

СОСТОЯНИЯ ЛИПИДНЫХ ПОР В БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ ПРИ ФАЗОВОМ ПЕРЕХОДЕ В РАСТВОРЕ LiCl С ДОБАВЛЕНИЕМ МОЛЕКУЛ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

© 2015 г. А.А. Аносов* **, М.С. Куприянова**, О.Ю. Немченко**, В.П. Норик**,
Е.В. Сергеенко**, Е.Ю. Смирнова**

**Институт радиотехники и электроники РАН им. В.А. Котельникова,
125009, Москва, ГСП-3, ул. Моховая, 11;*

***Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
119992, Москва, ул. Б. Пироговская, 2/6*

E-mail: anosov@hotmail.ru

Поступила в редакцию 08.04.14 г.

Экспериментально исследована статистика времен открытого и закрытого состояний липидных пор в плоских бислойных липидных мембранах из дипальмитоилфосфатидилхолина при температуре фазового перехода в 1 М растворе LiCl при добавлении водорастворимых молекул полиэтиленгликоля различной молекулярной массы. Измерены трансмембранные импульсы тока в режиме фиксации напряжения (50 мВ). Гистограмма длительности импульсов и гистограмма межимпульсных интервалов имеют не экспоненциальный характер, а выраженный характерный максимум. Это означает, что регистрируемая в условиях фазового перехода последовательность импульсов трансмембранного тока является зависимой: появление новых импульсов зависит от того, когда возникали предыдущие; момент окончания импульса зависит от момента его начала. Предложенная модель Эрланга достаточно точно аппроксимирует экспериментальные гистограммы. Следуя модели, можно говорить о том, что липидная пора имеет несколько открытых и закрытых состояний.

Ключевые слова: фазовый переход, время жизни поры, межимпульсный интервал, бислойная липидная мембрана, ПЭГ.

Авторы исследований липидных пор, возникающих при различных физических и химических воздействиях на бислои, отмечают аналогию между липидными и белковыми ионными каналами и делают предположения, что некоторые свойства мембран, традиционно приписываемые белковым ионным каналам, могут быть связаны с липидной частью этих мембран. Например, регистрируемые токи сквозь липидные поры, возникающие при фазовых переходах гель–жидкокристаллическое состояние [1–5], под действием электрического поля (при обратимом пробое) [6] имеют ярко выраженный дискретный характер, как и токи, протекающие через белковые ионные каналы, а также похожие значения амплитуд и времен открытых состояний (миллисекундный диапазон).

Известно, что в точке фазового перехода липидов резко возрастает проницаемость мембраны и происходит увеличение электрической

проводимости, что не кажется удивительным. Удивительно, что это увеличение проницаемости приводит к появлению отчетливо выраженных дискретных импульсов тока, которое связывается с появлением в липидном бислое гидрофильных пор. Появление аналогичных дискретных скачков тока вызывается также наложением электрического поля [6]. Амплитуды скачков проводимости измерены на большом количестве мембран из разных липидов и составляют от 10 пСм [3] до 20 нСм [7]. Что касается кинетических характеристик, то законы распределения времен открытых и закрытых состояний мало изучены, и до сих пор нет убедительного объяснения ярко выраженного дискретного характера этих скачков. Путь к объяснению лежит в изучении статистики времен открытого и закрытого состояний предполагаемого липидного канала-поры.

Кинетические характеристики пор (токовых скачков), возникающих в липидном бислое под действием кратковременных электрических импульсов, рассматривались в работе [6]. Характер наблюдаемых флуктуаций позволил авторам

Сокращения: ПЭГ – полиэтиленгликоль, ДПФХ – дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин.

предположить, что открытие и закрытие пор проходит через некоторое «электрически невидимое» активированное промежуточное состояние, названное авторами «препора». В работе [4] изучалось распределение времен открытых и закрытых состояний липидных пор, возникающих в липидном бислое при фазовом переходе и электропорации. Отмечается неэкспоненциальное распределение этих времен, на основании анализа предполагается наличие нескольких промежуточных, электрически невидимых состояний липидной поры.

