

# ЭВОЛЮЦИЯ ЛИПИДНЫХ ПОР В БИСЛОЕ ПРИ ФАЗОВОМ ПЕРЕХОДЕ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ

*В. Ф. Антонов*

*Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова, Москва*

*Аннотация.* Проблема полиморфизма мембранных липидов рассмотрена с учетом экспериментальных данных, полученных электрическими методами на плоских БЛМ из индивидуальных фосфолипидов в условиях фазовых переходов. Предлагаемый подход основан на том, что большинство структур, образуемых липидами при фазовых переходах, содержит липидные поры, размеры которых могут быть оценены по их электропроводности в плоской БЛМ. Обсуждаются различия в эволюции липидных пор, возникающих в липидном бислое из индивидуальных липидов при фазовых переходах  $L\alpha \rightarrow L\beta$  и  $L\alpha \rightarrow H_{II}$ .

Одним из важных открытий современной мембранологии явилось обнаружение сильного влияния на функции живой клетки фазового состояния мембранных липидов, обеспечивающих поддержание жидкостности (матричная функция), стабильности (механическая функция) и проницаемости (барьерная функция) мембран. Развитие исследований в этом направлении привело к созданию в биологии, наряду с геномикой и протеомикой, липидомики, науки о структуре и функциях липидных элементов бислойной и небислойной конфигурации. Парадокс заключается в том, что все мембранные структуры живой клетки, как правило, имеют бислойную конфигурацию. В то же время значительная часть клеточных липидов имеет спонтанную кривизну и не способна формировать плоский бислой в изолированных условиях. Таким образом, можно предположить, что в бислое, сформированном из молекул со спонтанной кривизной, должны возникать локальные напряжения, способствующие порообразованию. Исследованию этого парадокса и посвящен настоящий обзор.

Многообразие липидных структур заложено в фазовых диаграммах полярных липидов и экспериментально обнаруживается при фазовых переходах. Известны несколько фазовых переходов, из которых наиболее изучен переход из жидкокристаллического состояния в гель ( $L\alpha \rightarrow L\beta$ ). При этом переходе жидкостность мембраны меняется, но сохраняется ее бислойная структура. В то же время фазовые переходы из жидкокристаллического состояния в гексагональную ( $L\alpha \rightarrow H_{II}$ ) или кубическую ( $L\alpha \rightarrow Q\alpha$ ) фазу, напротив, сохраняя жидкостность мембраны, сопровождаются утратой бислойности в изолированных условиях (Cullis et al. 1980). Очевидно, что в зависимости от функционального состояния живая клетка способна

регулировать состояние мембраны подбором липидного состава в соответствии с физическими параметрами окружающей среды: температурой, соотношением липид-вода, наличием структурных белков и пептидов. Способность липида формировать ту или иную фазу определяется также исходной формой молекулы с учетом природной кривизны. В данном обзоре основное внимание уделено пористым структурам мембранных липидов в силу того, что они хорошо изучены в модельных системах с помощью современных физических методов, включая рентгеноструктурный анализ (Геннис 1997), а также потому, что они определяют одновременно две основные функции мембран – механическую и барьерную. Впервые для изучения полиморфизма мембранных липидов использован метод электропроводности плоских бислоевых липидных мембран.

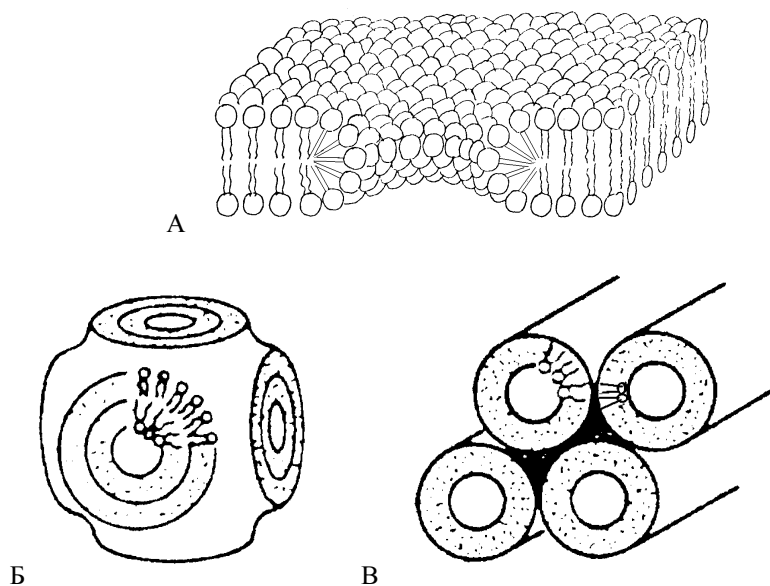


Рис. 1. Пористые структуры мембранных липидов при различных фазовых переходах. А – фазовый переход из жидкокристаллического состояния ( $L\alpha$ ) в гель ( $L\beta$ ); Б – фазовый переход из жидкокристаллического состояния в кубическую фазу ( $Q\alpha$ ); В – фазовый переход в обращенную гексагональную фазу ( $H II$ )

*Пористые структуры мембранных липидов.* На рисунке 1 представлены основные типы липидных гидрофильных пор, наблюдаемых при фазовых переходах мембранных липидов. Основному фазовому переходу  $L\alpha \rightarrow L\beta$ -типа соответствует гидрофильная пора (рис. 1А), стенки которой

образованы полярными головками фосфолипида. В отличие от белковых пор, липидная пора является переходящей (transient) порой, поскольку она способна к самозалечиванию в результате латеральной диффузии мембранных липидов. Стенки поры гибкие и обладают положительной (тороидальные) и отрицательной (бочонкообразные) кривизной. Эволюция этих пор начинается с появления гидрофобных пор в результате развития дефектов упаковки в жидкокристаллическом липидном бислое. Это единственная пора, рождение которой не сопровождается утерей бислойности мембран. Два других вида гидрофильных пор (рис. 1 б, в), возникающих соответственно при фазовых переходах в гексагональную  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  и кубическую  $L_{\alpha} \rightarrow Q_{\alpha}$  фазы, связаны с нарушением бислойности мембраны. Казалось бы, что в этом случае следует ожидать частичной или полной дезинтеграции плоской мембраны. Однако, как оказалось, экспериментально возможно формирование стабильного плоского бислоя из небислойных молекул, в частности, молекул фосфатидной кислоты (Антонов и др.1985). Снижение механического напряжения в таких пленках может объясняться появлением липидных пор.

