

УДК 532.634

УСТОЙЧИВОСТЬ БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ В ПРИСУТСТВИИ Со-СОДЕРЖАЩИХ МЕТАЛЛОПОРФИРИНОВ

В.Б. АРАКЕЛЯН¹, А.Л. ТОРОСЯН^{1*}, Р.К. КАЗАРЯН²

¹Ереванский государственный университет, Армения

²Ереванский государственный медицинский университет, Армения

*e-mail: atorosyan@ysu.am

(Поступила в редакцию 23 апреля 2014 г.)

Исследована устойчивость бислойной липидной мембраны (БЛМ) в электрическом поле при наличии Со-порфирина в окружающем БЛМ растворе. Показано, что присутствие порфирина в растворе приводит к уменьшению как линейного натяжения кромки поры, так и поверхностного натяжения БЛМ, при этом увеличивается число пор на БЛМ. Показано также, что уменьшение устойчивости БЛМ в электрическом поле в присутствии порфирина происходит в результате уменьшения линейного натяжения кромки поры и увеличения числа пор.

1. Введение

Проблема устойчивости клеточных мембран занимает центральное место в мембранологии, поскольку потеря ее устойчивости немедленно приводит к гибели клетки [1-3]. Имеется широкий спектр факторов, приводящих к потере устойчивости мембран [4]. Среди них важное место занимает химически индуцированная неустойчивость мембран. Важность этого фактора связана с тем, что клеточная мембрана функционирует в окружении большого числа разнообразных низкомолекулярных веществ, адсорбция которых на мембрану может привести к потере ее устойчивости. По этой причине актуальными и важными являются исследования влияния различных химических агентов на устойчивость мембран, в особенности тех веществ и соединений, которые служат основой для изготовления лекарственных препаратов.

В настоящее время проводятся интенсивные исследования порфиринов и металлопорфиринов, которые обладают рядом уникальных свойств, что позволяет использовать их в качестве основы для изготовления лекарственных препаратов, в том числе и противоопухолевых [5,6]. Известно, что в зависимости от типа, порфирины могут адсорбироваться на поверхности мембраны, встраиваться в мембрану, проходить сквозь нее, что может повлиять на устойчивость мембраны. Прямое изучение влияния порфиринов на устойчивость клеточных мембран представляет весьма трудную задачу. Поэтому исследование влияния различных факторов, в том числе и порфиринов, на устойчивость мембран целесообразно проводить на модельных мембранах, каковыми являются бислойные липидные мембраны (БЛМ), как было показано в целом ряде публикаций

[7,8]. Эксперименты на БЛМ имеют целый ряд преимуществ по сравнению с экспериментами на клеточных мембранах. Их можно проводить в макроскопических условиях, имеется возможность контролировать и варьировать экспериментальные условия, а результаты легко интерпретируются.

В настоящей работе изучено влияние Со-порфирина на устойчивость БЛМ. Выбор этого порфирина продиктован тем, что в настоящее время Со-порфирин интенсивно исследуется в биомедицине в качестве противоопухолевого и противомикробного препарата [5].

2. Материалы и методы

Во всех экспериментах БЛМ формировались при комнатной температуре (20-25°C) в соответствии с методикой, описанной в [8], на отверстии с диаметром 1 мм в тефлоновой ячейке. Эксперименты проводились на БЛМ, полученных из фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина (1:1), которые были растворены в н-декане. Липиды были приобретены из “Avanti Polar Lipids”. Со-мезо-тетра-[4-N-(2-оксиэтил) пиридил] порфирины (CoTOEtPyP4) были синтезированы в отделе фармакологической химии в ЕГМУ. БЛМ формировались в растворе 0.1 М NaCl (pH 6.1). Влияние CoTOEtPyP4 на электрические параметры БЛМ было рассмотрено при концентрации порфирина 10^{-5} М.

Для измерений электрических параметров БЛМ использовался токовый усилитель Keithley 427 в соответствии с процедурой, описанной в [9]. Разность потенциалов на БЛМ подавалась с помощью хлорсеребряных электродов, которые были подключены к АЦП (E14-140-М) и контролировались компьютером. Диапазон подаваемой на БЛМ разности потенциалов был от 0.20 В до 0.55 В. Контроль геометрических параметров БЛМ проводился путем измерения электрической емкости БЛМ с помощью циклических вольт–амперных характеристик (ВАХ) с использованием компьютерной программы LabVIEW.