В двух упомянутых работах общим подходом является использование статистического анализа временных записей трансмембранного тока при постоянном напряжении на мембране. При этом по записям невозможно отличить интактный бислой от бислоя в квазидооткрытом (препора) или квазидооткрытом состоянии: уровень тока не меняется. Выводы о наличии таких состояний пор сделаны на основе анализа распределений времен жизни пор в открытом и закрытом состояниях.

В этой работе мы также будем придерживаться предлагаемого подхода. Мы будем рассматривать статистику времен открытого и закрытого состояний предполагаемых липидных каналов-пор, возникающих при фазовом переходе в присутствии водорастворимых полимеров полиэтиленгликоля (ПЭГ). В области фазового перехода часто наблюдаются состояния с несколькими каналами. Анализ таких записей с точки зрения длительностей проблематичен. Ранее мы показали, что наличие ПЭГ определенным образом стабилизирует мембрану в условиях фазового перехода, скачки тока редки и практически не наблюдаются двойных и тройных скачков [7,8]. В этих работах мы исследовали распределения амплитуд импульсов тока, определяемых размерами липидных пор, возникающих при фазовом переходе в плоском бислое. Целью настоящего исследования является анализ временных характеристик импульсов тока: распределение времени жизни поры в открытом и закрытом состояниях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Липиды, ПЭГ, электролиты. Для изготовления плоских бислоевых липидных мембран использовался 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) (Avanti Polar Lipids, Alabaster). В качестве омывающего раствора электролита использовался водный раствор 1М LiCl (рН 6,9). В раствор добавляли глицерин и полимеры ПЭГ-300, ПЭГ-600, ПЭГ-6000 и ПЭГ-20000 (Sigma, США).

Плоские бислоевые липидные мембраны формировали по методу Мюллера и др. [9] на отверстиях в стенке тefлонового стаканчика площадью 1 мм². Мембраноформирующий раствор содержал 25 мг ДПФХ в смеси декан-хлороформ-метанол (7:2:1 по объему).

Электрические измерения. Трансмембранный ток регистрировали с помощью пары Ag-AgCl-электродов, помещенных в раствор электролита по обе стороны мембраны в режиме фиксации напряжения, равного 50 мВ, с помощью прибора для измерения малых токов (Пушино, Россия). Флуктуации тока записывали с помощью аналого-цифрового преобразователя (частота дискретизации 80 Гц). Детали измерений описаны ранее [2,10].

Схема опыта. Плоские бислоевые липидные мембраны формировали при температуре 50°C (выше температуры фазового перехода ДПФХ), после чего температуру в кювете снижали со скоростью 0,5°C в минуту. Записывали флуктуации тока, возникающие в области температуры основного фазового перехода. Мембраны формировали в растворе 1 М LiCl, содержащем 20% соответствующего ПЭГ (по весу). Измерения проводили в симметричных условиях.

Модель. Гистограммы плотности относительных частот для времени жизни поры и для межимпульсного интервала приближали распределением Эрланга [11]:

$$f(t) = t^{k-1} \exp\left(-\frac{t}{\theta}\right) / \theta^k (k-1)!, \quad (1)$$

где параметр k показывает количество случайных процессов, следующих один за другим, пока не происходит интересующее нас событие, а θ – среднее время, характеризующее протекание одного процесса; в модели Эрланга длительности процессов считаются одинаковыми. Среднее значение с помощью параметров Эрланга определяется по формуле:

$$\text{mean} = k\theta, \quad (2)$$

а среднеквадратическое отклонение – по формуле:

$$\text{std} = \sqrt{k} \theta. \quad (3)$$

Отметим, что распределение Эрланга используется при обработке временных характеристик молекулярных процессов. Например, в работе [12] с помощью силовой спектроскопии исследовали разворачивание молекулы титинкиназы. Измеренную гистограмму времени разворачивания молекулярной структуры приближали распределением Эрланга.