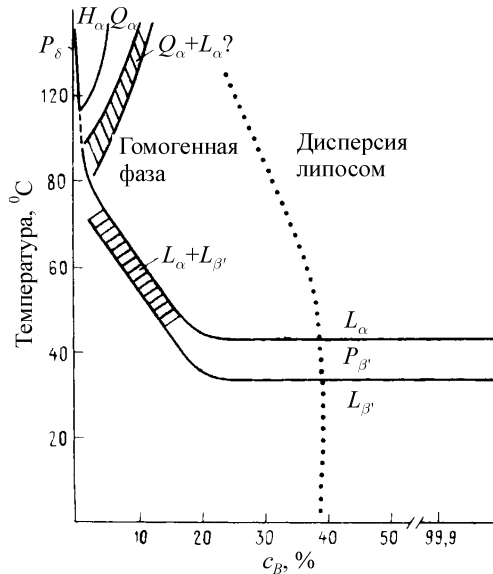


Рис. 2. Фазовая диаграмма для дипальмитоилфосфатидилхолина в воде (Sackman, 1983). Содержание воды указано на оси абсцисс: в левой части диаграммы представлены смеси с высоким содержанием липида, справа – разбавленные дисперсии липосом. Пунктирная линия – граница максимальной адсорбции воды с образованием гомогенной водно-солевой смеси. Подробности в тексте

*Фазовая диаграмма дипальмитоилфосфатидилхолина в воде.* Основным компонентом клеточной мембраны являются фосфолипиды. Наиболее типичен среди них дипальмитоиллецитин. Как известно, фазовая диаграмма липида показывает зависимость температуры фазового перехода индивидуального фосфолипида от соотношения липид-вода. ДПФХ характеризуется широкой областью фазового перехода из жидкокристаллического состояния ( $L\alpha$ ) (малая вязкость) в гель-фазу ( $L\beta$ ) (большая вязкость) при соотношении липид-вода от 20 моль % воды и выше. В гель-фазе, как известно, молекулы фосфолипидов упакованы максимально плотно, что характерно для молекул с полностью трансположением жирнокислотных радикалов. Как видно на диаграмме, возможны две модификации  $L\beta$ -фазы – собственно  $L\beta$ -фаза с жирнокислотными остатками перпендикулярными поверхности бислоя, и  $L\beta'$ -фаза, в которой хвосты молекул располагаются под углом  $30^\circ$  к поверхности бислоя. Следует отметить, что некоторые мембранные фосфолипиды, например фосфатидилэтаноламин, не образуют последней фазы. Еще одна особенность ДПФХ заключается в наличии промежуточной, т.н. «рифленной» фазы –  $P\beta'$ -фазы. Под электронным микроскопом бислоем в этом состоянии имеет вид волнообразной гофрированной поверхности. Фазовый переход  $P\beta' - L\alpha$  наблюдается при более высокой температуре и называется главным переходом.  $L\beta' - P\beta'$  происходит при более низкой температуре ( $35^\circ\text{C}$ ) и называется предпереходом. При малом содержании воды, до 15 моль %, наблюдается область сосуществования  $L\alpha$  и  $L\beta'$  фаз. В последнее время в литературе широко обсуждается еще одна модификация гель-фазы, называемая фазой интердигитации. Для нее характерно взаимное проникновение в области жирнокислотных хвостов двух монослоев бислоя с общим утоньшением бислоя. Наиболее отчетливо фаза интердигитации проявляется в случае фосфолипидов с жирнокислотными радикалами разной длины и в присутствии короткоцепочечных спиртов и свободных жирных кислот.

При малом содержании воды и высокой температуре образуются гексагональная ( $H\alpha$ ) и кубическая ( $Q\alpha$ ) фазы. В первом случае образуются гексагонально расположенные трубчатые структуры с полярными головками молекул, повернутыми внутрь просвета трубки (рис.1в). Эта гексагональная фаза получила название гексагональная фаза  $H11$ , в отличие от гексагональной фазы  $H1$ , образующейся в избытке воды и соответственно с обратным расположением молекул фосфолипидов относительно просвета трубки. Следует подчеркнуть, что некоторые мембранные фосфолипиды, в частности дипальмитоилфосфатидилэтаноламин, в отличие от ДПФХ, формирует  $H\alpha$  и  $Q\alpha$ -фазы при обычных физиологических температурах. В заключение следует подчеркнуть, что индивидуальные мембранные фосфолипиды в водных растворах обладают выраженным полиморфиз-

мом и большим разнообразием фазовых переходов. Применительно к биологическим мембранам количество фаз, образуемых липидами, будет нарастать в результате смешивания различных липидов, их взаимодействия с белками и фазового разделения компонентов мембраны.

### **Фазовые переходы липидов в биологии**

*Жидкость клеточных мембран.* Мембранные липиды относятся к жидким кристаллам смектического типа, спонтанно формирующим в избытке воды ламеллярные структуры, идентичные липидному бислою клеточных мембран. В бимолекулярных пленках синтетические фосфолипиды способны к термотропным фазовым переходам первого рода при строго определенной точке замерзания (плавления). Так, для обычных фосфолипидов клетки димиристоилфосфатидилхолина (ДМПФ) эти точки совпадают и равны 23С, для дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) 42С, для дистеароилфосфатидилхолина (ДСФХ) 59С. Жидкость однокомпонентного липидного бислоя зависит от соотношения липид-вода и температуры. При определенной температуре окружающей среды жидкость бислоя выражена тем сильнее, чем короче длина молекулы и больше ненасыщенных связей в жирнокислотном остатке. Более короткая углеводородная цепь молекулы фосфолипида ослабляет взаимодействие двух соседних молекул и препятствует, таким образом, их более плотной укладке в ходе кристаллизации. Плотная упаковка молекул фосфолипидов в бислое невозможна и при наличии в жирной кислоте цис-двойных связей, образующих структурные дефекты. Благодаря этому механизму температура замерзания, например, чистого диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) составляет –22С.

Многочисленные эксперименты, проведенные с пойкилотермными организмами, температура которых изменяется в соответствии с температурой окружающей среды, показали, что они способны поддерживать жидкость мембран путем усиления синтеза полиненасыщенных жирных кислот. Очевидно, что энергетические затраты при перестройке метаболизма у этих организмов будут тем меньше, чем ближе температура тела к температуре фазового перехода основных мембранных фосфолипидов. Отсюда возникло предположение о том, что бактерии живут в условиях фазового перехода мембранных липидов.

В мембранах клеток теплокровных животных, помимо перечисленных, предусмотрены дополнительные механизмы поддержания жидкости мембран. Плазматическая мембрана эукариот содержит, помимо фосфолипидов, значительное количество других липидов, и среди них холестерина. Содержание холестерина может достигать такого уровня, что на одну молекулу фосфолипида приходится одна молекула холестерина.

