

УДК 578.7:621.375.826:535.21:616—006.04

ИЗМЕНЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ И ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ГЕМАТОПОРФИРИНОМ

Т. Гианик *, Д. Масарикова *, Л. В. Жорина, М. Ю. Порошина, Е. Б. Черняева

(кафедра общей физики и волновых процессов)

Изучено взаимодействие гематопорфирина IX (ГП) с искусственными бислойнными липидными мембранами (БЛМ). Обнаружено, что при темновой инкубации БЛМ в растворе ГП (концентрации 10^{-6} — $3 \cdot 10^{-5}$ М) проводимость БЛМ существенно не изменяется, уменьшается модуль упругости (E_{\perp}) и коэффициент динамической вязкости (η) на 21,9—31,3%, а мембранный потенциал U_1 становится отрицательным (—50 мВ). Освещение модифицированной БЛМ He — Ne-лазером приводит к росту параметров E_{\perp} и η на 40,7—66,2%, уменьшению U_1 до —20 мВ, а также к необратимым изменениям ее механических свойств. Связывание ГП с БЛМ происходит некооперативно с константой $K=10^5$ М $^{-1}$.

Введение

Метод фотодинамической терапии перспективен для обнаружения и лечения злокачественных опухолей. В его основе лежит фотодинамическое воздействие на раковые клетки, сенсibilизированные красителем. Основным свойством таких красителей является способность накапливаться в опухолевых клетках и при освещении индуцировать фототоксическую реакцию [1]. Традиционным сенсibilизатором в клинической практике является гематопорфирин и его производные. Несмотря на достаточно широкое распространение метода фотодинамической терапии в медицинской практике, многие аспекты физических процессов, лежащих в основе данного метода, остаются невыясненными. Первым этапом взаимодействия красителя с клеткой является его проникновение в плазматическую мембрану. Для изучения процессов такого проникновения мы рассмотрели взаимодействие гематопорфирина IX (ГП) с искусственными бислойнными липидными мембранами (БЛМ).

БЛМ состоят из липидов и углеводородного растворителя и являются общепризнанной моделью плазматической мембраны клеток [2]. В нашей работе мы изучали изменение проводимости g , модуля упругости E_{\perp} в направлении, перпендикулярном плоскости мембраны, коэффициента динамической вязкости η , электрической емкости C и мембранного потенциала U_1 при взаимодействии ГП с БЛМ при разных концентрациях и условиях освещенности.

Материалы и методы. БЛМ готовились по методу Мюллера [3] из растворов палмитилоилфосфатидилхолина (ПОФХ) и из смеси ПОФХ с холинплазмалогеном (ХПГ) (весовое отношение 5:1) в *n*-гептане. Растворы имели концентрацию 20 мг/мл. Фосфолипиды, полученные по методике, описанной в [4], были нам любезно предоставлены д-ром А. Герметгером (Грац, Австрия). Отметим, что ХПГ является важным компонентом плазматической мембраны клеток [5]. Поэтому включение ХПГ в состав БЛМ приближает ее свойства к свойствам липидного бислоя биомембран.

Мембраны формировали на конце тефлоновой трубочки диаметром около 0,8 мм, надетой на один из двух AgCl-электродов, выходящих

* Математико-физический факультет Университета Коменского. Братислава, ЧСФР.

в стаканчик для электролита. В качестве электролита использовали KCl (рН 7,2) концентрации 0,1 М. Штоковый раствор ГП («Serva») в NaOH (10^{-2} М) разводился бидистиллированной водой до концентрации 10^{-3} М и добавлялся в электролит с одной стороны мембраны (итоговая концентрация варьировалась от 10^{-5} до 10^{-6} М). Для изучения фотодинамического воздействия при участии ГП систему освещали He—Ne-лазером ($\lambda_{\text{ex}}=632$ нм) мощностью 1 мВт (площадь пятна сравнима с площадью БЛМ). Все измерения проводились на кафедре биофизики Университета Коменского (г. Братислава).

Проводимость определялась известным методом, основанным на измерении тока через мембрану при подаче на нее постоянного напряжения 20 мВ [6].

