

Учреждение Российской академии наук
Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН

на правах рукописи

БАТИЩЕВ ОЛЕГ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ

БИОЭЛЕКТРОХИМИЯ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН,
НЕ СОДЕРЖАЩИХ РАСТВОРИТЕЛЬ

Специальность 02.00.05 – Электрохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2008

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

Научный руководитель:

кандидат химических наук, старший научный сотрудник

Андрей Владимирович Инденбом

Официальные оппоненты:

Доктор физико-математических наук

Александр Михайлович Емельяненко

Доктор химических наук

Александра Мордухаевич Скундин

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится 21 октября 2008 года в 11 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 002.259.03 при Учреждение Российской академии наук Институте физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН.

Автореферат разослан 18 сентября 2008 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат химических наук



Г. М. Корначева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение. Актуальность проблемы. Плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ) являются давно известной удобной системой для моделирования клеточных мембран. Они позволяют изучать различные электрохимические свойства липидных бислоев, такие как распределение электрического потенциала, адсорбция ионов, строение двойного электрического слоя, влияние внешних электрических полей, ионный транспорт, процессы их слияния, деления и т.п. (Tien, 1974). Все известные на сегодняшний день методы получения БЛМ сводятся к двум основным: первый – нанесение на отверстие в тефлоновой перегородке капельки раствора липида в неполярном органическом растворителе (метод Мюллера-Рудина) (Mueller et al., 1962), второй – сведение двух монослоев на отверстиях в перегородке, разделяющей две полужайки (метод Монтала) (Takagi et al., 1965; Montal and Mueller, 1972). Оба эти метода имеют один значительный недостаток – это наличие микролинз растворителя в центральной гидрофобной области мембраны и избыток липида в растворителе в окаймляющем мембрану мениске (Montal and Mueller, 1972; White et al., 1976; Chanturiya, 1996). Присутствие растворителя в мениске приводит к неконтролируемому значению натяжения мембран, что затрудняет изучение их механических параметров; слияние мембран может инициироваться при встрече микролинз растворителя, принадлежащих контактирующим бислоям (Berestovsky and Gyulkhandanyan, 1976), что не может реализовываться на биологических мембранах. Все это послужило причиной поиска возможных путей минимизации количества растворителя в БЛМ. Существует целый ряд работ, в которых описаны различные модификации методик формирования мембран, подразумевающие использование высокомолекулярных растворителей, почти не образующих микролинз, (White, 1978), вымораживание растворителя из мениска (White, 1974) или изменение экспериментальной системы (Vodyanoy and Murphy, 1982). Однако эти модификации вносили ограничения в применимость данной модельной системы. Таким образом, получить БЛМ, не содержащей растворитель ни в мениске, ни в самом бислое, так и не удалось.

Недавно для формирования мембран было предложено использовать гидрофобизированные неорганические материалы (стекло или кремний) вместо полимеров (Pantoja et al., 2001), так как поверхностные свойства полимерных пленок (тефлон, полиэтилен и т.п.) характеризуются большой нестабильностью, в отличие от твердой поверхности неорганических материалов. Это направление показалось нам достаточно перспективным, так как химическая модификация поверхности неорганических материалов различными агентами открывает практически неограниченные возможности изменения ее свойств, не влияя при этом на свойства базиса. Для формирования мембран в наших экспериментах мы решили использовать дифитаноилфосфатидилхолин, ДФФХ, т.к. из литературных данных известно, что он имеет pK_a 2,1 и 10,5, т.е. остается электронейтральным в широком диапазоне pH (Davenport, 1971), а также не претерпевает фазовый переход в диапазоне температур от -120°C до $+80^{\circ}\text{C}$ (Silvius, 1982).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось получение и исследование свойств бислойных липидных мембран, не содержащих растворитель. Конкретные задачи состояли в следующем:

- 1) разработать методы химической модификации поверхности материалов для последующего формирования на отверстиях в них БЛМ, не содержащих растворитель;
- 2) изучить влияние раствора электролита на процесс формирования мембран;
- 3) разработать методику формирования мембран, не содержащих растворитель, на отверстиях в материалах с модифицированной поверхностью;
- 4) определить электрические (удельные емкость и проводимость) и механические (латеральное и линейное натяжение) параметры БЛМ, не содержащих растворитель, и сопоставить их со свойствами классических БЛМ.

Научная новизна. В работе удалось решить задачу формирования БЛМ, полностью лишенных растворителя, с помощью разработки методик алкилирования стекол, что является существенным прорывом в вопросе создания

искусственных липидных мембран. Были обнаружены и исследованы эффекты изменения поверхностных свойств монослоев используемого липида и их роль в процессе формирования бислоев. Сделан вывод о влиянии специфической адсорбции гидроксил-ионов в области полярных «головок» липидных молекул на натяжение липидных монослоев и бислоев.

Практическое значение работы. Разработанная и исследованная в диссертации методика формирования бислоевых липидных мембран может быть использована для изучения широкого круга мембранных явлений, таких, как процессы слияния и деления мембран, вирус-индуцированного слияния, транспорта ионов через каналы, образование доменов в липидном бислое и т.д. Одним из важных результатов работы является демонстрация того, что нейтральный липид ДФФХ значительно меняет свои свойства при изменении рН в области электронейтральности вблизи от изоэлектрической точки. Полученные в работе зависимости натяжения липидных монослоев и бислоев от рН среды важны для описания процессов функционирования клеточных мембран.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на конференциях молодых ученых ИФХЭ РАН (Москва, 2006, 2007); на 8-м международном Фрумкинском симпозиуме «Кинетика электродных процессов» (Москва, 2005); на 19-м международном симпозиуме по биоэлектрохимии и биоэнергетике (Тулуза, Франция, 2007); на научных семинарах лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ РАН (Москва, 2004–2008).

Публикации. Основные положения диссертации опубликованы в трех статьях в отечественных и международных реферируемых журналах, входящих в список ВАК.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 93 страницах, включает 25 иллюстраций. Диссертация состоит из введения, четырех основных частей и заключения. Список цитированной литературы содержит 138 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение гидрофобных стекол.

Подложки для последующего формирования БЛМ изготавливались из покровных стекол (Thomas Scientific, США) толщиной 100 мкм, в которых путем химического травления в плавиковой кислоте получали круглые отверстия диаметром 150 – 400 мкм. Для очистки и активации поверхности стекла применялся метод обработки плазмой водяных паров. Создание индукционного плазменного заряда осуществлялось посредством собранной нами установки, состоящей из форвакуумного насоса («MLW», модель DSE 8, Германия), генератора ультравысоких частот (модель УВЧ-30-2, ГЗАС им. А.С. Попова, Россия) и системы напуска водяных паров, контролируемого с помощью вакуумметра (13ВТЗ-003, Россия). Обработка покровных стекол производилась в течение 40 минут непосредственно перед дальнейшей химической модификацией.