В липидном бислое молекула холестерина ориентируется таким образом, чтобы ее гидроксильная группа находилась вблизи полярной группы молекулы фосфолипида, а плоское жесткое стероидное ядро было локализовано в области жирнокислотных остатков. Указанное расположение холестерина препятствует плотной упаковке соседних жирнокислотных радикалов молекул фосфолипидов при кристаллизации бислоя. Действительно, опытным путем установлено, что добавление 30 моль% холестерина в бислой фосфолипидов приводит к полному исчезновению фазового перехода. С учетом этого обстоятельства можно предположить, что включение в ходе эволюции холестерина в структуру клеточных мембран имеет некоторое отношение к явлению теплокровности у животных. Известное заболевание, связанное с перераспределением холестерина, атеросклероз, таким образом, следует рассматривать как своеобразную плату за переход к теплокровности.

Сравнительно недавно было установлено, что действие холестерина на липидный бислой зависит от концентрации холестерина и фазового состояния фосфолипидов. В малой концентрации до 6 моль % холестерин не предотвращает фазовый переход. Более того, он способствует порообразованию в бислое из ДПФХ. При этом, возможно, образуются поры, указанные на рис. 1А (Raffy, Teissie1999).

В последнее время было установлено, что плазматическая мембрана клеток теплокровных может включать доменные структуры, содержащие значительное количество холестерина, известные как липидные «рафты» (Silvius, 2003). Эти структуры обеднены ненасыщенными фосфолипидами и интегральными белками, в то же время они обогащены холестерином, сфинголипидами и некоторыми липидсвязывающими белками. Рафты обладают повышенной устойчивостью к действию детергентов, молекулярная упаковка в них повышена, и они плавятся при более высоких температурах сравнительно с окружающими липидами бислоя. С рафтовыми структурами связывают в настоящее время многочисленные клеточные функции и среди них фазовое разделение мембранных липидов, трансмембранная передача сигналов (Silvius, 2003), а также участие рафтов в фазово-переходном механизме синаптического экзоцитоза (Харакоз, 2001). Ключевую роль при этом играет фазовый переход  $L\alpha \rightarrow L\beta$ -типа с фазовым разделением. На границе домена возможно порообразование типа, указанного на рис. 1.

Исследование липидного состава клеточных мембран у некоторых организмов свидетельствует о тенденции усложнения химического состава мембранных липидов в ходе эволюции от бактерии до животного. Так, плазматическая мембрана многих бактерий содержит один основной тип фосфолипидов и вовсе не содержит холестерина. Механическая прочность таких мембран обеспечивается клеточной стенкой. Плазматическая мем-

брана большинства клеток эукариот, помимо холестерина, содержит большое разнообразие молекул фосфолипидов, и среди них основных: фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и сфингомиелина. Полярные головки этих молекул довольно сильно различаются по величине, форме и заряду. Так, первые два фосфолипида являются цвиттерионами, в то время как фосфатидилсерин имеет один отрицательный заряд, длина полярной головки у фосфатидилхолина значительно больше, чем у фосфатидилэтаноламина. Полагая, что разнообразие фосфолипидов необходимо для нормального функционирования мембранных белков, некоторые авторы (Геннис, 1997) сравнивают поведение белков в двумерном растворителе (липидном бислое) с поведением их в трехмерном растворителе (вода). Подобно тому как многие ферменты в воде нуждаются для своего функционирования в определенных коферментах, так и ферменты в мембране требуют определенных коферментов, роль которых играют различные фосфолипиды. Очевидно, что молекулы фосфолипидов в этом случае должны быть легкоподвижными.

*Бислойность и небислойность липидов.* В последнее время стало очевидно, что поддержание бислойности мембран тесно связано, помимо температуры и соотношения липид-вода, с пространственной геометрией молекул фосфолипидов. В водной среде молекулы фосфолипидов способны к самосборке с образованием причудливых фигур, включая плоские бимолекулярные ламеллы, трубчатые и кубические структуры, многослойные и однослойные везикулы (Israelachvili et al. 1980). Различают три основных типа липидных молекул в воде: клин, усеченный конус, цилиндр. Основным критерием при рассмотрении различных типов является так называемый фактор упаковки, т.е. соотношение проекций площади головок и хвостов молекул на поверхность бислоя. Если проекции близки, то можно говорить о цилиндрической форме молекулы, если проекция хвоста много больше проекции головки, то форма молекулы считается клиновидной, обратное соотношение проекций соответствует обратному клину.

Количественно форма фигур зависит от соотношения поверхности молекулы на границе раздела липид-вода к ее объему, выраженному в безразмерных единицах. В простейшем случае сферической мицеллы поверхность молекулы соотносится с объемом следующим образом. Если  $S$  – площадь головки молекулы,  $M$  – количество молекул,  $l$  – максимальная длина алкильной цепи,  $V$  – молекулярный объем и поскольку длина цепи очевидно совпадает с радиусом мицеллы, то поверхность мицеллы будет равна  $MS = 4\pi R^2$ , объем  $V = \frac{4}{3}\pi R^3$ . Из этих уравнений может быть

получено выражение для радиуса мицеллы  $R = 3\frac{V}{S}$ . Поскольку радиус

мицеллы не может быть больше длины молекулы  $l$ , образующей сферу, то условие упаковки молекул фосфолипидов в сферическую мицеллу может быть представлено как  $\frac{V}{S} \leq \frac{l}{3}$ .

Аналогичные расчеты: для трубчатой фигуры из молекул обратной клиновидности (гексагональная фаза H11) безразмерный коэффициент равен  $\frac{1}{2}$ , стабильная бислойная ламелла из цилиндрических молекул – коэффициент равен 1. Клиновидные молекулы называют молекулами с положительной кривизной. К ним относятся лизофосфолипиды и синтетические детергенты.

Молекулы с обратной клиновидностью называют молекулами с отрицательной кривизной. К ним относят ненасыщенный фосфатидилэтаноламин, кардиолипин, фосфатидную кислоту, фосфатидилсерин в кислой среде и моногалактозилдиглицерид. Наиболее известные мембранные фосфолипиды: фосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол образуют стабильные бислои.

### **Мягкая перфорация плоских бислойных липидных мембран при фазовых переходах липидов**

*Температурный фазовый переход  $L\alpha \rightarrow L\beta$  ДПФХ.* Одним из наиболее распространенных способов получения пористых липидных структур непосредственно в мембране является метод электропорации. Электропорация клеточных мембран получила в настоящее время широкое применение в экспериментальной биологии и медицине (Glaser et al. 1988). Как известно, в основе электропорации лежит явление обратимого электрического пробоя. Ранее нами было обнаружено принципиальное сходство в эволюции липидных пор, возникающих при электропорации и фазовом переходе липидов в плоских бислойных липидных мембранах (пБЛМ) (Antonov, 1998). Одиночные липидные проводящие поры, обнаруженные нами впервые при фазовом переходе дистеароилфосфатидилхолина из жидкокристаллического состояния в гель (Antonov et al. 1980), имеют общий с электропорацией механизм возникновения пор, обусловленный превращением гидрофобной поры в гидрофильную с последующим затеканием ее или разрывом бислоя. В связи с этим основной целью исследования было экспериментальное изучение механизма рождения и эволюции липидных пор в условиях фазового перехода липидов в БЛМ из жидкокристаллического состояния в гелеобразное при малом непробойном электрическом напряжении на мембране. В качестве объекта изучения был выбран дипальмитоилфосфатидилхолин, один из основных фосфолипидов клеточной мембраны.