Величины E_{\perp} и η дают информацию о состоянии внутренней гидрофобной области БЛМ. Их измеряли с помощью специального электрострикционного метода, основанного на регистрации высших гармоник переменного тока [7]. На мембрану при этом подавалось переменное напряжение с амплитудой 75 мВ и частотой 1 кГц. Метод позволяет одновременно измерять также емкость мембраны C и постоянную составляющую мембранного потенциала U_1 . Величина U_1 измерялась с помощью модификации метода компенсации второй гармоники тока [8] или из отношения амплитуд второй (A_2) и третьей (A_3) гармоник тока. Величины E_{\perp} , η , C и U_1 рассчитывались по формулам

$$E_{\perp} = 3C_s U_0^2 A_1 / 4hA_3, \quad (1)$$

$$\eta = (E_{\perp} \sin \varphi) / 2\pi f, \quad (2)$$

$$U_1 = U_0 A_2 / 4A_3, \quad (3)$$

$$C = A_1 / 2\pi f U_0, \quad (4)$$

где C_s — удельная емкость мембраны ($\sim 5 \cdot 10^{-3}$ Ф·м $^{-2}$), h — толщина ее гидрофобной области (~ 5 нм), U_0 — амплитуда переменного напряжения, f — частота, A_1 — амплитуда первой гармоники тока, φ — сдвиг фаз между A_3 и A_1 , возникающий вследствие отставания по времени деформации от приложенного электрострикционного давления из-за вязкости БЛМ. Для определения величин A_1 , A_2 , A_3 и φ использовали стандартную электронную аппаратуру, включающую резонансные усилители для выделения гармоник A_2 и A_3 . Обработка результатов экспериментов проводилась с помощью персонального компьютера, подключенного к экспериментальной установке.

Результаты и обсуждение

Добавление ГП в электролит, омывающий БЛМ, может привести к его адсорбции на поверхности мембраны, проникновению внутрь липидного бислоя и прохождению через мембрану. Во всех случаях в мембране может индуцироваться структурный переход, в результате которого бислой станет проницаемым для ионов и, следовательно, существенно изменится его проводимость.

1. Проводимость БЛМ под влиянием ГП. Проводимость немодифицированной мембраны составляет $23,4 \pm 2,9$ пСм. Добавление ГП в электролит до концентраций 10^{-6} — $3 \cdot 10^{-5}$ М приводило к слабому росту проводимости БЛМ, величина g достигала значения 25—50 пСм. Освещение мембраны лазером в течение 30 мин приводило к росту проводимости БЛМ до величины 75—100 пСм. После выключения лазера проводимость уменьшилась до 25—75 пСм. Таким

образом, ГП и при темновом встраивании, и при освещении изменяет проводимость БЛМ. Эти изменения, однако, существенно меньше тех, которые индуцированы другими биологически активными веществами [9] и сравнимы по порядку величины с проводимостью одиночного ионного канала, образованного грамицидином [6].

Результаты, полученные в этом эксперименте, свидетельствуют о том, что ГП преимущественно адсорбируется на мембрану, практически не образуя сквозных ионных каналов.

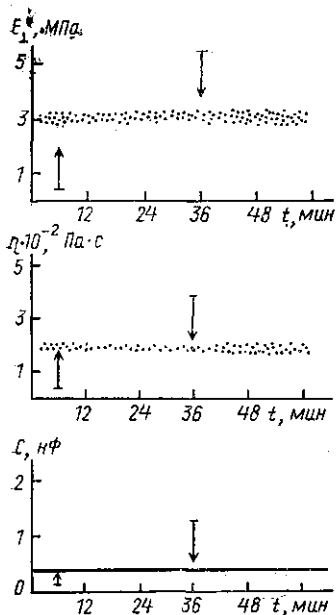


Рис. 1. Кинетика изменения параметров E_{\perp} (а), η (б) и C (в) немодифицированной БЛМ из ПОФХ во время освещения He—Ne-лазером (стрелка, направленная вверх, соответствует включению, вниз — выключению лазера)