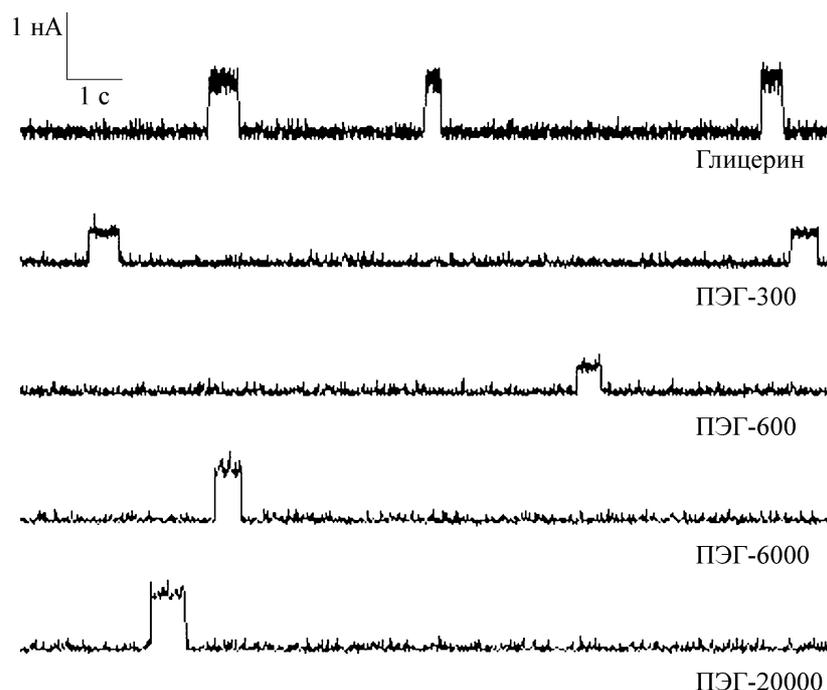


Рис. 1. Флуктуации тока, записанные в режиме фиксированного напряжения 50 мВ, в бислойных липидных мембранах из ДПФХ в 1 М LiCl при добавлении глицерина и ПЭГ различных молекулярных масс. Записи получены при температуре фазового перехода ДПФХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные, представленные на рис. 1, получены в опытах с бислойными липидными мембранами из ДПФХ, сформированными в 1 М водном растворе LiCl при добавлении ПЭГ возрастающей молекулярной массы. Записи получены при температуре фазового перехода ДПФХ. В условиях эксперимента температура мембраны постепенно снижалась, и время нахождения в состоянии фазового перехода составляло около 2 мин. На рис. 1 приведены записи тока в течение 20 с. На каждой из них видны импуль-

сы, которые соответствуют появлению пор. Анализ амплитуд импульсов, зависящих от массы ПЭГ в растворе, проведен в работах [2,7,8]. В данной работе мы исследовали временные характеристики последовательности импульсов, а именно время нахождения поры в открытом состоянии и длительность межимпульсного интервала. Полученные данные для разных ПЭГ и глицерина приведены в таблице. Всего наблюдали 328 пор в 72 мембранах, при этом получили 256 межимпульсных интервалов: количество интервалов, зарегистрированных в одной мембране, равно количеству пор в мем-

Влияние ПЭГ на временные характеристики последовательности импульсов

	Глицерин	ПЭГ-300	ПЭГ-600	ПЭГ-6000	ПЭГ-20000	Сумма	Среднее
Число мембран	13	24	7	25	3	72	
Число пор	49	96	28	143	12	328	
Среднее число пор на одной мембране	3,8	4	4	5,7	4		4,3 ± 0,8
Количество межимпульсных интервалов	36	72	21	118	9	256	
Время жизни, с	0,8 ± 0,7	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2		0,5 ± 0,2
Межимпульсный интервал, с	18 ± 9	25 ± 10	22 ± 5	19 ± 6	24 ± 10		21 ± 8
Время релаксации (минимум), с	68	100	88	108	96		92 ± 15

Примечание. Бислойные липидные мембраны из ДПФХ находились в 1 М LiCl, pH 6,9, при температуре фазового перехода. ПЭГ добавляли симметрично в концентрации 20% (по весу).