В настоящем обзоре приведены некоторые результаты измерений проводимости и электрической емкости плоских БЛМ в области температуры основного фазового перехода дипальмитоилфосфатидилхолина, что позволило оценить проводимость индивидуальных липидных пор, их количество и размеры (Antonov et al. 2004).

В последнем случае размеры пор проверялись методом исключения неэлектролитов с помощью полиэтиленгликоля различной молекулярной массы.

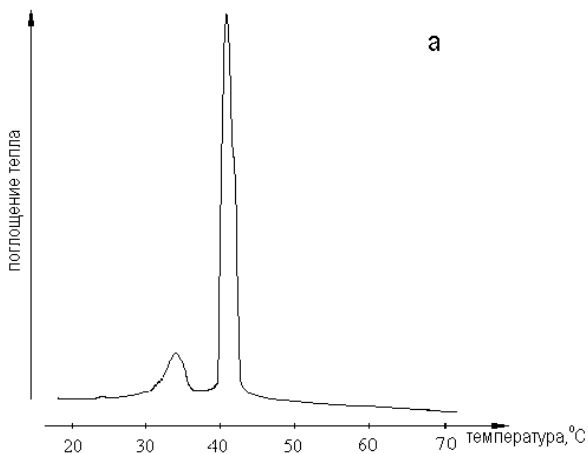


Рис. 3. Термограмма суспензии липосом из ДПФХ, полученная в водной среде 1М хлорида  $K^+$  при pH 6,9 без буфера методом дифференциальной сканирующей калориметрии от ПЭГ-300 до ПЭГ-6000. Стабильность и накопление липидных пор в случае мягкой порации определяются в первую очередь краевым натяжением поры.

На рис. 3 представлена типичная термограмма для ДПФХ в растворах 1М хлоридов  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ . На кривой видны два пика: пик предперехода при  $35,5^{\circ}C$  и пик основного фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель при  $41^{\circ}C$ . Положение пиков одинаково для всех солей кроме  $LiCl$ . В последнем случае при формировании БЛМ в растворе 1М  $LiCl$ : пик основного фазового перехода смещается до  $43^{\circ}C$  и пик предперехода до  $40^{\circ}C$ . Это свидетельствует о структурообразующем действии  $Li^+$  на полярные группы молекул ДПФХ в отличие от других катионов.

Ранее в наших опытах впервые 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, свидетельствующих о рождении липидных пор (Antonov et al. 1980). Данные были подтверждены в опытах Богейм, Ханке, Эйбл (Boheim et al. 1980) с другим цвиттерионным фосфолипидом 1-стеароил-3-миристоил-глицеро-2-фосфохолином при температуре фазового перехода этого липида. Позднее нам удалось сформировать пБЛМ из анионного фосфолипида 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфата и наблюдать флуктуации тока, индуцированные ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , в изотермическом режиме (Antonov et al. 1985).

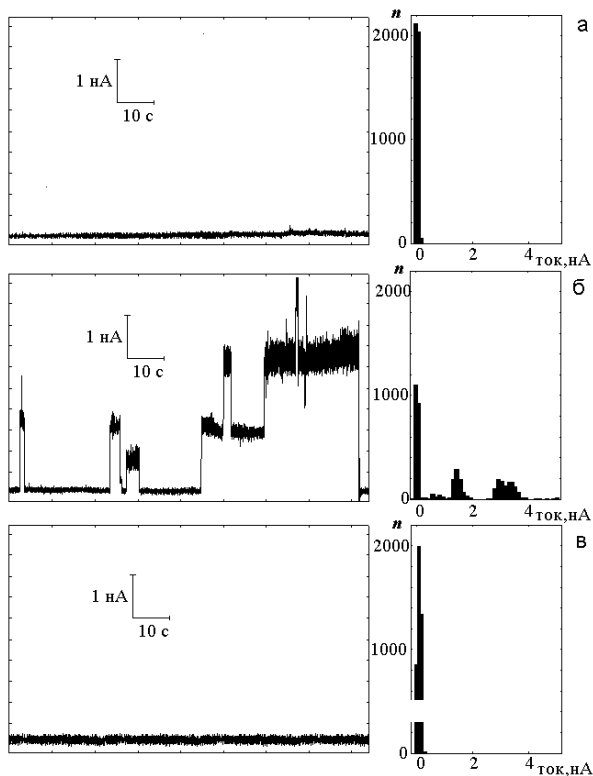


Рис. 4. Токвые диаграммы плоских БЛМ из ДПФХ при температуре основного фазового перехода (б), выше температуры фазового перехода (а) и ниже температуры предперехода (в). Слева – записи тока при фиксированном напряжении на мембране 50 мВ; справа – соответствующие гистограммы распределения флуктуаций тока, полученные автоматически при частоте стробирования 80 Гц. Водная среда содержала 1М хлористого лития при рН 6,9.  $n$  – частота попадания значений тока в заданный интервал

На рис. 4 представлена диаграммная запись отдельных флуктуаций тока, регистрируемых в режиме фиксации напряжения на пБЛМ из ДПФХ при разных фиксированных температурах в области перехода. Как видно на рисунке, флуктуации тока при температуре, превышающей температуру фазового перехода ( $50^{\circ}\text{C}$ ), практически отсутствуют и на гистограмме распределений (справа) максимум распределений приходится на нулевое значение тока. Снижение температуры до температуры основного фазового перехода, поддерживаемой термостатом с точностью  $0,5^{\circ}\text{C}$ , сопровождается появлением одинарных и двойных флуктуаций тока различной длительности, достигающей десятков секунд (рис. 4б). Сдвоенные скачки, как видно на рисунке, возникают порознь, а закрываются одновременно. Этот результат может объясняться, по-видимому, слиянием одиночных пор (Freeman et al. 1994) или формированием кластера пор. Такое предположение подтверждается гистограммой (справа), где отчетливо видны пики распределения флуктуаций тока, помимо нулевого значения, при 2 и 4 нА.

Ранее в опытах с пБЛМ из гидрированного яичного лецитина нами было установлено, что флуктуации тока в липидных порах относятся к одноуровневым флуктуациям со случайно распределенными временами появления флуктуаций (Аносов и др. 1999), что свидетельствовало о независимом характере появления липидных пор. Возникает вопрос: сохраняется ли независимое распределение флуктуаций тока в случае двухуровневых и более флуктуаций. Имеет ли место в случае закрывания сдвоенного импульса синхронное закрывание двух импульсов или это событие выглядит одновременным из-за недостаточного временного разрешения установки.