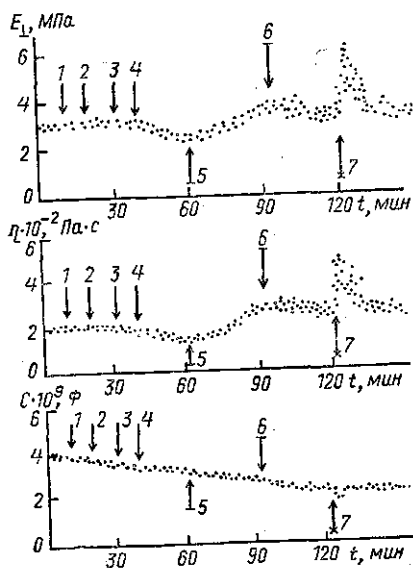


Рис. 2. Кинетика изменения параметров E_{\perp} (а), η (б) и C (в) во время добавления в электролит ГП в концентрациях: 10^{-6} (1), $3 \cdot 10^{-6}$ (2), 10^{-5} (3) и $3 \cdot 10^{-5}$ М (4) при включении (5), выключении (6) лазера и при замене электролита путем перфузии (7) раствором KCl концентрации 0,1 М, не содержащим ГП

2. Изменение параметров E_{\perp} , η , C и U_1 под влиянием ГП. Все эксперименты, описанные ниже, начинались примерно через 30 мин после формирования БЛМ — время, необходимое для установления равновесия. На рис. 1 показана кинетика параметров E_{\perp} , η и C немодифицированной мембраны из ПОФХ (т. е. не окрашенной ГП) в темноте и при освещении лазером. Видно, что они не изменяются как в темноте, так и при освещении. Также неизменной остается величина U_1 , составляющая для немодифицированной мембраны единицы милливольт.

Добавление ГП в электролит с одной стороны БЛМ приводило к уменьшению величин E_{\perp} и η в пределах 21,9—31,3% от их исходной величины и к росту абсолютной величины U_1 до ~ 50 мВ. Окрашенная сторона мембраны заряжалась отрицательно, что связано с тем, что

молекула ГП в условиях эксперимента находилась в основном в форме аниона и дианиона [10].

В большинстве экспериментов емкость мембраны не менялась. В отдельных случаях наблюдалось незначительное уменьшение (рис. 2, в) или рост C , связанный, по-видимому, с деформацией мембраны вследствие осмотического давления, возникающего при добавлении больших концентраций ГП. В работе [11] показано, что деформация мембраны не влияет на параметры E_{\perp} и η , следовательно, их изменения связаны с взаимодействием с молекулами ГП.

Освещение модифицированной мембраны приводило к росту величин E_{\perp} и η в пределах 40,7—66,2%, емкость при этом уменьшалась (рис. 2, в). Абсолютная величина U_1 уменьшалась до ~ 20 мВ.

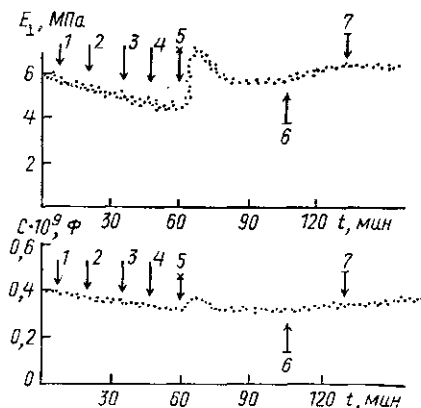


Рис. 3. Кинетика изменения параметров E_{\perp} (а) и C (б) после добавления ГП в электролит в концентрациях: 10^{-6} (1), $3 \cdot 10^{-6}$ (2), 10^{-5} (3) и $3 \cdot 10^{-5}$ М (4) при замене электролита путем перфузии (5) раствором КСl концентрации 0,1 М, не содержащим ГП, и при освещении лазером (6 — включение, 7 — выключение)