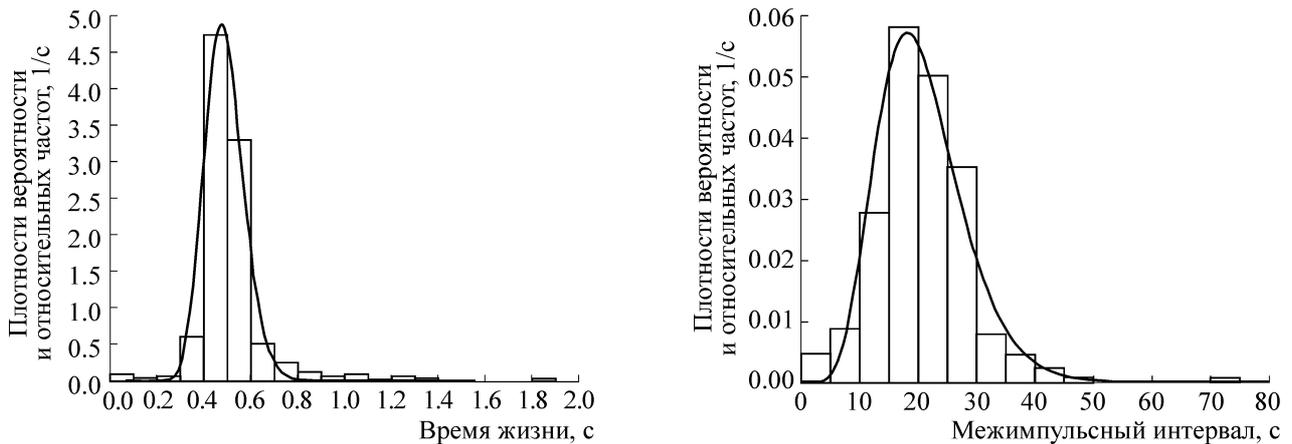


Рис. 2. Экспериментальные гистограммы и рассчитанные распределения Эрланга для времени жизни пор в открытом состоянии (параметры распределения: $k = 35$, $\theta = 0,014$ с) (а) и межимпульсных интервалов ($k = 8$, $\theta = 2,6$ с) (б).

бране минус единица. Среднее количество пор, приходящееся на одну мембрану, составило $4,3 \pm 0,8$. Если учесть среднее значение межимпульсного интервала 21 ± 8 с, то получается, что поры возникали в течение приблизительно 1,5 мин, пока мембрана была в состоянии фазового перехода. За это время температура снижалась на $0,75^\circ\text{C}$. Если сравнить средние времена жизни поры в открытом состоянии и значения межимпульсных интервалов для глицерина и разных ПЭГ, то видно, что различия, полученные в разных растворах, находятся в диапазоне погрешности измерений. Это дало нам основание объединить все данные в одну выборку. Данные в последней строке таблицы (время релаксации) получены умножением среднего количества пор, наблюдаемых на одной мембране, на величину межимпульсного интервала.