Гидрофобизация проходила согласно предложенной нами методики их последовательной обработки несколькими хлорсиланами в порядке убывания длины углеводородного «хвоста»: октадецилтрихлорсиланом, диметилдецилхлорсиланом и диметилдихлорсиланом («Fluka Chemie», Германия). Покровные стекла выдерживались в 3% растворе (по объему) соответствующего хлорсилана в толуоле (для УФ – спектроскопии, «Chemapol», Чехия) в течение часа в атмосфере аргона, после чего трехкратно промывались толуолом для удаления молекул хлорсилана, не связавшихся с поверхностью, и выдерживались в сушильном шкафу в течение 30 минут при температуре 120 градусов. Затем процедура повторялась для следующего хлорсилана (Батищев и Инденбом, 2004). Для дальнейшей работы использовались только свежеприготовленные образцы (в течение 1 – 3 суток после изготовления).

Получение амфифобных стекол.

Предварительная обработка покровных стекол перед амфифобизацией (фторосиликонизацией) проводилась так же, как и при гидрофобизации.

Фторосиликонизация осуществлялась путем кипячения стекол в течение 8 часов в 2% растворе (по объему) 3,3,3-Трифторпропилтриметоксисилана («Fluka Chemie», Германия) в толуоле (для УФ – спектроскопии, «Chemapol», Чехия) в колбе с обратным холодильником, после чего они тоекратно промывались толуолом для удаления остатков фторсилоксана, не связавшихся с поверхностью, и прогревались в сушильном шкафу в течение 30 минут при температуре 120 градусов. При такой обработке поверхность стекла приобретала амфифобные свойства, т.е. становилась как гидрофобной, так и липофобной (Batishchev and Indenbom, 2008). Для дальнейшей работы также использовались только свежеприготовленные образцы (в течение 1 – 3 суток после изготовления).

Измерение краевых углов смачивания.

О гидрофобности и липофобности полученных образцов и их изменении в присутствии липидов судили по краевым углам смачивания чистой водой и водой с монослоем липида. Для этого на поверхность стекла или тефлоновой пленки наносили каплю воды объемом 5 мкл и 0,25 мкл раствора 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфохолина, ДФФХ, («Avanti Polar Lipids», США) в гексане (для хроматографии, «Реахим», Россия) с концентрацией 0,1 г/л. Такое количество липида является минимально необходимым для образования монослоя на поверхности водной капли. Краевой угол измеряли по изображению капли на экране монитора («TVS», модель ММ-15, Тайвань), полученному с помощью микроскопа (МБС-2, Россия) посредством цифрового фотоаппарата («Nikon», модель Coolpix 4500, Япония).

Формирование мембран.

Бислойные липидные мембраны, не содержащие растворитель, формировались методом сведения монослоев (Takagi et al., 1965; Montal and Mueller, 1972) в ячейке, состоящей из двух частей (полуячеек), между которыми располагалось гидрофобизированное либо амфифобизированное покровное стекло с отверстием. Полуячейки заполнялись 0,1 М раствором КСl (чистота 99,8%, «Реахим», Россия) в

дважды дистиллированной воде так, чтобы уровень жидкости находился немного ниже отверстия в стеклянной перегородке. Кислотность среды варьировали добавлением HCl. Для образования монослоя липида на поверхность воды в каждую полуячейку наносили 5 мкл раствора ДФФХ в гексане концентрацией 1 г/л. Монослои сводились путем поочередного поднятия уровней жидкости в полуячейках через 15 мин после нанесения раствора липида. За процессом образования мембран следили по изображению на экране монитора («TVS», модель MM-15, Тайвань), полученному с помощью микроскопа (МБС-9, Россия) посредством цифрового фотоаппарата («Nikon», модель Coolpix 4500, Япония).

Электрические измерения проводились разработанным в нашей лаборатории потенциодинамическим методом (Абидор и др., 1980). Треугольные импульсы напряжения амплитудой 100 мВ (от пика до пика) и частотой 200 Гц подавались с генератора электрических сигналов специальной формы («EG&G Parc», модель 175, США) на мембрану с помощью пары хлорсеребряных электродов. Токовые отклики регистрировались с помощью усилителя тока («Keithley», модель 428, США) и выводились на компьютер с помощью карты АЦП («Л-кард», модель L761, Россия). Величины проводимости и емкости мембран рассчитывались на основе эквивалентной схемы с их параллельным соединением (аналог адмиттанса). Такая схема отвечает свойствам липидных мембран, имеющих значительно более высокое удельное электрическое сопротивление, чем удельное сопротивление раствора электролита в ячейке. Формирование мембран регистрировали по резкому росту электрической емкости.

Измерение разности граничных потенциалов на мембране.

Измерения проводились по методу компенсации внутримембранного поля, предложенному в (Соколов и др., 1980). БЛМ формировались по методу Мюллера-Рудина (Mueller et al., 1962) из раствора ДФФХ в декане (концентрация 15 г/л) на отверстии диаметром 1 мм в тефлоновой перегородке. Разность граничных потенциалов БЛМ измеряли по величине второй гармоники емкостного тока. Измерения осуществлялись посредством фазочувствительного усилителя DSP-7265

(Signal Recovery, США), который управлялся через приборный интерфейс GPIB (Measurement Computing, США). Кислотность среды варьировали добавлением 100 мМ раствора HCl в соответствующем растворе электролита (KCl) с одной стороны от мембраны.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование БЛМ на отверстиях в гидрофобизированных стеклянных перегородках.

Получение гидрофобизированных поверхностей. Причины, по которым присутствие растворителя столь необходимо для формирования плоских БЛМ, кроются в граничных условиях, определяющих этот процесс. И главной из этих причин является то, что для правильной ориентации липидных молекул вблизи кромки отверстия необходимо повышать гидрофобность перегородок (подложек), так как в присутствии амфифильных молекул липида она значительно снижается. Для достижения максимальной гидрофобности гладких стеклянных перегородок нами была разработана методика последовательной гидрофобизации поверхности несколькими хлорсиланами в порядке убывания длины углеводородного «хвоста», когда более короткие молекулы хлорсиланов могут занимать свободные участки на поверхности, оставшиеся после обработки более длинными. В результате были получены значения краевых углов смачивания водой на данной поверхности около $100^\circ - 110^\circ$, что близко к таковым для тефлона ($110^\circ - 120^\circ$). При наличии липидного монослоя на поверхности капли этот угол уменьшался примерно до 60 градусов, что ставило под сомнение возможность формирования устойчивых БЛМ на отверстиях в таких перегородках.

В ходе дальнейших исследований было обнаружено, что эффект снижения краевого угла смачивания в присутствии ДФФХ становился менее выраженным при повышении кислотности раствора. Так, угол смачивания силанизированных стекол водой в присутствии ДФФХ рос примерно от 60 до 80 градусов при уменьшении pH раствора от 7 до 3. Аналогичный эффект наблюдался и на

поверхности тефлона. В контрольных экспериментах было показано, что в отсутствии липида краевой угол не зависит от рН.

