БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ, 2021, том 38, № 2, с. 109–122

УДК 577.352.26

ГРАНИЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И ЭНЕРГИЯ СЖАТИЯ ЛИПИДНЫХ МОНОСЛОЕВ В ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

© 2021 г. Ю. А. Ермаков*

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

**e-mail: yury.a.ermakov@gmail.com*

Поступила в редакцию 02.11.2020 г.
После доработки 21.11.2020 г.
Принята к публикации 25.11.2020 г.

Диаграммы сжатия измерены и проанализированы для монослоев, состоящих из DOPC, POPC, DMPC, DPPC, DPhPC и DMPS на поверхности растворов ионов (KCl, $CaCl_2$, $BeCl_2$), а также в присутствии полилизина (PLL) или хлорпромазина (CPZ). Упругие свойства монослоев характеризуются площадью молекул липидов, представленной двумя областям, несжимаемой и покрытой мягкой оболочкой, размер которой зависит от латерального давления и коэффициента упругости. Это предположение хорошо описывает форму диаграмм сжатия липидов, включая липиды с насыщенными углеводородными цепями (DPPC и DMPS) в области, где они проявляют свойства жидких кристаллов (жидкое расширенное состояние, LE). В этой области все липиды демонстрируют линейную связь изменений межфазного Вольта-потенциала с эффективным значением работы сжатия монослоя. Выбрав за нулевое значение потенциала его величину в точке с латеральным давлением около 1 мН/м, оценили наклон линейного участка этой зависимости. Ее наклон позволяет идентифицировать различные типы мембраноактивных соединений, влияющих на упругие и электростатические характеристики монослоя. Оказывается, он практически не зависит от pH и ионного состава водной субфазы, но уменьшается при адсорбции полипептидов PLL на поверхности монослоя DMPS. Адсорбция небольших положительно заряженных молекул CPZ на таком монослое приводит к нелинейной зависимости потенциала от работы. Количественное описание этого отклонения хорошо согласуется с предположением, что молекулы CPZ встраиваются в монослой. Их вклад в изменение энергии монослоя и Вольта-потенциала определяется количеством внедренных в него молекул CPZ, которое связано с латеральным давлением зависимостью, аналогичной соотношению Больцмана.

Ключевые слова: липидные монослои, диаграммы сжатия, граничный (Вольта) потенциал, работа сжатия, фазовый переход

DOI: 10.31857/S0233475521020055

ВВЕДЕНИЕ

Среди различных экспериментальных подходов к изучению структурных изменений клеточных мембран, инициированных фармакологически активными соединениями, особое место занимает применение липидных моделей различного типа – липосом, бислойных липидных мембран (БЛМ), липидных структур на твердых подложках и монослоев липидов на поверхности водных растворов. Последние десятилетия накоплен огромный экспериментальный материал, в котором доказана эффективность и практическая ценность таких моделей как для исследовательских целей, так и для широкого спектра практических медико-биологически приложений. В частности, многие лекарственные и антибактериальные препараты существенным образом влияют на проницаемость клеточных мембран, опосредованную структурными изменениями липидного матрикса клеточных стенок, и во многих случаях приводят к их разрушению. Поэтому в центре внимания большинства экспериментальных физико-химических исследований является взаимодействие таких препаратов с фосфолипидами, которые ответственны за изоляцию внутреннего объема клеток от внешней среды и появление локальных мембранных структур. Физико-химические условия образования таких структур, а также связанные с ними многообразные медико-биологические приложения являются предметом большого числа оригинальных и обзорных публикаций (см., например, [1–8]). Не претендуя на подробное рассмотрение биотехнологических задач, отметим опубликованный недавно обзор [9], в котором

с достаточной полнотой цитированы оригинальные исследования молекулярных механизмов, вовлеченных в гидрофобные и электростатические взаимодействия на поверхности липидных и клеточных мембран, наиболее выраженные при адсорбции крупных полипептидов.

С точки зрения физической химии липидные модели предоставляют уникальную возможность использовать широкий спектр экспериментальных методов и теоретических моделей для изучения межфазной границы, образованной гидрофобными участками фосфолипидов и их полярными группами, экспонированными в водный раствор и участвующими в образовании электрического двойного слоя. Именно в этом слое происходят основные события, обусловленные адсорбцией ионов и заряженных молекул, в том числе достаточно крупных, чтобы существенно повлиять на латеральное взаимодействие фосфолипидов в мембране и их фазовое состояние. Значительные изменения в распределении электрического поля на межфазной границе липид–вода обнаруживаются экспериментально с применением техники плоских бислойных липидных мембран в сочетании с электрокинетическими измерениями в суспензии липосом. Этими методами удается зарегистрировать изменение дипольной компоненты граничного потенциала, которая определяется как разность электрокинетического (дзета) потенциала и скачка потенциала между углеводородной частью мембраны и объемом внешнего водного раствора. Изменение дипольного потенциала происходит, например, при латеральной конденсации липидов, вызванной многовалентными катионами и макромолекулами различной структуры [10, 11]. Дипольный потенциал проявляет себя как хороший индикатор, указывающий на возможность изменений в структуре липидного матрикса биомембран. Многие факты, полученные в последние годы, показывают, что эти изменения существенным образом влияют на конформационную подвижность мембранных белков и выполнение ими важных биохимических функций [12, 13].