Ответ на эти вопросы может быть получен путем сопоставления пуассоновского распределения случайных событий с экспериментальными данными, суммированными в гистограмме на рис. 4б.

Известно, что вероятность нахождения  $n$  событий в течение времени  $t$  со средней скоростью события  $\nu$  задается формулой

$$P_n = (\nu t)^n \exp\left(\frac{-\nu t}{n!}\right).$$

Следовательно, относительная вероятность осуществления  $n$  независимых событий, определенных как отношение вероятности всех событий к вероятности первого события, будет равна

$$\frac{P_n}{P_1} = \frac{(\nu t)^{n-1}}{n!}.$$

Если принять, что средняя скорость закрывания каналов 2 канала в секунду, а временное разрешение установки 0,3 секунды, то отношение вероятности закрывания двух каналов к вероятности закрывания одного канала будет равно 0,3. Однако сравнение площадей под первым и вторым

пиками гистограммы на рис. 3б показывает, что площадь под вторым пиком составляет приблизительно 0,8 площади под первым пиком, что существенно отличается от расчетных данных. Следовательно полученные данные подтверждают сделанное предположение о существовании зависимости между появлением пор в случае регистрации двух и более уровней флуктуаций тока. Это делает вероятным существование механизмов коалесценции и/или кластеризации липидных пор.

Дальнейшее снижение температуры до температуры много ниже основного перехода и предперехода ( $35^{\circ}\text{C}$ ) приводит к исчезновению разрешенных флуктуаций тока и нарастанию шума, что приводит к уширению пика на гистограмм, при нулевых значениях тока (рис. 4в). Таким образом, значительные флуктуации тока, свидетельствующие о рождении липидных пор в случае мягкой порации, обусловлены, очевидно, структурными перестройками липидного бислоя в результате фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель в относительно узком температурном интервале около температуры основного фазового перехода. Еще одним доказательством связи электрической проводимости пБЛМ из ДПФХ со структурными перестройками бислоя при фазовом переходе являются результаты опытов с холестерином. Как известно (Геннис, 1997), холестерин в соотношении с липидом более 30 мольных процентов предотвращает структурные изменения в липидном бислое при температурном фазовом переходе. Было обнаружено, что проводимость пБЛМ в присутствии холестерина даже при температуре основного фазового перехода остается низкой, что указывает на малую вероятность появления пор в отсутствие существенных структурных перестроек бислоя.

На рис.5 представлена типичная запись флуктуаций тока, регистрируемых в БЛМ при температуре основного фазового перехода, как функции напряжения. Можно видеть снижение амплитуды флуктуаций с уменьшением фиксированного напряжения (рис. 5 а, б, в), исчезновение флуктуаций при нулевом потенциале (рис. 5г) и нарастание амплитуды флуктуаций тока противоположного направления при смене знака фиксированного напряжения (рис. 5 д, е, ж). Стационарная вольт-амперная характеристика пБЛМ имела линейный характер в диапазоне напряжений  $\pm 80$  мВ.

*Количественная оценка радиуса пор.* Экспериментальное определение размеров пор производилось путем регистрации флуктуаций тока в пБЛМ из ДПФХ при добавлении в водный раствор 20%-ного раствора полиэтиленгликоля определенной молекулярной массы. Последовательное добавление ПЭГ-300 и ПЭГ-600 приводит к постепенному снижению амплитуды флуктуаций тока и уменьшению количества флуктуаций. В растворах с ПЭГ-1450, ПЭГ-2000 и ПЭГ-3350 флуктуации тока отсутствова-

ли. И наконец, в растворе ПЭГ-6000 вновь появились флуктуации тока с несколько уменьшенной, по сравнению с исходной записью, амплитудой.

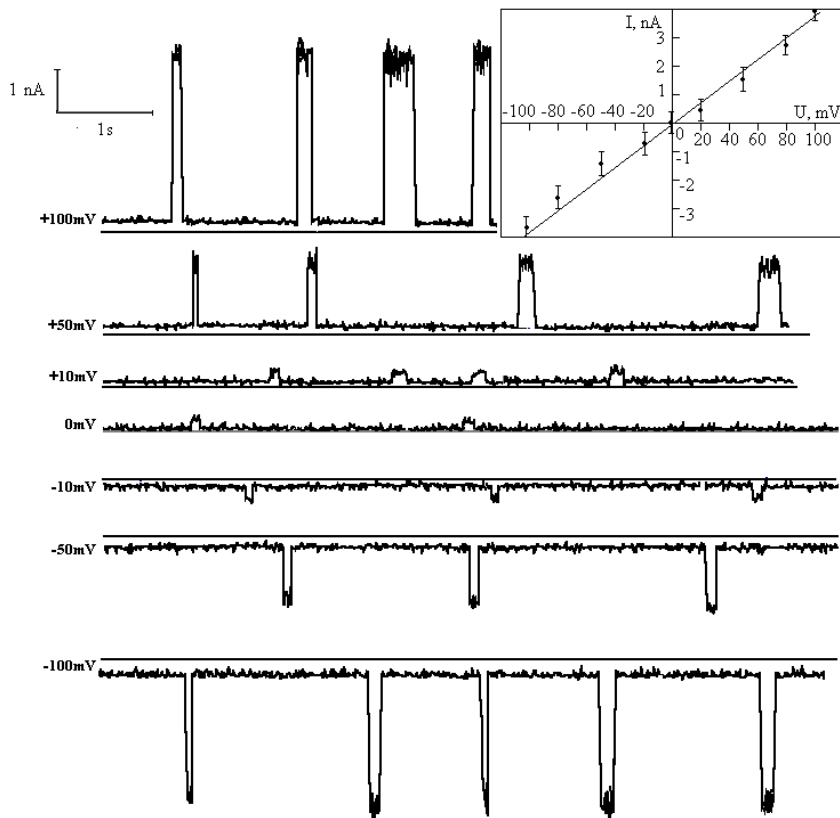


Рис. 5. Флуктуации тока в плоских БЛМ из ДПФХ при температуре основного фазового перехода  $43 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Слева указаны значения фиксированного мембранного потенциала. Уровень нулевого тока показан тонкими горизонтальными линиями. Среда содержала водный раствор 1M LiCl, pH 6,9, без буфера.

Полученные данные можно трактовать следующим образом. Исходно электрический ток в порах переносится в основном катионами  $\text{Li}^+$ . Добавление в раствор ПЭГ-300 и ПЭГ-600 сопровождается входением нейтральных молекул полиэтиленгликоля в просвет поры и снижением тока через пору, что приводит к уменьшению амплитуды флуктуаций. В растворах ПЭГ-1450, ПЭГ-2000 и ПЭГ-3350 липидные поры заполняются молекулами полиэтиленгликоля и ток через мембрану блокируется. Этот ре-

зультат принципиально отличает поведение молекул ПЭГ в липидных и белковых каналах, поскольку для последних эффект блокирования не наблюдается (Rostovtseva et al.2002). Молекулы большего размера ПЭГ-6000, по-видимому, не могут проникнуть в пору, и ток через мембрану восстанавливается. Таким образом, радиус липидной поры находится в пределах радиуса молекул ПЭГ-1450, ПЭГ-2000 и ПЭГ-3350.