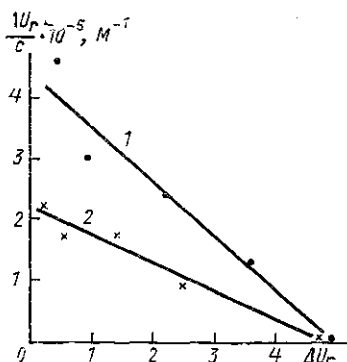


Рис. 4. Зависимость относительного изменения мембранного потенциала ΔU_r для разных концентраций ГП в электролите (с) в координатах Скотчарда для БЛМ из ПОФХ (1) и смеси ПОФХ+ХПГ (2)

Выключение лазера существенно не изменяло величины E_{\perp} и η (рис. 2, а, б), однако в 6 (из 11) экспериментах через ~ 15 —30 мин после выключения лазера мембраны разрушались. Непосредственно перед моментом разрушения БЛМ величина E_{\perp} возрастала при неизменной величине емкости C .

Изменения величин E_{\perp} и η в результате освещения лазером были необратимы. Об этом свидетельствуют наши опыты по замене электролита, содержащего ГП, на электролит без ГП. Перфузия, проведенная до освещения модифицированной мембраны, приводила к восстановлению параметров E_{\perp} , η и C до значений, соответствующих немодифицированной мембране. Это свидетельствует о том, что в этом случае ГП в основном прочно связан с мембраной, однако небольшая часть молекул ГП, оставшаяся в мембране после перфузии, обеспечивает рост E_{\perp} и C при дальнейшем освещении (рис. 3). Перфузия, проведенная после освещения, не влияла на величины E_{\perp} , η . Это означает, что в результате освещения ГП, встроенный в мембрану, проч-

но связывается с ней. Отметим, что время, необходимое для перфузии, составляло около 10 мин.

Аналогичные результаты были получены при исследовании параметров E_{\perp} , η , C и U_1 для БЛМ из смеси ПОФХ+ХПГ.

Для определения особенностей связывания ГП с мембраной мы построили зависимости относительных изменений мембранного потенциала ΔU_r для разных концентраций с ГП в электролите в координатах Скотчарда, т. е. зависимость $\Delta U_r/c$ от ΔU_r ($\Delta U_r = (U_1 - U_0)/U_0$, U_0 — потенциал немодифицированной БЛМ). Данные для мембран из ПОФХ (кривая 1) и смеси ПОФХ+ХПГ (кривая 2) приведены на рис. 4. В обоих случаях экспериментальные точки хорошо ложатся на прямые. Проанализируем указанные зависимости с помощью уравнения Хилла. В нашем случае можно записать

$$K = \frac{\Delta U_r}{c^m (N - \Delta U_r)}, \quad (5)$$

где K — константа связывания, N — количество мест связывания ГП на мембране, m — коэффициент Хилла. В координатах Скотчарда получим

$$\Delta U_r/c = Kc^{m-1} (N - \Delta U_r). \quad (6)$$

В нашем случае линейная аппроксимация позволяет принять $m=1$. Это означает, что процесс связывания ГП с мембраной происходит некооперативно, т. е. связывание одной молекулы ГП не зависит от связывания остальных:

$$\Delta U_r/c = KN - K\Delta U_r. \quad (7)$$

Как видно из уравнения (7), по наклону кривых 1, 2 (рис. 4) можно определить константу связывания ГП с мембраной для обоих типов БЛМ: $K_{\text{ПОФХ}} = (9,97 \pm 2,83) \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}$ (5 мембран) и $K_{\text{ПОФХ+ХПГ}} = (4,79 \pm 1,16) \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}$ (6 мембран). Эти величины не отличаются статистически значимо (исходя из критерия Стьюдента). Таким образом, константы связывания ГП с БЛМ не отличаются для использованных нами липидных составов и сравнимы с константами связывания гидрофобных флуоресцентных зондов [12]. Это является еще одним доказательством высокого сродства ГП с липидами.