3. Результаты и обсуждение

Вначале были определены циклические ВАХ БЛМ, анализ которых позволяет определить проводимость и электрическую емкость БЛМ. Измерение емкости позволяет контролировать такие важные геометрические параметры БЛМ, как толщина и площадь БЛМ. Электрическая емкость БЛМ была измерена путем применения симметричного треугольного напряжения со скоростью развертки 0.2 В/с [10]. Из анализа ВАХ в отсутствие порфирина для электрической емкости и проводимости БЛМ были получены соответственно значения 2.1 нФ и 0.8×10^{-9} ом⁻¹, а в присутствии порфирина – 2.85 нФ и 2.1×10^{-9} ом⁻¹. Эти измерения позволили оценить толщину БЛМ, которая во всех экспериментах составляла 40-50 Å, что соответствует литературным данным [7], а оценка диаметра БЛМ составила 0.82-0.95 мм. Измеренные значения удельной проводимости и удельной электрической емкости БЛМ для случая отсутствия порфирина хорошо согласуются с литературными данными: $g_0 = 1.25 \times 10^{-7}$ ом⁻¹ см⁻², $C_0 = 0.33$ мкФ см⁻² [9,11].

Далее была исследована устойчивость БЛМ в электрическом поле. В качестве параметра, характеризующего степень устойчивости БЛМ, как это при-

нято в литературе, взято среднее время жизни БЛМ при заданных значениях разности потенциалов на БЛМ [12,13]. В работах [12,13] развита теория устойчивости БЛМ, согласно которой потеря устойчивости БЛМ в электрическом поле связана с образованием сквозных гидрофильных пор [12,13]. Поры в БЛМ образуются спонтанно, а затем в результате случайного изменения их размеров достигают некоторого критического размера, после чего и происходит потеря устойчивости БЛМ. Было исследовано изменение среднего времени жизни БЛМ в зависимости от увеличения разности потенциалов в отсутствие порфирина (рис.1, кривая 1).

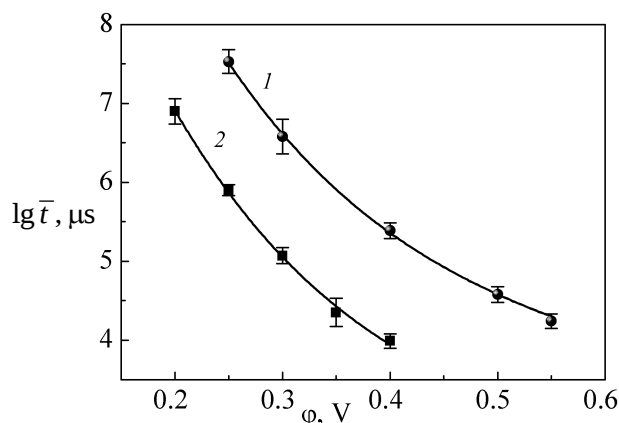


Рис.1. Уменьшение среднего времени жизни БЛМ при увеличении разности потенциалов: 1 – при отсутствии порфирина, 2 – при присутствии CoTOEtPyP4 порфирина в концентрации 10^{-5} М. Точки – экспериментальные данные (среднее из 5 измерений при каждой разности потенциалов), сплошные линии – теоретические кривые, полученные по формуле (2) методом наименьших квадратов.

Детальный анализ зависимости среднего времени жизни БЛМ $\bar{t}$ от разности потенциалов ϕ проведем с использованием теоретической зависимости $\bar{t}(\phi)$, полученной в работах [12,13]:

$$\bar{t} = \frac{(k_B T)^{3/2}}{4\pi D C_0 S \gamma (\sigma + C \phi^2 / 2)^{1/2}} \exp \left(\frac{\pi \gamma^2}{(\sigma + C \phi^2 / 2) k_B T} \right), \quad (1)$$

где σ – поверхностное натяжение БЛМ, γ – линейное натяжение кромки поры в БЛМ, D – коэффициент диффузии дефектов в пространстве радиусов, ϕ – разность потенциалов на мембране, k_B – постоянная Больцмана, T – температура, C_0 – концентрация пор на БЛМ и S – площадь БЛМ. C – приведенная электрическая емкость, которая определяется соотношением $C = C_0 (\epsilon_w / \epsilon_m - 1)$, где $C_0 = \epsilon_0 \epsilon_m / h$ – удельная электрическая емкость БЛМ; ϵ_w – диэлектрическая проницаемость воды; ϵ_m – диэлектрическая проницаемость БЛМ; ϵ_0 – диэлектрическая постоянная. Сопоставив теоретическую кривую (1) с экспериментальными точками на рис.1, можно определить значения поверхностного натя-