Результаты расчетов и измерений суммированы в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительная таблица оценки радиуса липидной поры при мягкой порации пБЛМ из ДПФХ

Катион	Расчет радиуса поры по проводимости, нм	Расчет радиуса поры по Илдридж и Моровиц, нм	Оценка радиуса поры по результатам эксперимента с ПЭГ, нм
Li <sup>+</sup>	2,1	1,4	ПЭГ-1440 1,22 ПЭГ-2000 1,69 ПЭГ-3550 1,05 *
Na <sup>+</sup>	1,9	1,5	–
K <sup>+</sup>	1,0	1,4	–
Rb <sup>+</sup>	1,0	1,3	–
Cs <sup>+</sup>	0,9	1,3	–
Среднее	–	1,4±0,1	1,3±0,2

\*гидродинамические радиусы молекул полиэтиленгликоля, блокирующих проводимость липидных пор.

В первом столбце приведены результаты расчетов с учетом средней проводимости единичных пор в различных ионных растворах. Как видно радиус литиевой поры равен 3,1 нм, радиус цезиевой поры в 3 раза меньше, что свидетельствует о наличии умеренной катионной селективности липидных пор. Расчеты по формулам Илдриджа и Моровица (Eldridge & Morowitz, 1978), дают значения радиуса поры, который в среднем равен 1,3±0,3 нм. Радиус гидратированных молекул ПЭГ, блокирующих проводимость липидных пор, лежит в пределах 1,05–1,69 нм, что достаточно хорошо согласуется с расчетными данными столбца 2. В отличие от методов Илдриджа и Моровица и метода исключенного объема с ПЭГ, которые дают усредненные размеры радиуса липидной поры при мягкой порации, результаты опытов с электропроводимостью выявляют закономерный ряд, который соответствует лиотропному ряду одновалентных катионов.

*Количество пор.* Основным отличием мягкой порации является малое значение мембранного потенциала. Высокое пороговое значение на-

пряжения на мембране в случае электропорации сопровождается появлением большого количества флуктуаций тока, достигающего порядка  $10^5$  на пБЛМ площадью  $1\text{мм}^2$  (9).

Согласно Фримен и др. (Freeman et al., 1994) в стационарных условиях при нулевом значении напряжения на мембране количество одиночных липидных пор может быть найдено по формуле:

$$N = n_0 \cdot \lambda_r \cdot \exp \frac{-r_{\min}}{\lambda_r}, \quad (1)$$

где  $n_0$  – начальное значение плотности вероятности рождения поры, равное по Фриман и др. (10)  $1,2 \cdot 10^{24} \text{ м}^{-1}$ ,  $\lambda_r = \frac{kT}{2\pi\gamma} \approx 3 \cdot 10^{-11} \text{ м}$ , что при ра-

диусе поры порядка 1 нм дает количество пор  $N=7$ . В случае мягкой порации величина  $N$  поддается экспериментальному определению (табл. 3), что позволяет сравнить теорию с экспериментом.

В приближении малого непробойного мембранного потенциала можно считать, что проводимость липидного бислоя определяется произведением количества пор на проводимость каждой поры. Для этого случая может быть предложена формула расчета:

$$N = \frac{Gh}{\pi R^2 j}, \quad (2)$$

где  $N$  – число проводящих пор,  $G$  – проводимость пБЛМ в растворах различных электролитов на рис. 6,  $h$  – толщина бислоя, принимаемая равной 5нм,  $R$  – радиус поры из табл. 1,  $j$  – удельная проводимость раствора электролита. Результаты расчета по этой формуле и экспериментальные данные сведены в таблицу 2.

Таблица 2

Среднее количество пор в пБЛМ из ДПФХ, регистрируемых при температуре основного фазового перехода ДПФХ в 1М-растворах одновалентных катионов

Электролит	Количество пор, рассчитанных по формуле (2)	Количество пор, оцененных экспериментально по флуктуациям тока (на одну мембрану)
LiCl	1,0	$50 \pm 8$ (10)*
NaCl	0,5	$12 \pm 5$ (7)
KCl	<0,5	$10 \pm 3$ (5)
RbCl	<0,5	$7 \pm 3$ (6)
CsCl	<0,5	$4 \pm 2$ (8)

\* количество пБЛМ

Данные, приведенные в таблице, позволяют сделать несколько выводов. Прежде всего, количество липидных пор при электропорации на пять порядков отличается от количества пор при мягкой порации. Во-вторых, количество липидных пор, обнаруживаемых экспериментально, хорошо согласуется с данными расчета стационарной модели рождения липидных пор Фриман и др. для всех растворов, кроме LiCl, и в то же время наблюдается значительное расхождение с данными расчета по формуле (2). Последний результат можно согласовать с экспериментом, если предположить, что в течение жизни пБЛМ одна и та же пора может открываться многократно.

*Фазовый переход  $L\alpha \rightarrow H_{II}$  ДПФК.* Одним из основных кислых фосфолипидов клеточных мембран является фосфатидная кислота. В зависимости от pH водной среды каждая молекула фосфолипида может нести в полярной головке 1 или 2 отрицательных заряда.

Электростатическое отталкивание и клиновидность молекул затрудняет формирование стабильного бислоя и проведение экспериментов с плоскими бислойнными мембранами. Впервые плоские БЛМ из ДПФК были созданы в нашей лаборатории путем формирования их в водных средах с малым pH, где заряд на молекулу не превышал 1 (Antonov et al., 1985). По данным рентгеноструктурного анализа, в этих условиях добавление 1 mM  $Ca^{2+}$  сопровождается фазовым переходом  $L\alpha \rightarrow H_{II}$  (Геннис 1997). Таким образом появилась возможность экспериментального обнаружения и исследования липидных пор типа, указанного на рис. 1 б. В отличие от термотропных фазовых переходов, где фазовый переход определяется температурой, в данном случае переход происходит при постоянной температуре.