Формирование БЛМ, не содержащих растворитель. Весьма существенно, что при низких значениях рН краевой угол приближается к 90 градусам, что обеспечивает необходимые граничные условия для формирования БЛМ, не содержащих растворитель (White et al., 1976). По описанной выше методике нам удалось сформировать такие мембраны при низких значениях рН. Их время жизни в среднем составляло несколько часов, а электрическая емкость не зависела от частоты подаваемого переменного напряжения в диапазоне от 10 до 1000 Гц. Оптические наблюдения за процессом формирования мембран показали, что при значениях от 3 до 3,5 мембрана полностью закрывает отверстие в перегородке (см Рис. 1б и 1г), т.е. ее площадь можно считать равной площади отверстия. Исходя из этого предположения, мы оценили удельную электрическую емкость наших мембран и получили значение $0,86 \text{ мкФ/см}^2 \pm 5\%$. Эта величина выше, чем для БЛМ, полученных по классическому методу Монтала ($0,8 \text{ мкФ/см}^2$) (Chanturiya, 1996). В ходе экспериментов была зафиксирована значительная зависимость электрической емкости полученных мембран от рН среды, в которой они формировались (см. Рис. 1а). Из оптических наблюдений видно, что при увеличении рН второй монослой начинает закрывать лишь часть отверстия в перегородке (см. Рис. 1б и 1г). После образования мембраны изменение рН уже не влияло на ее емкость и способствовало разрушению. Кроме того, как при полном закрытии отверстия вторым монослоем, так и при частичном, невозможно было поднять уровень выше того, на который произошло спонтанное поднятие.

Для проверки бислойности полученных мембран была исследована их проводимость в присутствии каналоформеров, которые могут создавать каналы только в бислойных мембранах (Kleinberg and Finkelstein, 1984). В результате одностороннего добавления нистатина в окружающий мембрану раствор мы наблюдали пропорциональный его концентрации рост проводимости БЛМ (см. Рис. 2).

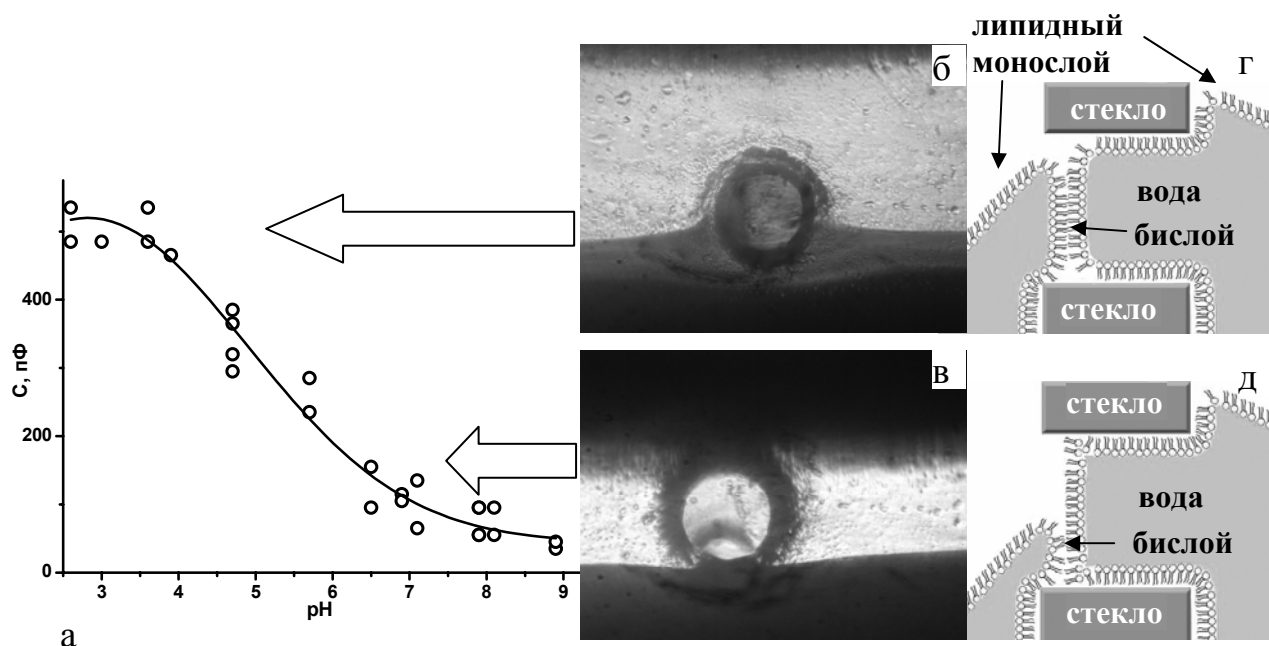


Рисунок 1. а) Электрическая емкость мембран, не содержащих растворитель, как функция рН водных растворов, в которых они формировались. Диаметр отверстия составлял 277 мкм. б) и в) Фотографии мембран, сформированных при различных рН. Диаметр отверстия – 180 мкм. Один уровень раствора (верхняя граница темной и светлой областей) всегда находится выше отверстия. Второй – подводится под нижний край отверстия. Образование БЛМ происходит спонтанно. Конечное положение второго уровня видно по границе нижней темной области. б) рН = 3,5; БЛМ сформировалась практически на всей площади отверстия. в) рН = 6; бислойная часть занимает лишь небольшую долю отверстия вблизи нижней кромки. г) и д) схематическое изображение БЛМ, сформированных при низких (г) и высоких (д) значениях рН водного раствора.

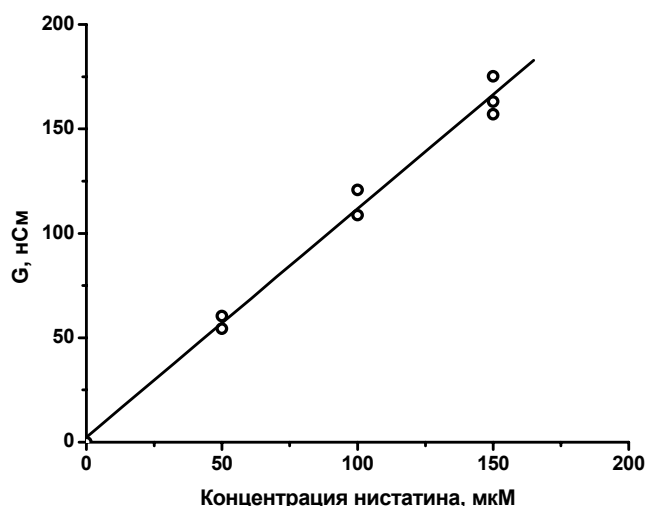


Рисунок 2. Зависимость проводимости БЛМ от концентрации нистатина в растворе в одной из полуячеек. Диаметр отверстия 300 мкм, рН 4,5. Прямая на графике соответствует линейной регрессии полученных результатов.

Эти эксперименты однозначно свидетельствуют о бислойной природе полученных мембран. Значит, изменение электрической емкости на Рис.1а действительно может быть вызвано только изменением площади БЛМ.

Зависимость межфазного натяжения монослоя ДФФХ от рН среды. Для объяснения зависимости площади БЛМ, сформированных по нашей методике, от рН среды, мы изучили рН-зависимость натяжения липидного монослоя на водной субфазе. Было исследовано изменения высоты капиллярного поднятия кромки воды в присутствии липида вдоль гидрофобизированных покровных стекол. В результате измерений были получены следующие зависимости (см. Рис. 3).