жения БЛМ и линейного натяжения кромки поры в БЛМ, от которых, в основном, зависит устойчивость БЛМ. С этой целью перепишем формулу (1) в виде:

$$\lg \bar{t} = A - \frac{1}{2} \lg(1 + M\varphi^2) + \frac{B}{1 + M\varphi^2}, \quad (2)$$

$$A = \lg \left(\frac{(k_B T)^{3/2}}{4\pi D c_0 S \gamma \sigma^{1/2}} \right), \quad B = \frac{\pi \gamma^2 \lg e}{\sigma k_B T}, \quad M = \frac{C}{2\sigma}.$$

На рис.1 кривая 1 получена методом наименьших квадратов, что позволяет определить значения параметров A , B и M , а следовательно, и значения σ и γ . Исследовано изменение среднего времени жизни БЛМ в зависимости от увеличения разности потенциалов в присутствии СоТОЕтРyP4 порфирина в концентрации 10^{-5} М (рис.1, кривая 2). Для этого случая методом наименьших квадратов проведена кривая 2 на рис.1 и определены значения параметров A , B и M . В результате сопоставления теоретических кривых с экспериментальными точками были определены параметры A , B и M : $A = 3.33$, $B = 9.79$, $M = 19.95$ для кривой 1 и $A = 2.30$, $B = 8.96$, $M = 22.18$ для кривой 2. Полученные значения A , B и M позволяют по формулам (2) определить σ , γ , Dc_0S . Вначале вычисляется приведенная электрическая емкость C БЛМ, а затем значение поверхностного натяжения БЛМ в отсутствие порфирина, которая равна $\sigma = 3.3 \times 10^{-3}$ Н/м. Эта величина хорошо согласуется с литературными данными [14,15]. В присутствии порфирина получаем $\sigma = 2.9 \times 10^{-3}$ Н/м, что ниже, чем поверхностное натяжение БЛМ в отсутствие порфирина.

Анализ выражения (1) показывает, что уменьшение только поверхностного натяжения должно было привести к увеличению среднего времени жизни БЛМ. Используя значение σ , легко можно получить значение линейного натяжения кромки поры в БЛМ, которое равно $\gamma = 9.87 \times 10^{-12}$ Н. Эта величина также хорошо согласуется с литературными данными [14,15]. В присутствии порфирина $\gamma = 8.85 \times 10^{-12}$ Н, что несколько ниже, чем γ для БЛМ в отсутствие порфирина. Анализ выражения (1) показывает, что уменьшение только линейного натяжения должно было привести к уменьшению среднего времени жизни БЛМ. Зная значения σ и γ , можно вычислить значения Dc_0S в отсутствие порфирина – 1.83×10^{-22} м²/с и в присутствии порфирина – 2.18×10^{-21} м²/с. Полученное значение c_0SD хорошо согласуется с литературными данными [15]. Параметр c_0SD увеличивается в присутствии порфирина.

Заметим, что коэффициент диффузии поры в пространстве радиусов D связан с переориентацией фосфолипидных молекул вблизи кромки поры. Количество молекул фосфолипида на кромке поры мало по сравнению с количеством молекул фосфолипида, расположенных вне поры. По этой причине число адсорбированных молекул порфирина на кромке поры можно считать также малым. Поэтому можем принять что коэффициент диффузии поры в пространстве радиусов D практически не зависит от концентрации порфирина. В этом случае все изменения параметра c_0SD при наличии порфирина в растворе можно отнести за счет изменения числа пор $n = c_0S$ на БЛМ. В нашем случае наличие порфирина в растворе приводит к увеличению числа пор на БЛМ более, чем на порядок.

4. Заключение

Таким образом, полученные в данной работе результаты указывают, что наличие порфирина в растворе приводит к уменьшению как линейного натяжения кромки поры, так и поверхностного натяжения БЛМ, а также к увеличению числа пор на БЛМ. Уменьшение устойчивости БЛМ при наличии порфирина в растворе происходит в результате уменьшения линейного натяжения кромки поры и увеличения числа пор. Хотя уменьшение поверхностного натяжения БЛМ приводит к увеличению устойчивости БЛМ, однако, поскольку зависимость среднего времени жизни БЛМ от поверхностного натяжения более слабая, чем от линейного натяжения, то их суммарное уменьшение приводит к уменьшению среднего времени жизни БЛМ, что и наблюдается на эксперименте.