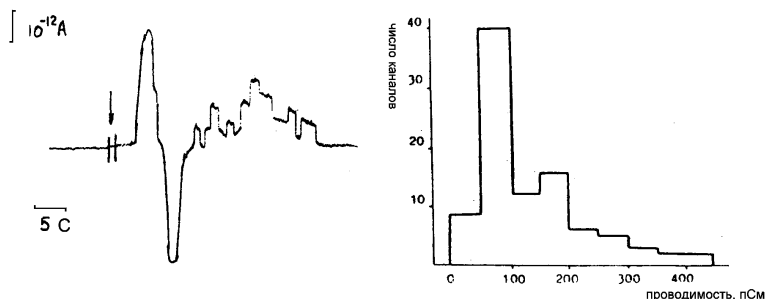


Рис. 7.  $Ca^{2+}$ -индуцированные флуктуации тока в плоских БЛМ из дипальмитоилфосфатидной кислоты. Водная среда содержала 0,1 M LiCl, pH 4,6, без буфера. Температура поддерживалась постоянной на уровне температуры основного фазового перехода ( $64 \pm 0,5$  °C). Мембранный потенциал поддерживался на уровне 5 мВ. Подробности в тексте



Полученные результаты представлены на рис. 7. Плоские бислойные липидные мембраны из фосфатидной кислоты формировались на отверстие тefлонового стаканчика в водном растворе без добавленного  $\text{Ca}^{2+}$  при pH 4,6.

Фазовый переход при постоянной температуре запускался добавлением  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации  $10^{-4}$ - $10^{-3}$  М по обе стороны БЛМ (показано двумя вертикальными линиями). Последующую запись можно разбить на три участка. Первый участок длительностью несколько секунд характеризуется нулевым электрическим током. Второй этап сопровождается плавным двухфазным изменением электрического тока. Третий этап включает скачкообразные флуктуации тока, отождествляемые с появлением трансмембранных липидных пор (ср. рис. 6). Латентный период очевидно определяется временем, необходимым для диффузии ионов кальция из объема к поверхности БЛМ. Простой расчет подтверждает сделанное предположение. Действительно, толщина перемешиваемого слоя жидкости у поверхности БЛМ не превышает  $10^{-2}$  см, коэффициент диффузии ионов кальция в водной среде порядка  $10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с. Эти условия соответствуют длительности нескольких секунд, что совпадает с данными, приведенными на рисунке. Вторая фаза – плавное изменение тока – связывается нами с емкостными изменениями в БЛМ в ходе структурной перестройки бислоя. Особый интерес представляет третий этап изменения трансмембранного тока, характеризующийся скачками тока. Можно видеть, что добавление ионов кальция приводит к появлению многочисленных флуктуаций тока многоуровневого типа с количеством уровней, достигающим 7. Гистограмма, показанная справа, свидетельствует о наличии наиболее вероятных флуктуаций амплитудой 100 пикосименс. Оценочный расчет радиуса липидной поры дает величину 0,4 нм. Следует отметить, что эта величина значительно меньше радиуса поры, характерного для липидной фазы H11 и равной 2,2–5,2 нм (Rand et al.1990).

## Заключение

При исследовании полиморфизма мембранных липидов, образующих пористые структуры, особый интерес представляют начальные стадии рождения и эволюции гидрофильной поры. Наиболее адекватным и достаточно чувствительным методом в этом случае является метод регистрации электропроводности и емкости плоской БЛМ в условиях фазового перехода индивидуальных липидов (Антонов,1998). Для количественного анализа получаемых данных может быть использована теория критической поры, разработанная Дерягиным (Derjaguin & Prokhorov,1981).

В соответствии с общепринятой схемой рождению гидрофильной поры предшествует образование в бислое гидрофобной поры. Рост по-

следней до радиуса величиной  $R \geq 1/2d$ , где  $d$  – толщина бислоя, сопровождается превращением ее в гидрофильную пору, представленную на рис. 1А. Значительный интерес представляет сопоставление количества гидрофобных пор, ожидаемых при фазовом переходе ДПФХ из жидкокристаллического состояния в гель (рис. 3), с количеством гидрофильных пор (табл. 2), определенных методом электропроводности в плоском бислое при температуре основного фазового перехода. По данным рентгеноструктурного анализа площадь на одну молекулу ДПФХ в жидкокристаллическом бислое равна  $0,58 \text{ нм}^2$  и уменьшается до  $0,48 \text{ нм}^2$  в гелеобразном состоянии (Геннис, 1997). На площади плоской БЛМ  $1 \text{ мкм}^2$  и толщиной  $5 \text{ нм}$  можно ожидать появления  $10^{10}$  гидрофильных пор при условии, что каждая гидрофобная пора рождает одну гидрофильную пору по завершении фазового перехода. В действительности количество гидрофильных пор в этих условиях не превышает  $50$  (табл. 2). Столь значительное расхождение свидетельствует, по-видимому, о том, что действительно плоская БЛМ в условиях эксперимента находится в области сосуществования двух фаз, когда фазовый переход еще не завершен.

В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что полный переход БЛМ в гель-состояние сопровождается появлением электрического шума (рис. 4в), что можно рассматривать как указание на возможность появления большого количества пор малого радиуса. Следуя концепции критической поры, можно утверждать, что наибольшую опасность с точки зрения стабильности липидного бислоя при  $L\alpha \rightarrow L\beta$ -переходе представляет собой узкая температурная область вблизи температуры главного фазового перехода, поскольку дальнейший рост регистрируемых в этой области крупных липидных пор может привести к превышению размера критической поры и необратимому разрыву мембраны.

В рамках этого подхода в настоящее время решаются многие проблемы мембранологии. Перечень их представлен в таблице 3.

С точки зрения биологии и медицины наибольший интерес представляют фазовые превращения липидов, связанные с изменением проницаемости. Образование поры слияния при клеточном слиянии, эндоцитозе и экзоцитозе наиболее естественно, как упоминалось выше, благодаря фазовому переходу типа  $L\alpha$ -H11 или  $L\alpha$ -Q $\alpha$ , что способствует сохранению жидкостности бислоя, но либо сопровождается утерей бислоиности, либо требует специфических фосфолипидов типа ФЭА. Не исключено, что широко распространенное в мембранах фазовое разделение липидов обеспечивает разделение функций мембран таким образом, чтобы ферменты концентрировались в жидкокристаллических доменах, в то время как транспортные процессы могут протекать в гелеобразных доменах или на их границах, а также в специализированных H11 и Q-фазах. В последнее время, в связи с этим, многочисленными экспериментами доказано

существование в клеточных мембранах доменных структур – рафтов, состоящих из холестерина, сфингомиелина и некоторых транспортных белков. При физиологических температурах рафты находятся в упорядоченном гелеобразном состоянии и не нарушают бислоиности мембран. С ними связывают явление внутриклеточной сигнализации клеток (Сильвиус 2003). Нарушение стабильности и разрушение бислоя определяется помимо других факторов появлением липидных пор критического радиуса. При непробойных физиологических значениях мембранного потенциала радиус критической поры оценивается простой формулой  $\gamma/\sigma$ , где  $\gamma$ –краевое натяжение поры,  $\sigma$ –поверхностное натяжение липидного бислоя. Как хорошо известно в криобиологии, успешному замораживанию клеток предшествует фаза осушения клетки. Удаление избыточной воды из клетки возможно через липидные поры в результате фазового перехода  $L\alpha \rightarrow L\beta$ .