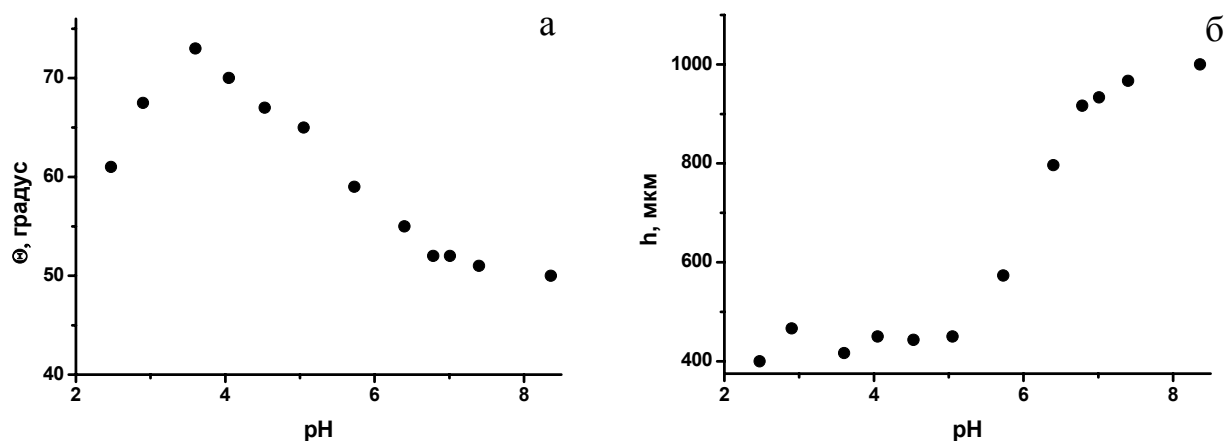


Рисунок 3. а) Зависимость краевого угла смачивания (Θ) воды в присутствии ДФФХ от рН для вертикальных гидрофобизированных стеклянных пластинок. б) Зависимость высоты капиллярного поднятия кромки воды в присутствии липида вдоль гидрофобизированных покровных стекол. Каждая точка отвечает отдельному эксперименту, проведенному на свежеприготовленном гидрофобизированном покровном стекле.

Для расчета натяжения монослоя была определена форма поверхности жидкости вблизи перегородки (см. Рис. 4).

$$x = -\frac{a}{\sqrt{2}} \operatorname{Arch} \frac{a\sqrt{2}}{z} + a\sqrt{2 - \frac{z^2}{a^2}} + x_0 \quad (1)$$

где x_0 определяется из условия, что при $x=0$ $z' = -\operatorname{ctg} \theta$, т.е. $z=h=a\sqrt{1 - \sin^2 \theta}$, где h – искомая высота поднятия жидкости у самой стенки.



Рисунок 4. Форма поверхности жидкости вблизи вертикальной смачиваемой стенки. Θ – краевой угол.

На основе полученных результатов и формулы для высоты капиллярного поднятия кромки жидкости вдоль перегородки мы получили зависимость натяжения монослоя ДФФХ от рН водной субфазы (см. Рис. 5, точки).

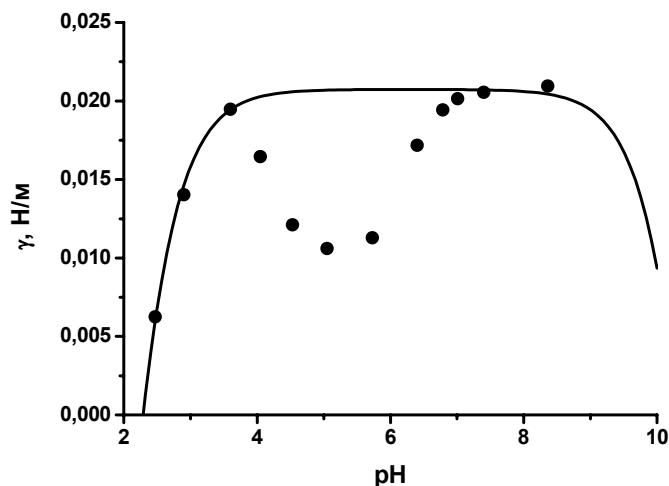
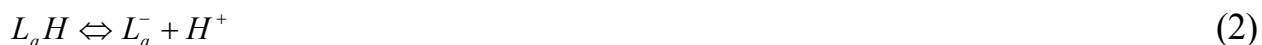


Рисунок 5. Зависимость межфазного натяжения монослоя ДФФХ от рН водной субфазы. Точки – экспериментальные данные, линия – расчет по уравнению (9), который изложен ниже.

Для описания полученной зависимости мы решили рассчитать изменение натяжения монослоя ДФФХ, происходящее вследствие кислотно-основной диссоциации его полярных групп. Этот липид является цвиттерионом, электронейтральным в широком диапазоне рН, т.к. pK_a фосфатной и холиновой группы составляют 2,1 и 10,5 соответственно (Матинян и Абидор, 1984). Для молекулы ДФФХ, имеющей одну кислотную (L_a) и одну основную группу (L_b), уравнения диссоциации будут следующими:



Соответственно, константы равновесия будут иметь вид:

$$K_1 = \frac{a_{L_aH}}{a_{L_a} a_{H^+}}, \quad K_2 = \frac{a_{L_bOH}}{a_{L_b} a_{OH^-}}, \quad K_w = a_{H^+} a_{OH^-}, \quad \text{где } a_{H^+}, a_{OH^-}, a_{L_aH}, a_{L_bOH}, a_{L_a}, a_{L_b} -$$

активности соответствующих компонентов, K_w – ионное произведение воды.

Изменение межфазного натяжения при адсорбции ионов на границе раздела описывается формулой Гиббса:

$$-d\gamma = \sum \Gamma_i d\bar{\mu}_i \quad (5)$$

где γ - межфазное натяжение, Γ_i – поверхностный избыток адсорбирующегося иона, $\bar{\mu}_i$ - электрохимический потенциал иона. В нашем случае на границе раздела липидный монослой-водный раствор происходит химическое связывание только двух типов ионов – H^+ и OH^- , поэтому мы можем переписать уравнение (5) в виде:

$$-d\gamma = \Gamma_{H^+} d\bar{\mu}_{H^+} + \Gamma_{OH^-} d\bar{\mu}_{OH^-} \quad (6)$$

Считая, что электрический потенциал в объемной фазе не изменяется в процессе адсорбции ионов H^+ и OH^- , а также предполагая, что пришедшие к поверхности ионы всегда участвуют в кислотно-основном равновесии с соответствующей группой молекулы липида согласно уравнениям (2-4), мы можем записать:

$$-d\gamma = \Gamma_{L_aH} d \ln a_{H^+} - \Gamma_{L_bOH} d \ln a_{OH^-} \quad (7)$$