На рис. 2 представлены экспериментальные гистограммы времени жизни пор и межимпульсного интервала. Полученные в результате стандартной статистической обработки средние значения \pm среднеквадратические отклонения составили: для времени жизни $0,52 \pm 0,16$ с, для межимпульсного интервала $21,1 \pm 8,4$ с. Из рис. 2 видно, что распределения не являются экспоненциальными, а имеют характерные максимумы. Это говорит о том, что «заккрытие» поры не является независимым от «открытия» поры событием, а происходит в результате воздействия нескольких случайных факторов. Если число таких воздействий велико, распределение приближается к нормальному, для конечного числа состояний наблюдается распределение Эрланга. Аналогично, возникновение нового импульса («открытие» поры) зависит от дли-

тельности межимпульсного интервала. Вид гистограмм позволяет использовать для их аппроксимации распределение Эрланга (1). Гистограмму времени жизни (межимпульсных интервалов) мы приближали используя значения параметров: $k = 35$ и $\theta = 0,014$ с ($k = 8$, $\theta = 2,6$ с). Полученные по формулам (2) и (3) средние значение \pm среднеквадратическое отклонение для времени жизни (межимпульсного интервала) составили $0,49 \pm 0,08$ с ($20,8 \pm 7,4$ с) соответственно. Данные, полученные путем стандартной статистической обработки и с использованием приближенного распределения Эрланга, практически совпадают: максимальное отличие составляет 12%. Исключением является среднеквадратическое отклонение для времени жизни. Здесь данные (0,16 и 0,08 с) различаются в два раза. Причина – в существовании подмножества (составляющего 2% от всей выборки) «долгоживущих» пор, время жизни которых превышает 1 с. Если исключить их из статистического расчета, то среднеквадратическое отклонение составит 0,11 с, что отличается от рассчитанного по распределению Эрланга приблизительно на 30%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные данные, приведенные на рис. 2б, показывают, что регистрируемая последовательность импульсов тока является зависимой, т.е. вероятность появления нового импульса зависит от длительности межимпульсного интервала. Отсюда можно утверждать, что эта последовательность описывает существование одной поры, которая переходит из открытого в закрытое состояние и наоборот. Подоб-

ный вывод представляется удивительным, но если бы импульсы были связаны с возникновением различных пор в разных местах мембраны, то мы бы наблюдали экспоненциальную зависимость. Конечно, заявлять, что в наблюдаемой последовательности импульсов (в среднем на одной мембране регистрировали около 4 импульсов) нет импульсов, относящихся к разным порам, нет оснований. Однако статистика говорит о том, что, по крайней мере, большинство импульсов, полученных на одной мембране, связаны с одной порой. Таким образом, в мембране при ее охлаждении в районе температуры фазового перехода возникает специфическая область, которая проходит через несколько открытых или закрытых состояний до появления или исчезновения гидрофильной поры, сопровождающейся появлением или исчезновением макроскопического тока. Отметим, что подобный вывод удалось сделать благодаря используемой методике измерений: бислой находился в состоянии фазового перехода в течение 2 мин. За это время успевала возникнуть одна специфическая область, в которой появлялась пора. Если удерживать мембрану при постоянной температуре в состоянии фазового перехода длительное время, то возможно независимое возникновение нескольких подобных мест. В этих условиях наблюдаемая гистограмма была бы экспоненциальной. Подобный результат получен нами ранее в работе [13]: мембрана из гидрированного яичного лецитина находилась в 0,1 М КСl при температуре фазового перехода (51 ± 2)°C в течение 20 мин. Гистограмма межимпульсного интервала, полученная путем обработки данных по 100 импульсам, хорошо аппроксимировалась экспоненциальной зависимостью.

Аналогичный (но менее драматичный) вывод следует из рис. 2а: закрытие поры (конец импульса) зависит от того, когда пора открылась (когда было начало импульса). Отметим, что немонотонная гистограмма времени жизни пор также получена для бислойных липидных мембран из смеси липидов диолеилфосфатидилхолина и пентадеcanoилфосфатидилхолина при фазовом переходе в работе [5]. На наш взгляд, важно, что эксперимент проводился в аналогичных условиях: мембрана остывала со скоростью 0,2 град/мин. Однако в работе [5] ни само наличие максимума на гистограмме, ни возможные причины его появления никак не обсуждаются.