Из полученных данных видно, что основная часть молекул ГП скорее всего не проходит через БЛМ насквозь или не индуцирует в ней существенных стационарных структурных изменений, так как это вызвало бы образование пор в мембране и ее проводимость резко возросла бы. Вероятнее всего, в темноте (за время 10—15 мин) ГП адсорбируется на поверхность мембраны и/или связывается с липидными головками, расположенными на поверхности мембраны.

Результаты спектральных измерений [13] подтверждают, что молекулы ГП встраиваются в мембрану. Размеры молекулы ГП сравнимы с величиной липидных головок, поэтому при ее встраивании между головками липидов нарушается упорядоченная структура поверхности мембраны, что может повлиять на упорядоченность структуры ее гидрофобной области. Это подтверждается уменьшением E_{\perp} после добавления ГП. Более рыхлая структура гидрофобной области мембраны приводит к более свободному движению углеводородных хвостов липидов. Следовательно, вязкость БЛМ, как и наблюдалось в эксперименте, падает.

Увеличение значений E_1 и η после начала освещения лазером связано скорее всего с более глубоким проникновением молекул ГП внутрь мембраны (в область хвостов липидов). Поведение мембранного потенциала не противоречит сделанным выше предположениям.

Молекула ГП несет распределенный отрицательный заряд. Поверхность мембраны заряжена положительно. При адсорбции ГП на мембрану отрицательный заряд молекулы ГП компенсирует положительный заряд мембраны. Продвижение молекул ГП в область положительно заряженных головок приводит к дальнейшему падению мембранного потенциала. Дальнейшее движение молекулы в область нейтральных липидных хвостов вызывает некоторое повышение мембранного потенциала. Стабилизация к этому времени таких параметров, как E_1 и η , позволяет предположить, что ГП при темновой инкубации локализуется в области границы между хвостами и головками липидов.

Повышение мембранного потенциала при освещении указывает на более глубокое проникновение молекулы ГП. Его выход на стационарный уровень (в течение 20—25 мин), вероятно, указывает на локализацию ГП в области липидных хвостов.

Полученные результаты отражают лишь одну сторону взаимодействия ГП с клеткой — взаимодействие ГП с ее липидным бислоем. Как мы показали выше, при этом не происходит существенного изменения проводимости БЛМ. Известно, однако, что ГП накапливается в клетках [1, 2]. В случае плазматической мембраны клеток ГП проникает внутрь клетки, по всей вероятности, через неоднородности, имеющиеся на границе между белками и липидным бислоем.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Henderson B. W., Belnier D. A. // Ciba Foundation Symposium 146: «Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use». Chichester, 1989. P. 112. [2] Tien H. T. Bilayer lipid membranes (BLM): Theory and practice. N. Y., 1974. [3] Mueller P., Rudin D. O., Tien H. T., Wescott W. C. // Nature. 1962. 194. P. 979. [4] Hermetter A., Paltauf F. // Chem. Phys. Lipids. 1982. 30. P. 47. [5] Hermetter A. // Comm. Mol. Cell. Biophys. 1988. 5. P. 133. [6] Hladky S. B., Haydon D. A. // Biochim. et Biophys. Acta. 1972. 274. P. 292. [7] Пасечник В. И., Гнианик Т. // Колл. журн. 1977. 38. С. 1180; Drain C. M., Christensen B., Mauzerall D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. 86. P. 6959; Hianik T., Miklovicova J., Vajci A. et al. // Gen. Physiol. Biophys. 1984. 3. P. 79. [8] Соколов В. С., Шерный В. В., Абидор И. Г. // ДАН СССР. 1980. 251. С. 236. [9] Hianik T., Larutkova G., Vondrejcs V. // Gen. Physiol. Biophys. 1984. 3. P. 93. [10] Жорина Л. В. Дипломная работа (физ. ф-т МГУ). М., 1991. [11] Passeechnik V. I., Hianik T. Transversal elasticity of membranes. Bratislava. 1990. [12] Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980. [13] Chernajeva E. B., Shleina E. A., Kshurshilova Z. A. et al. // Stud. Biophys. 1988. 125. P. 203; Варданян А. Г. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. М., 1990.

Поступила в редакцию
19.04.91