где $\Gamma_{L_aH} = K_1 \Gamma_{L_a} a_{H^+}$, $\Gamma_{L_bOH} = K_2 \Gamma_{L_b} a_{OH^-}$, а $\Gamma_{L_aH} + \Gamma_{L_a} = S$ и $\Gamma_{L_bOH} + \Gamma_{L_b} = S$, где S – это поверхностная концентрация липида. Таким образом, интегрируя уравнение (7) мы получим:

$$\gamma = -SRT \ln \left(\left(\frac{K_{a1}}{a_{H^+}} + I \right) \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a2}} + I \right) \right) + const \quad (8)$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура. Константу интегрирования выберем из условия, что в изоэлектрической точке, когда $a_{H^+} = \sqrt{K_{a1} K_{a2}}$, натяжение должно быть максимальным. В результате мы получим следующее выражение для натяжения липидного монослоя:

$$\gamma = \gamma_{\max} + 2SRT \ln \left(\sqrt{\frac{K_{a1}}{K_{a2}}} + I \right) - SRT \ln \left(\left(\frac{K_{a1}}{a_{H^+}} + I \right) \left(\frac{a_{H^+}}{K_{a2}} + I \right) \right) \quad (9)$$

Из данного уравнения следует теоретическая зависимость натяжения монослоя ДФФХ от рН водного раствора (см. Рис. 5, линия). Из нее следует, что адсорбция H^+ и OH^- ионов, участвующих в кислотно-основной диссоциации полярных групп липида, хорошо описывает изменение натяжения монослоя вблизи рК, однако, не может описать уменьшение натяжения, происходящее при рН от 4 до 7.

Известно, что у молекул ДФФХ холиновая группа, заряжаемая положительно, находится на самом краю полярной головки, а фосфатная группа, способная приобретать отрицательный заряд, находится ближе к углеводородному «хвосту». Однако при образовании контактирующей с водой мембраны из молекул этого липида (как и других фосфатидилхолинов) картина кардинально меняется: в бислое минус (фосфатная группа) оказывается расположенным снаружи, а плюс (холино-группа) смещается в сторону углеводородных «хвостов», углубляясь внутрь мембраны за счет изменения конформации полярной головки (Dill and Stigter, 1988). На свойства слоя молекул липида также может оказывать влияние специфическая адсорбция ионов, находящихся в растворе. Недавно появилось большое количество работ, указывающих на значительную адсорбцию гидроксил-ионов на гидрофобных поверхностях (Beattie et al., 2005; Creux et al., 2007; Franks et al., 2005). Поэтому мы предположили, что, возможно, именно специфическая адсорбция OH^- ионов на поверхности мембраны может внести изменения в натяжение монослоя и бислоя.

В щелочной среде поверхность липидного бислоя заряжается отрицательно, благодаря диссоциации фосфатной группы, соответственно на рис. 6 в интервале рН от 9 до 10 наблюдается падение натяжения. При дальнейшем переходе в сторону нейтральной среды отрицательный заряд поверхности уменьшается, и натяжение растет согласно формуле (9), постепенно выходя на постоянное значение. Но снижение отрицательного заряда может способствовать усилению адсорбции OH^- -ионов вблизи холиновых групп ДФФХ благодаря сильному сродству этих ионов к гидрофобной фазе. Такая неэлектростатическая, т.е. специфическая адсорбция, по-видимому, ведет к зарядению поверхности

мембраны и, как следствие, к наблюдаемому при уменьшении рН от 7,5 до 5,5 снижению натяжения (см. Рис. 5).

При дальнейшем уменьшении рН от 5,5 до 3,5 начинается постепенный рост положительного заряда поверхности мембраны, обусловленный зарядением холино-групп, с одновременным падением концентрации ионов OH^- в растворе. Оба этих фактора снижают специфическую адсорбцию гидроксил-ионов, что приводит к возврату (росту) значений натяжения на расчетную кривую. Далее, при уменьшении рН ход кривой натяжения определяется ростом положительного заряда холино-группы и уже полностью соответствует уравнению (9).

С вышеописанной картиной согласуются и результаты измерения разности граничных потенциалов на мембранах, полученных по методу Мюллера-Рудина, при закислении раствора по одну сторону от них (см. Рис. 6). Рост граничного потенциала в области рН от 2 до 2,5 и от 10 до 11 соответствует сильному зарядению поверхности мембраны, отвечающему ионизации холиновой и фосфатной групп ДФФХ. По аналогии со стандартными кривыми титрования, средняя часть участков резкого увеличения потенциала отвечает 50% ионизации соответствующих групп, т.е. значению рК этих групп. Соответствующие значения рК составляют 2,1 и 10,5, что полностью отвечает литературным данным (Матинян и Абидор, 1984). Необходимо отметить, что изменение потенциала при ионизации холиновой группы в пять раз меньше, чем при ионизации фосфатной. Этот эффект может объясняться сильной экранировкой холиновой группы в молекуле ДФФХ.

Что же касается области рН от 3,5 до 7,5, где наблюдалось значительное снижение натяжения липидного монослоя, то разность граничных потенциалов на мембране ведет себя в этой области следующим образом (см. Рис. 7).

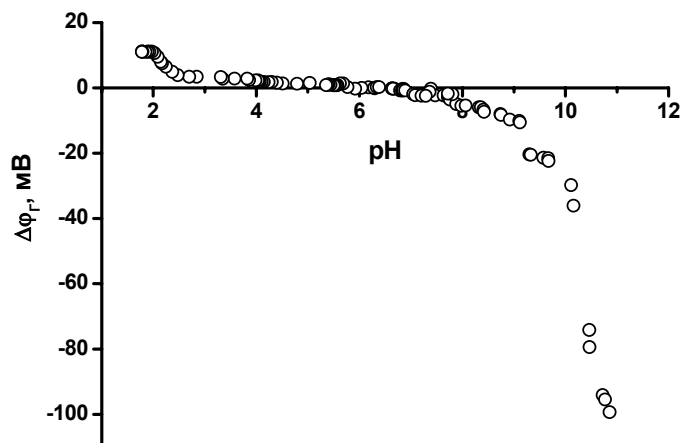


Рисунок 6. Зависимость разности граничных потенциалов на мембране, от pH раствора электролита. Концентрация электролита (KCl) составляла 100 мМ.