На рис. 2 экспериментальные гистограммы достаточно точно аппроксимированы распределениями Эрланга. Это позволяет предположить, что пора имеет несколько закрытых (8)

и открытых (35) состояний. Такой вывод, на первый взгляд, представляется неожиданным: экспериментальные данные позволяют выделить только два состояния – пора открыта (высокий уровень тока, величина которого не меняется) или закрыта (фоновые флуктуации). Однако подобные предположения представлены в литературе. В работе [6] на основе статистического анализа временных записей трансмембранного тока, возникающего под действием импульсов напряжения (при электропорации), показано, что пора может находиться в некотором специфическом закрытом состоянии. Сценарий эксперимента был следующим. На мембрану подавали два импульса, разделенных некоторым интервалом. Оказалось, что при достаточно большом интервале (> 500 мс) ответ на второй импульс возникал так же, как и на первый. В то же время при меньших интервалах ответ на второй импульс возникал сразу. Мембрана как бы «помнила» свои предыдущие поры, т.е. они оставались в квазиоткрытом или квазизакрытом состоянии. Авторы предположили, что по окончании первого стимула пора переходит в некое непроводящее, но активированное состояние. Если второй стимул приходит быстро, пора быстро открывается, если нет – бислой релаксирует к интактному состоянию, и открытие новых пор происходит независимо. Характер наблюдаемых флуктуаций позволил авторам предположить, что открытие и закрытие пор происходит через некоторое «электрически невидимое» активированное промежуточное состояние, названное авторами «препора».

Авторы не предлагали модель структуры этого состояния («препоры») и считали, что, возможно, в гидрофобной части мембраны после закрытия поры остаются некие гидрофильные структуры. В цитируемой работе также оценено время релаксации поры: время, за которое закрытая препора превращается в интактный бислой. В условиях обратимого электрического пробоя эта величина составляет 0,1–1,0 с. Мы также оценили время релаксации поры в условиях температурного фазового перехода (см. последнюю строку таблицы). Если считать, что наблюдаемые для одной мембраны импульсы тока представляют собой эволюцию одной и той же липидной поры, то время жизни такой поры можно оценить, умножив среднее количество пор на мембране на среднее значение межимпульсного интервала. Наша оценка (около 100 с) на два–три порядка больше, чем в статье [6]. Такое различие может быть объяснено тем, что при электропорации причина возникновения пор кратковременна, и препора существует в условиях, когда воздействие от-

существует. В состоянии же фазового перехода пора все время существует в условиях, ее вызвавших. В связи с этим отметим, что наша оценка является минимальной: мы не можем утверждать, что пора прекратила свое существование после окончания последнего импульса. Кроме этого, скорее всего, пора, возникнув, дальше «живет», пока продолжается фазовый переход. В условиях эксперимента время нахождения мембраны при фазовом переходе составляло около двух минут.

В работе [4] также на основе статистического анализа временных записей трансмембранного тока предполагается, что липидная пора проходит несколько промежуточных электрически невидимых открытых состояний. По мнению авторов, их количество достаточно велико, и они упрощают ситуацию, считая, что возможное число открытых состояний поры равно бесконечности (по нашей оценке их 35). Авторы предложили модель такой поры. Пора возникает внутри домена гель-фазы. Для того, чтобы пора закрылась, надо, чтобы домен «растаял». Каждая присоединившаяся к домену молекула липида делает это событие менее вероятным. Присоединение/отсоединение молекулы липида от домена означает переход поры из одного открытого состояния в другое. Полученная нами оценка числа открытых состояний (35), на наш взгляд, вполне близка к бесконечности, однако время каждого процесса (0,014 с, см. подпись к рис. 2) все-таки слишком велико для молекулярных взаимодействий. Мы согласны с авторами работы [4], что эволюция липидной поры связана с развитием доменов гель-фазы в жидкокристаллической мембране. Однако предложение модели такой поры (с закрытыми и открытыми состояниями) без дополнительных исследований нам представляется преждевременным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, основной экспериментальный результат состоит в том, что регистрируемая в условиях фазового перехода последова-