Работа выполнена в рамках гранта ГКН РА № 13-1F127.

ЛИТЕРАТУРА

1. L.V. Chernomordik, S.I. Sukharev, S.V. Popov, V.F. Pastushenko, A.V. Sokirko, I.G. Abidor, Y.A. Chizmadzhev. *Biochimica et Biophysica Acta*, **902**, 360 (1987).
2. I.G. Abidor, V.B. Arakelian, V.F. Pastushenko, et. al. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **6**, 37 (1979).
3. P. Kramar, D. Miklavcic, A.M. Lebar. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, **8**, 132 (2009).
4. H.K. Gevorgyan. *Proc. of the Yerevan State University, Physical and Mathematical Sciences*, **1**, 64 (2010).
5. A.G. Tovmasyan, N.S. Babayan, L.A. Sahakyan, et al. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **12**, 1100 (2008).
6. M. Placido, E. Scamporrino, D. Vitalini. *Macromol. Rapid Commun.*, **23**, 681 (2002).
7. R. Fettiplace, D.M. Andrews, D.A. Haydon. *J. Membrane Biol.*, **5**, 277 (1971).
8. P. Mueller, D. Rudin, H. Tien, W. Wescott. *J. Phys. Chem.*, **67**, 534 (1963).
9. L. Gu, I. Wang, J. Xun, A. Ottova-Leitmannova, H.T. Tien. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **39**, 275 (1996).
10. J. Kutnik, H.T. Tien. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **16**, 435 (1986).
11. O. Alvares, R. Latorre. *Biophys. J.*, **21**, 1 (1978).
12. И.Г. Абидор, В.Б. Аракелян, В.Ф. Пастушенко, М.Р. Тарасевич, Л.В. Черномордик, Ю.А. Чизмаджев. *ДАН СССР*, **240**, 733 (1978).
13. И.Г. Абидор, В.Б. Аракелян, В.Ф. Пастушенко, Л.В. Черномордик, Ю.А. Чизмаджев. *ДАН СССР*, **245**, 1239 (1979).
14. Л.В. Черномордик, Г.Б. Меликян, Ю.А. Чизмаджев. *Биологические мембраны*, **4**, 117 (1987).
15. А.В. Соколов. Изучение воздействия продуктов зрительного цикла на бислойные липидные мембраны. Автореферат кандидатской диссертации, М., 2009.

ԵՐԿՇԵՐՏ ԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ԹԱՂԱՆԹԻ ԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅՈՒՆԸ Co-ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ
ՄԵՏԱՂԱՊՈՂՖԻՐԻՆԻ ԱՌԿԱՅՈՒԹՅԱՆ ԴԵՊԶՈՒՄ
Վ.Բ. ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ, Ա.Լ. ԹՈՐՈՍՅԱՆ, Ռ.Կ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրված է երկշերտ լիպիդային թաղանթի (ԵԼԹ) կայունությունն էլեկտրական դաշտում Co-մետաղապորֆիրինի առկայության դեպքում: Ցույց է տրված, որ լուծույթում

պորֆիրինի առկայությունը նվազեցնում է ԵԼԹ-ի ծակոտիների եզրերի գծային լարվածությունը, ԵԼԹ-ի մակերևութային լարվածությունը և մեծացնում ծակոտիների քանակը ԵԼԹ-ի վրա: Ցույց է տրված նաև, որ էլեկտրական դաշտում պորֆիրինների առկայության դեպքում կայունության նվազումը արդյունքն է ԵԼԹ-ի ծակոտիների եզրերի գծային լարվածության նվազման և ծակոտիների թվի մեծացման:

STABILITY OF BILAYER LIPID MEMBRANE IN THE PRESENCE OF Co-CONTAINING METALLOPORPHYRINS

V.B. ARAKELYAN, A.L. TOROSYAN, R.K. GHAZARYAN

Stability of bilayer lipid membrane (BLM) in an electric field in the presence of Co-porphyrin in the surrounding BLM solution is investigated. We have shown that the presence of porphyrin in a solution reduces line tension of the pore edge and surface tension of BLM and increases the number of pores on the BLM. It is also shown that a decrease in the stability of BLM in the electric field in the presence of the porphyrin is a result of the reduction of line tension of the pore edge and increase in the number of pores.