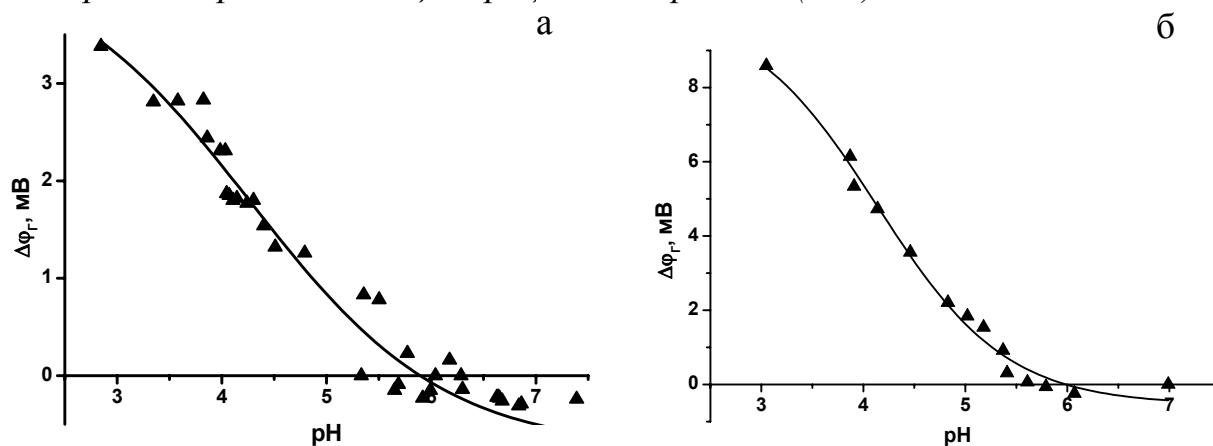


Рисунок 7. Зависимость разности граничных потенциалов на мембране, сформированной из раствора ДФФХ в декане, от pH раствора электролита. Концентрация электролита составляла: а) 100 мМ KCl; б) 10 мМ KCl.

При падении концентрации ионов OH^- в растворе их специфическая адсорбция и обусловленный ею отрицательный заряд поверхности уменьшаются, в результате чего на кривой изменения граничного потенциала возникает дополнительный перегиб, аналогичный по форме тем, которые отражают ионизацию фосфатной и холиновой групп ДФФХ, но только меньший по амплитуде. Фактически, адсорбированные на мембране вблизи гидрофобных «хвостов» ионы OH^- ведут себя как некая новая ионизирующаяся группа. Кроме того, как было показано в работе (Zhou and Raphael, 2007), для фосфатидилхолиновых мембран дипольный скачок потенциала изменяется на 6,5 мВ пропорционально рОН. Таким образом, можно

предположить, что именно специфическая адсорбция гидроксил-ионов приводит к падению натяжения монослоя ДФФХ в диапазоне рН от 4 до 7.

Из экспериментальных данных о зависимости электрической емкости БЛМ, не содержащих растворитель, от рН водного раствора мы можем рассчитать высоту спонтанного поднятия одного монослоя липида по другому, происходившего в процессе формирования липидного бислоя (см. Рис. 8). Предположим, что верхняя граница частично «запрыгнувшего» монослоя является прямой. Тогда площадь соответствующего сегмента отверстия, занятого этим монослоем, можно записать в виде:

$$\frac{S}{R^2} = \pi - 2 \arccos \sqrt{\frac{h}{2R}} - \left(1 - \frac{h}{R}\right) \sqrt{\frac{2h}{R}} \sqrt{1 - \frac{h}{2R}} \quad (10)$$

где h - высота поднятия, R – радиус отверстия в перегородке. Значения площади мы можем рассчитать, зная величину удельной емкости БЛМ.

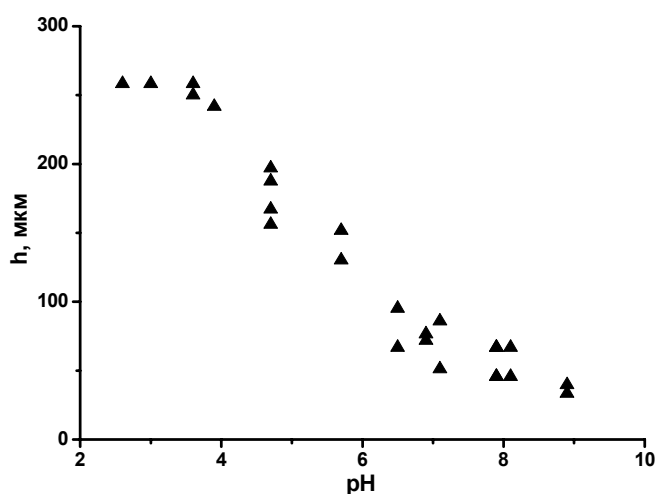


Рисунок 8. Рассчитанная из величин электрической емкости БЛМ рН-зависимость высоты спонтанного поднятия одного монослоя липида по другому, происходящего в процессе формирования мембраны.

Таким образом, обнаруженная нами зависимость высоты спонтанного поднятия одного монослоя липида по другому является, по всей видимости, следствием изменения краевого угла смачивания перегородки водным раствором с монослоем липида от рН среды, а также начальной высотой поднятия кромки жидкости у гидрофобной перегородки.

Исходя из полученных данных, мы можем рассчитать значения краевого угла смачивания на границе между липидными хвостами и натяжение липидного бислоя как функции от pH среды.

Формирование БЛМ методом сведения монослоев определяется балансом трех сил. Две из них равны по модулю натяжению липидного монослоя на поверхности воды, а третья соответствует натяжению бислоя. Рассчитанная зависимость последнего от pH в этом случае будет иметь вид (см. Рис. 9б).

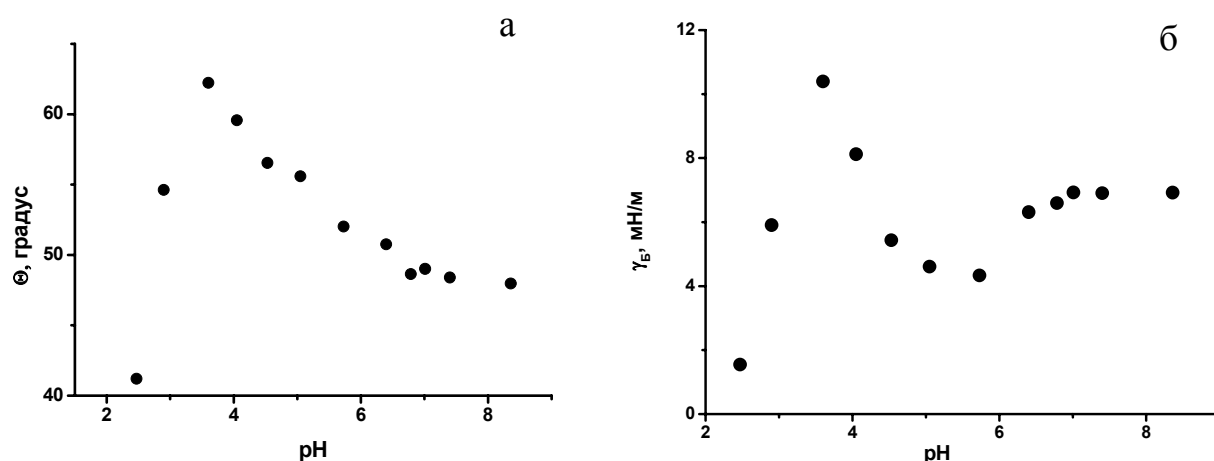


Рисунок 9. Рассчитанные по экспериментальным данным: а) pH-зависимость краевого угла смачивания (Θ) одного монослоя ДФФХ другим; б) Зависимость натяжения липидного бислоя от pH среды.

Полученные результаты находятся в хорошем соответствии с литературными данными по изменению натяжения БЛМ, сформированных по методу Мюллера-Рудина из раствора яичного фосфохолина, от pH водного раствора (Petelska and Figaszewski, 2000). Более высокие значения натяжения по сравнению с литературными данными являются следствием того, что наши мембраны не содержат растворитель и не имеют мениска с избытком липида.