тельность импульсов трансмембранного тока является зависимой. Появление новых импульсов зависит от длительности межимпульсного интервала. Момент окончания импульса зависит от момента его начала. Модель Эрланга, используемая для аппроксимации гистограмм временных характеристик импульсов, показывает, что липидная пора имеет несколько открытых и закрытых состояний. Наши результаты объединяют точки зрения авторов работ [4,6], которые сделали подобные выводы отдельно для закрытого и открытого состояний липидной поры.

Авторы благодарят проф. В.Ф. Антонова за интерес к работе и полезную дискуссию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. F. Antonov, V. V. Petrov, A. A. Molnar, et al., *Nature* **283**, 585 (1980).
2. V. F. Antonov, A. A. Anosov, V. P. Norik, and E. Yu. Smirnova, *Eur. Biophys. J.* **34**, 155 (2005).
3. A. Blicher and T. Heimburg, *PLoS ONE* **8** (6), e65707 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0065707
4. J. Gallaher, K. Wodzinska, T. Heimburg, and M. Bier, *Phys. Rev. E* **81**, 061925 (2010).
5. B. Wunderlich, C. Leirer, A.-L. Itzko, et al., *Biophys. J.* **96**, 4592 (2009).
6. K. C. Melikov, V. A. Frolov, A. Shcherbakov, et al., *Biophys. J.* **80**, 1829 (2001).
7. В. Ф. Антонов, Е. Ю. Смирнова, А. А. Аносов и др., *Биофизика* **53** (5), 802 (2008).
8. В. Ф. Антонов, А. А. Аносов, В. П. Норик и Е. Ю. Смирнова, *Биофизика* **50** (5), 867 (2005).
9. P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, and W. Wescott, *Nature* **194**, 979 (1962).
10. V. F. Antonov, A. A. Anosov, V. P. Norik, and E. Yu. Smirnova, *Eur. Biophys. J.* **32** (1), 55 (2003).
11. Е. С. Вентцель и Л. А. Овчаров, *Теория случайных процессов и ее инженерные приложения: учеб. пособие для вузов* (Высш. шк., М., 2000).
12. S. W. Stahl, E. M. Puchner, A. Alexandrovich, et al., *Biophys. J.* **101** (8), 1978 (2011).
13. А. А. Аносов, Н. Э. Богатырева, А. М. Черныш и В. Ф. Антонов, *Биофизика* **44** (5), 887 (1999).

Lipid Pore States in Bilayer Lipid Membranes at Phase Transition in LiCl Solution with Addition of Polyethylene Glycols

A.A. Anosov* **, M.S. Kuprijanova, O.Yu. Nemchenko**, V.P. Norik**,
E.V. Sergeenko**, and E.Yu. Smirnova****

**Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences,
ul. Mokhovaya 11/7, Moscow, 125009 Russia*

***Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Bolshaya Pirogovskaya 2/4, Moscow, 119991 Russia*

Statistics on open and closed states of the lipid pores was experimentally investigated in planar lipid bilayer membranes from dipalmitoylphosphatidylcholine at the phase transition temperature in LiCl solution (1 M). Polyethylene glycol of different molecular mass was added to the solution. Transmembrane current pulses were measured at voltage-clamp conditions (50 mV). The histograms of the pore lifetime and the pulse interval have no exponential shape but the pronounced maximum. It means that the pulse sequence of the transmembrane current measured in the phase conditions is dependent. The emergence of the new pulses depends on the emergence time of the previous pulses. The time of the pulse end depends on the time of the pulse start. The proposed Erlang model approximates the experimental histograms quite accurately. According to the model the lipid pore can have several open and closed states.

Key words: phase transition, pore lifetime, pulse interval, bilayer lipid membranes, polyethylene glycol