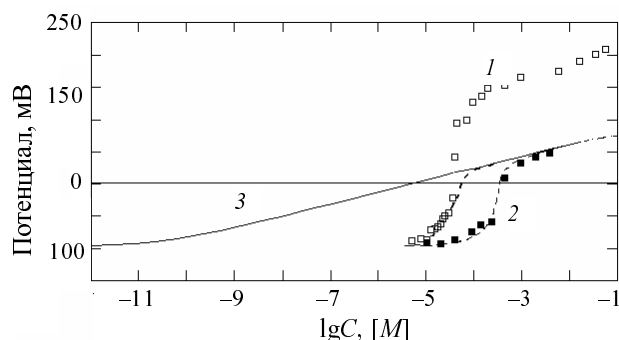


Рис. 5. Граничный потенциал плоских БЛМ (1) и поверхностный потенциал липосом (2) из фосфатидилсерина в зависимости от полного количества добавленного в ячейку Gd^{3+} или его концентрации в объеме раствора (3).

Параметры теоретических кривых [см. уравнение (3)]: $\sigma_{\max} = -20$ мКл/см²; $K_1 = 0,6$ М⁻¹ (K⁺) и $K_2 = 5 \cdot 10^4$ М⁻¹ (Gd^{3+}); $c_{lip} = 10^{-4}$ М (1), $c_{lip} = 10^{-3}$ М (2); $\delta = 0,2$ нм. Фоновый электролит 50 мМ KCl, 5 мМ трис, pH 7,3 [42, 43, 47]

10. *McLaughlin S.* In: Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motions. Ed. G. Spach. Amsterdam, 1983, p. 69–76.
11. *Blank M.E.* Electrical Double Layers in Biology. New York, London: Plenum Press, 1985, p. 319.
12. *Ермаков Ю.А.* Коллоидный журнал, 2000, т. 6, с. 437–449.
13. *Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C.* J. Phys. Chem., 1963, v. 67, p. 534–535.
14. *Montal M., Mueller P.* PNAS USA, 1972, v. 69, p. 3561–3566.
15. *Кругляков П.М., Ровин Ю.Г.* Физикохимия черных углеводородных пленок. М.: Наука, 1978, с. 181.
16. *Alvarez O., Latorre R.* Biophys. J., 1978, v. 21, p. 1–17.
17. *Babakov A.V., Ermishkin L.N., Liberman E.A.* Nature, 1966, v. 210, p. 953–955.
18. *Carius W. J.* Colloid Interface Sci., 1976, v. 57, p. 301–307.
19. *Шимане Ч., Пасечник В.И., Эль-Карадаги С. и др.* Биофизика, 1984, т. 29, с. 419–423.
20. *Пасечник В.И.* Электрострикционные измерения вязкоупругих свойств бислойных липидных мембран. Биофизика мембран. М.: ВИНТИ, 1981, с. 267–305.
21. *Лейкин С.Л.* Биологические мембраны, 1985, т. 2, с. 222–233.
22. *Берестовский Г.Н.* Биофизика, 1981, т. 26, с. 474–480.
23. *Hianik T., Passechnik V.I.* Bilayer Lipid Membranes: Structure and Mechanical Properties. Ister Science, Bratislava., 1995, p. 436.
24. *Sargent D.F., Hianik T.* Bioelectrochem. Bioenerg., 1994, v. 33, p. 11–18.
25. *Соколов В.С., Кузьмин С.Г.* Биофизика, 1980, т. 25, с. 170–172.
26. *Абидор И.Г., Айтмян С.Х., Черномордик Л.В. и др.* Докл. АН СССР, 1979, т. 245, с. 977–981.
27. *Carius W.* Ber. bunsen-ges. phys. chem., 1979, v. 83, p. 905–911.
28. *Айтмян С.Х., Белая М.Л., Чизмаджев Ю.А.* Докл. АН СССР, 1981, т. 256, с. 990–994.
29. *Пасечник В.И., Соколов В.С.* Биологические мембраны, 2003, т. 20, с. 433–442.
30. *Ермаков Ю.А., Юсипович А.И.* Там же, 2002, т. 19, с. 541–548.
31. *Malkov D.Y., Sokolov V.S.* Biochim. Biophys. Acta, 1996, v. 1278, p. 197–204.
32. *Sokolov V.S., Ayuan A.G., Apell H.-J.* Eur. Biophys. J., 2001, v. 30, p. 515–527.
33. *Cherny V.V., Mirsky V.M., Sokolov V.S., Markin V.S.* Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1990, v. 23, p. 373–378.
34. *Черный В.В., Сухарулдзе М.Г., Мирский В.М., Соколов В.С.* Биологические мембраны, 1992, т. 9, с. 733–740.
35. *Ермаков Ю.А.* Взаимодействие полиэлектролитов с бислойными липидными мембранами. Электрохимия полимеров. М.: Наука, 1990, с. 93–101.
36. *Ермаков Ю.А., Махмудова С.С., Шевченко Е.В., Лобышев В.И.* Биологические мембраны, 1993, т. 10, с. 212–224.
37. *Gouy M. J.* Phys. (Paris), 1910, v. 9, p. 457–468.
38. *Chapman D.L.* Philos. Mag., 1913, v. 25, p. 475–481.
39. *Hunter R.J.* Zeta Potential in Colloid Science. Principles and Applications. Ed. R.H. Ottewill, R.L. Rowell. London: Academic Press, Colloid Science, 1981, p. 386.
40. *Cevc G.* Chem. Phys. Lipids, 1993, v. 64, p. 163–186.
41. *Stern O. Z.* Elektrochem. Angew. Phys. Chem., 1924, v. 30, p. 508–516.
42. *Ермаков Ю.А., Авербах А.З., Сухарев С.И.* Биологические мембраны, 1997, т. 14, с. 434–445.
43. *Ермаков Ю.А., Авербах А.З., Арбузова А.Б., Сухарев С.И.* Там же, 1998, т. 15, с. 330–341.
44. *Ermakov Yu.A.* Biochim. Biophys. Acta, 1990, v. 1023, p. 91–97.
45. *Tatulian S.A.* Ionization and ion binding. In: Phospholipid Handbook. Ed. G. Cevc. New York, 1993, p. 511–553.
46. *Ermakov Y.A., Makhmudova S.S., Averbakh A.Z.* Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects, 1998, v. 140, p. 13–22.
47. *Ermakov Y.A., Averbakh A.Z., Yusipovich A.I., Sukharev S.* Biophys. J., 2001, v. 80, p. 1851–1862.
48. *Ермаков Ю.А., Черный В.В., Соколов В.С.* Биологические мембраны, 1992, т. 9, с. 201–213.