БЛМ, не содержащие растворитель, на отверстиях в амфифобизированных стеклянных перегородках.

Формирование мембран на отверстиях в покровных стеклах с амфифобной поверхностью. Очевидно, что, несмотря на простоту предложенной методики гидрофобизации стеклянных перегородок для получения БЛМ, не содержащих

растворитель, проводить некоторые исследования на мембранах, площадь которых зависит от рН, может быть достаточно проблематично. Поэтому нам необходимо было создать покрытия с минимальной поверхностной энергией, чтобы краевой угол смачивания таких поверхностей был близок к 90 градусам. В этом случае изменение межфазного натяжения ДФФХ от рН среды не оказывало бы столь значительного влияния на процесс формирования мембран, не содержащих растворитель. Иными словами, кроме гидрофобных свойств покрытия должны обладать и липофобностью, т.е. быть амфифобными. Эти свойства определяются концевыми группами «пришитых» к стеклу молекул. Известно, что наименьшей поверхностной энергией обладает мономолекулярный слой CF_3 (6 мН/м в отличие от 18 мН/м для тефлона). Нами была разработана методика «пришивки» к поверхности стекла и последующей двумерной полимеризации молекул фторсодержащего силоксана (3,3,3 трифторпропил-триметоксисилана). Краевой угол смачивания полученных образцов чистой водой достигал 110 градусов. В присутствии моно слоя ДФФХ, этот угол падал примерно до 85 градусов, но уже не зависел от рН. На отверстиях в таких амфифобизированных стеклянных пластинках удалось получить устойчивые БЛМ, не содержащие растворитель, электрическая емкость которых не зависела от рН среды в диапазоне от 2,6 до 8,1, т.е. при любой кислотности мембраны полностью заполняли отверстия. Удельная емкость полученных мембран составляла $0,86 \text{ мкФ/см}^2 \pm 5\%$ (как на гидрофобных перегородках). Кроме того, в отличие от гидрофобизированных поверхностей, образование мембраны в этом случае происходило не спонтанно, а контролируемо, при постепенном «накатывании» одного моно слоя на другой, что позволило полностью «погрузить» мембрану под поверхность водного раствора.

Измерение натяжения БЛМ, не содержащих растворитель. Амфифобные поверхности позволили впервые непосредственно измерить натяжение БЛМ, не содержащих растворитель (Batishchev and Indenbom, 2008). Согласно уравнению Лапласа, перепад гидростатического давления по разные стороны мембраны обратно пропорционален ее радиусу кривизны с коэффициентом

пропорциональности, равным 2σ , где σ – это натяжение мембраны: $\Delta P = \frac{2\sigma}{R}$.

Определить значение радиуса кривизны выдутой мембраны стандартными оптическими методами представляется достаточно затруднительным из-за малости размера мембраны и особенностей строения экспериментальной ячейки. Поэтому его значение вычислялось из величины электрической емкости мембраны. Процедура вычисления была следующей. Площадь поверхности выдутой мембраны задается простым геометрическим соотношением:

$$S = 2\pi R(R - \sqrt{R^2 - r^2}) \quad (11)$$

где r – это радиус отверстия, на котором была сформирована бислоидная липидная мембрана. Предполагается, что мембрана может быть выдута только до формы полусферы. Так как наши БЛМ не содержат растворителя, мы будем считать, что радиус отверстия соответствует радиусу плоской мембраны. Тогда

$$R = \frac{S}{2\pi\sqrt{\frac{S}{\pi} - r^2}} \quad (12)$$

Площадь мембраны связана с ее электрической емкостью по следующей формуле: $S = \frac{C}{C_0}\pi r^2$, где C_0 – это емкость плоской БЛМ. Отсюда мы получаем, что электрическая емкость БЛМ будет иметь следующий вид:

$$C = \frac{4\sigma}{r^2(\Delta P)^2} (2\sigma - \sqrt{4\sigma^2 - r^2(\Delta P)^2}) \cdot C_0 \quad (13)$$

Как было показано в экспериментах по измерению натяжения мембран, их электрическая емкость увеличивалась в полтора раза при перепаде гидростатического давления в 74 ± 3 Па (смотри рисунок 10а). Столь значительное увеличение площади мембраны могло быть, по-видимому, обусловлено наличием избытка липида в области границы бислоя. Экспериментальные данные экстраполировались полиномом второй степени, и емкость плоской мембраны определялась по минимуму кривой. Она составила 69 пФ. Это значение отличается от начальной емкости мембраны (66 пФ) менее чем на 5%, поэтому можно считать,

что изначально мембрана была плоской. Используя уравнение (13) и значение C_0 , мы можем оценить натяжение мембран.

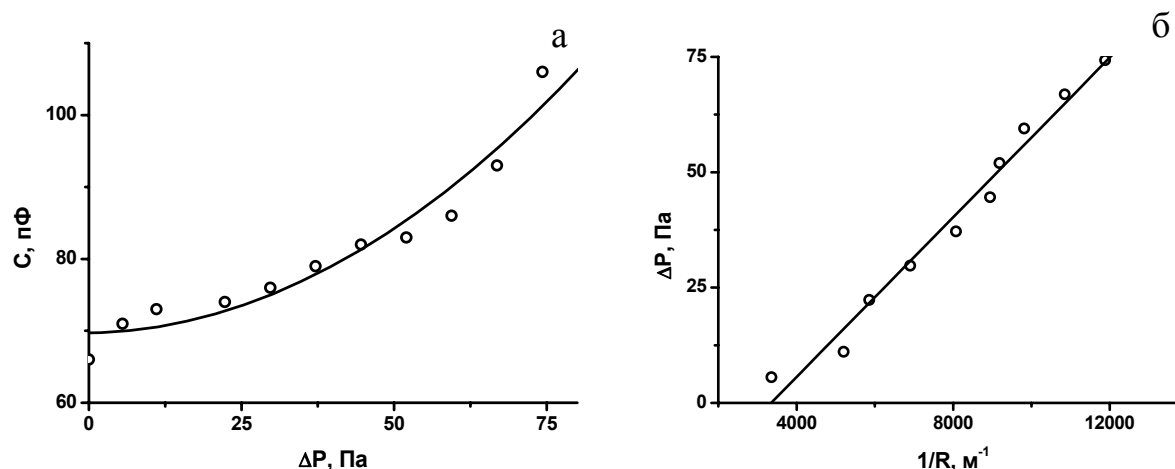


Рисунок 10. а) Зависимость электрической емкости БЛМ от перепада гидростатического давления. б) Зависимость перепада гидростатического давления от обратного радиуса кривизны выдутой БЛМ. Диаметр отверстия составлял 100 мкм. рН = 5,8.

По линейной экстраполяции экспериментальных данных, приведенных на рисунке 10б, натяжение мембраны было оценено как $\sigma = 4,3 \pm 0,4$ мН/м. Это значение выше, чем для БЛМ, содержащих растворитель (3,4 мН/м) (Coster and Simons, 1968), и практически совпадает с величиной, рассчитанной для такого же значения рН по результатам совершенно других измерений (см. Рис. 9б).