Таблица 3  
Фазовые переходы мембранных липидов в биологии

Явление	Изучаемая проблема	Тип фазового перехода
	Физиология мембран	
Клеточное слияние, эндоцитоз, экзоцитоз	Пора слияния	$L\alpha \rightarrow Q\alpha$ , $L\alpha \rightarrow H11$
Внутриклеточная сигнализация	Рафтовые структуры	Фазовое разделение Липидов
	Патология мембран	
Порообразование в липидном бислое мембран при облучении, ожоге, обморожении, обезвоживании	Критическая липидная пора	$L\alpha \rightarrow L\beta$
	Фармакология мембран	
Направленная доставка лекарств	Локальный СВЧ-нагрев ткани	$L\alpha \rightarrow L\beta$
Внутриклеточное введение лекарств и Генетического материала	Слияние липосом с клетками	$L\alpha \rightarrow L\beta$ , $L\alpha \rightarrow Q\alpha$ $L\alpha \rightarrow H11$

В медицине проблема направленной доставки лекарств и генетического материала частично решается с использованием фазовых переходов липидов в бислое липосом. Известна методика освобождения содержимого липосом в результате порообразования при плавлении липида в результате локального СВЧ-нагрева пораженной области (Weinstein et al., 1979).

Направленная доставка и внутриклеточное включение ДНК обеспечивается порами, представленными на рис. 2 б, в (Siegel, 1999) .

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 01-04-48611.

## **Литература**

1. Аносов А.А., Богатырева Н.Э., Черныш А.М., Антонов В.Ф. (1999) Экспоненциальное распределение межимпульсных интервалов тока в бислойных липидных мембранах при температуре фазового перехода. *Биофизика* 44:887–891
2. Antonov V.F., Petrov V.V., Molnar A.A., Predvoditelev D.A., Ivanov A.S. (1980) The appearance of single ion channels in unmodified lipid bilayer membrane at the phase transition temperature. *Nature* 283:585–588.
3. Antonov V.F., Shevchenko E.V., Kozhomkulov E.T., Molnar A.A., Smirnova E.Yu. (1985) Capacitance and ion currents in BLM from phosphatidic acid in  $Ca^{2+}$  induced phase transition. *Biochem Biophys Res Commun* 133:1098–1103.
4. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. (1992) Липидные мембраны при фазовых превращениях мембранных липидов. М., Наука, с.123.
5. Антонов ВФ (1998) Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран. *Соросовский образовательный журнал* 10:10–17.
6. Antonov V.F., Anosov A.A., Norik V.P., Smirnova E.Yu. (2004) Soft perforation of planar BLM from DPPC at the temperature of phase transition from the liquid crystalline to the gel (submitted to *European Biophysics J*).
7. Богатырева Н.Э., Шевченко Е.В., Яковенко Е.В., Черныш А.М., Райнов М.В., Антонов В.Ф. (1998) Липидные поры и времена жизни бислойных липидных мембран в гель- и жидкокристаллическом состояниях. *Биофизика* 43:57–60.
8. Boheim G., Hanke W., Eibl H. (1980) Lipid phase transition in planar bilayer membrane and its effect on carrier- and pore-mediated ion transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3403–3407.

9. Chernomordik L.V., Sukharev I.S., Abidor I.G., Chizmadzhev Yu.A. (1982) The study of the BLM reversible electrical breakdown mechanism in the presence of  $\text{UO}_2^{2+}$  Bioelectrochem Bioenerg 6:149–155.
10. Cunningham B.A., Shimotake J.E., Tamura-Lis W., Mastran T., Kwok J.T., Kaufman J.W., Lis L.J. (1986) The influence of ion species on phosphatidylcholine bilayer structure and packing. Chem Phys Lipids 39:135–43.
11. De Kruijff B. (1997) Lipid polymorphism and biomembrane function. Current opinion in chemical biology 1:564–569.
12. Derjaguin B.V. & Prokhorov A.V. (1981) On the theory of the rupture of black films. J. Colloid Interface Sci, 81:108–115.
13. Eldridge C., Morowitz H.J. (1978) The calculations of pore dimensions. J Theor Biol 73:539–548.
14. Freeman S.A., Wang M.A., Weaver J.C. (1994) Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation. Biophys J 67:42–56.
15. Геннис П. (1997) Биомембраны: молекулярная структура и функции. М., Мир, 511.
16. Glaser R.W., Leikin S.L., Chernomordik L.V., Pastuschenko V.F., Sokirko A.I. (1988) Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. Biochim Biophys Acta 940:275–287.
17. Israelachvili S., Marcelij S., Horn R.G. (1980) Physical principles of membrane organization. Quart.Rev.Biophys. 13:121–200.
18. Kraayenhof R., Sterk G.J., Harro W., Wong Fong Sang, Krab K., R.M. Epand (1996).
19. Monovalent cations differentially affect membrane surface properties and membrane curvature, as revealed by fluorescent probes and dynamic light scattering. BBA 1282, 293–302.
20. Красильников О.В., Де Круз Ж.Б., Ногуйра Р.А. (1998) Как измерить диаметр каждого входа у ионного канала, регистрируя только его проводимость. Биофизика, 43:299–303.
21. Lee R.C., Hannig J. (2001) Membrane biology and biophysics. Surgical Res 25:297–305.
22. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.Ti., Wescott W.C. (1962) Reconstruction of cell membrane structures in vitro and its transformation into an excitable system. Nature 194:979–980.
23. Raffy S., Teissie J. (1999) Control of lipid membrane stability by cholesterol content. Biophys J 76:2072–2080.
24. Rand R.P., Fuller N.I., Gruner S.H., Parsegian V.A. (1990) Membrane curvature, lipid segregation and structural transitions for phospholipid under dual-solvent stress Biochemistry 29:76–87.

25. Rostovtseva T.K., Nesterovich E.M., Bezrukov S.M. (2002) Partitioning of differently sized poly(ethylene glycol)s into Ompf porin. *Biophys J* 82:160–169.
26. Sackmann E. (1983) Physical foundations of the molecular organization and dynamics. Of membranes, *Biophysics* (Hoppe W, Lohman W, Markl H & Ziegler H, eds.) pp.425–457, Springer-Verlag, New York.
27. Siegel D.P. (1999) The modified stalk mechanism of lamellar / inverted phase transitions and its implication for membrane fusion. *Biophys J* 76:291–313.
28. Silvius J.K. (2003) Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta* 1610:174–183.
29. Weinstein J.N., Magin R.I., Yatvin M.B., Zaharko D.S. (1979) Liposomes and local hyperthermia: selective delivery of methotrexate to heated tumors. *Science* 204:188–191.
30. Харакоз Д.П. (2001) О возможной физиологической роли фазового перехода "жидкое-твердое" в биологических мембранах. *Успехи биол. химии* 41:333–364.