Измерение линейного натяжения кромки пор в БЛМ, не содержащих растворитель. Важным параметром, характеризующим свойства БЛМ, является величина линейного натяжения кромки пор, образующихся при электропорации мембран. Изменение свободной энергии липидной мембраны при образовании в ней сквозной поры радиусом r определяется по формуле (Чизмаджев и др., 1982):

$$\Delta E = 2\pi r\gamma - \pi r^2\sigma - \pi r^2 C_{уд} \left(\frac{\epsilon_v}{\epsilon_m} - 1 \right) \frac{U^2}{2} \quad (14)$$

где σ – это поверхностное натяжение мембраны, γ – линейное натяжение кромки поры, $C_{уд}$ – удельная емкость мембраны, ϵ_v – диэлектрическая проницаемость воды, ϵ_m – диэлектрическая проницаемость мембраны, U – величина

приложенной к мембране разности потенциалов. Величина энергетического барьера, соответствующего критическому радиусу поры, определяется по формуле:

$$E_{кр.} = \frac{\pi\gamma^2}{\sigma + C_{уд.} \left(\frac{\varepsilon_{\theta} - 1}{\varepsilon_m} \right) \frac{U^2}{2}} \quad (15)$$

Таким образом, мембрана рассматривается как метастабильная система, разрушение которой происходит за счет роста дефектов – гидрофильных пор. Выражение для среднего времени жизни БЛМ имеет вид (Чизмаджев и др., 1982):

$$\bar{t} = \frac{(kT)^{3/2}}{4\pi c_0 AD\gamma \sqrt{\sigma + C_{уд.} \left(\frac{\varepsilon_{\theta} - 1}{\varepsilon_m} \right) \frac{U^2}{2}}} \exp \left(\frac{\pi\gamma^2}{kT \left(\sigma + C_{уд.} \left(\frac{\varepsilon_{\theta} - 1}{\varepsilon_m} \right) \frac{U^2}{2} \right)} \right) \quad (16)$$

где c_0 – средняя концентрация дефектов на единицу площади мембраны, A – площадь БЛМ. Аппроксимируя экспериментальные данные (см. Рис. 11) уравнением (16), мы определили величину линейного натяжения кромки пор в БЛМ, не содержащих растворитель, составляющую $11,8 \pm 0,2$ пН. Это значение практически совпадает с литературными данными о линейном натяжении кромки поры в липосомах (Evans et al., 2003), и несколько выше значений, полученных для мембран с растворителем (Чизмаджев и др., 1982).

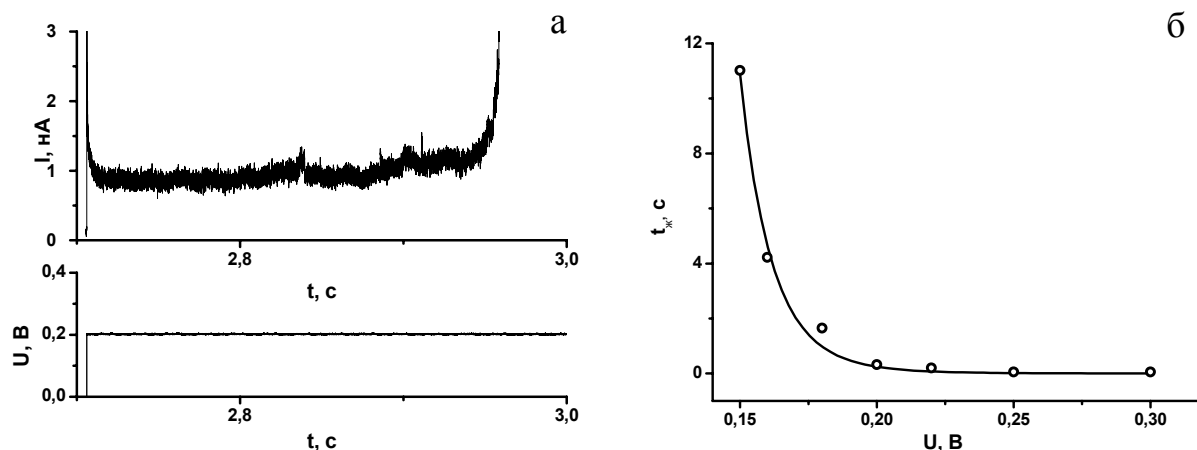


Рисунок 11. а) Характерный вид зависимости токового отклика (сверху) БЛМ, не содержащей растворитель, на приложенную ступеньку напряжения (снизу). б) Зависимость среднего времени жизни мембраны от величины приложенного напряжения. Каждая точка отвечает усредненному по 10 экспериментам значению среднего времени жизни БЛМ. Сплошная линия соответствует аппроксимации экспериментальных данных уравнением (16).

ВЫВОДЫ

1. Были разработаны методики химической модификации поверхностей стеклянных пластинок, позволившие получить на отверстиях в них устойчивые БЛМ, не содержащие растворитель. Бислойная природа таких мембран была доказана по росту проводимости в присутствии нистатина и грамицидина.

2. Удельная электрическая емкость таких мембран составила $0,86 \text{ мкФ/см}^2 \pm 5\%$ - выше, чем у мембран, полученных классическим методом Монтала ($0,8 \text{ мкФ/см}^2$).

3. Было обнаружено изменение натяжения монослоя ДФФХ на границе вода-воздух в изоэлектрической области в зависимости от рН среды, зафиксированный по изменению краевых углов смачивания и электрической емкости мембран.

4. Предположено, что этот эффект обусловлен специфической адсорбцией OH^- -ионов. Это подтверждается измерениями разности граничных потенциалов.

5. Разработан метод расчета зависимости натяжения БЛМ от рН. Полученные результаты хорошо согласуются с прямыми экспериментальными измерениями.

6. С помощью методики создания амфифобных покрытий с низкой поверхностной энергией впервые было измерено латеральное натяжение БЛМ, не содержащих растворитель, а также исследован процесс электрического пробоя таких мембран, позволивший оценить величину их линейного натяжения.

7. Измерения показали, что как латеральное натяжение полученных мембран ($4,3 \pm 0,4 \text{ мН/м}$), так и линейное натяжение кромок пор в этих мембранах ($11,8 \text{ пН} \pm 0,2 \text{ пН}$) выше, чем в классических БЛМ, содержащих растворитель.

Список публикаций.

1. Батищев О.В., Инденбом А.В. Формирование бислойных липидных мембран на отверстиях в гидрофобизированных стеклах.// Биол. мембраны – 2004. - Т. 21. - С. 415-419.
2. Батищев О.В., Инденбом А.В. Влияние рН на формирование липидных бислоев, не содержащих растворитель.// Электрохимия – 2006. - Т. 42. - №10. - С. 1230-1236.
3. Batishchev O.V., Indenbom A.V. Alkylated glass partition allows formation of solvent-free lipid bilayer by Montal–Mueller technique.// Bioelectrochemistry – 2008. - doi:10.1016/j.bioelechem.2008.02.002.