Одна из типичных задач в этой области связана с количественной оценкой констант адсорбции неорганических ионов и амфифильных молекул разного типа на поверхности мембран, особенно способных встраиваться в липидный матрикс. К ним относятся катионы с высокой аффинностью к липидам, которые организуют микрокластеры анионных липидов [14–17] и тем самым повышают жесткость липидных мембран, а также ряд анестетиков, психотропные свойства которых обычно связывают с некоторым “разжижением” клеточных мембран [18–21]. В частности, использование техники монослоев Ленгмюра позволило авторам работ [22, 23] доказать встраивание молекул хлорпромазина в монослой фосфолипидов с разной длиной углеводородных участков молекул. Однако использованные ими фосфолипиды при нормальных условиях существуют в конденсированном состоянии, тогда как внедрение посторонних молекул в жидкокристаллическом состоянии может быть намного эффективнее. Кроме того, поскольку молекулы CPZ в этих условиях привносят в монослой положительный заряд, электростатические эффекты могут существенно упростить анализ экспериментальных данных. Тем не менее приведенные в этих работах данные электрофоретических измерений выглядят недостаточно убедительными в этом отношении.

Особый интерес в этой связи представляют инициированные мембранотропными агентами изменения в латеральной упаковке липидов, наиболее заметные вблизи фазового перехода из жидкоупорядоченного (liquid expanded, LE) в конденсированное (condensed, LC) состояние липидных мембран. Как оказалось, в любом состоянии сохраняется связь между приращениями упругих и электростатических характеристик липидного монослоя, например, состоящего из молекул димиристоилпроизводного фосфатидилсерина (DMPS) [24]. Недавно нам удалось оценить распределение электрического заряда по нормали к границе вода–воздух в присутствии этого липида в LE- и LC-состояниях по результатам рентгеновской рефлектометрии в скользящей геометрии [25]. Полученные при этом экспериментальные оценки были подтверждены численным анализом молекулярно-динамических симуляций монослоя этого липида. Хорошее согласие экспериментальных и расчетных зависимостей распределения заряда на межфазной границе от латерального давления в монослое позволило установить молекулярную природу дипольной компоненты граничного потенциала и интерпретировать диаграммы сжатия этого липида и падения потенциала на межфазной границе как следствие частичной дегидратации полярных групп фосфолипида. Данная работа нацелена на уточнение механохимических и электростатических характеристик подобных межфазных границ вода–воздух в присутствии монослоя ряда анионных и нейтральных фосфолипидов в присутствии некоторых биологически значимых ионов и молекул. Основное внимание уделяется эмпирическому и количественному анализу монослоев в жидкокристаллическом состоянии как наиболее общему для фосфолипидов, присутствующих в натуральных мембранах. В качестве объектов исследования выбран ряд фосфолипидов, различающихся структурой углеводородных цепей, которые во

многом определяют механохимические характеристики монослоя, а также наиболее изученные в литературе и наших предыдущих работах насыщенные липиды DPPC и DMPS, которые демонстрируют фазовый переход из LE- в LC-состояние в диапазоне температур близком к комнатной. Это обстоятельство заметно упрощает проведение экспериментов и позволяет оценить возможное влияние электростатических взаимодействий в полярной области монослоя на адсорбцию неорганических ионов и заряженных молекул разной природы. Такие взаимодействия проявляются и в присутствии на его поверхности заряженного полипептида полилизина, который находит применение во многих медико-биологических приложениях. Предлагается количественная обработка экспериментальных диаграмм сжатия и скачка потенциала (Вольта-потенциала) на межфазной границе, которая позволяет идентифицировать основные типы влияния мембранотропных агентов на поверхность липидного монослоя – изменение состояния ионизации и гидратации полярных групп, а также количественно описать удаление амфифильных молекул, встроенных в полярную область монослоя, при повышении латерального давления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы результаты, полученные при регистрации диаграмм сжатия фосфолипидов разного типа с применением техники монослоев Ленгмюра. Измерения поверхностного давления и Вольта-потенциала проводились при комнатной температуре (18–22°C) при контроле pH вблизи нейтральных значений на коммерческом оборудовании компании Kibron Inc. (Finland). В ряде случаев использовались результаты, полученные ранее при измерении на лабораторном оборудовании, созданном В.Л.Шаповаловым и описанном в предыдущих публикациях [26, 27]. Перед каждым опытом проводилось сближение барьеров до минимального расстояния между ними для удаления возможных посторонних поверхностно-активных соединений. Их отсутствие контролировалось перемещением барьеров во всем доступном диапазоне, при котором натяжение (поверхностное давление) фонового раствора и потенциал не превышали 0.2 мН/м и 10 мВ, соответственно. После нанесения монослоя липида и удаления растворителя устанавливались нулевые значения поверхностного давления, которые отличались от фонового значения не более чем на 0.5 мН/м. Значение потенциала заметно зависит от расстояния вибрирующего электрода от поверхности и случайного положения “доменов” липида разных размеров, существующих на поверхности до появления сплошного монослоя. По этой причине установка начального нулевого значения потенциала не гарантирует совпадения потенциалов в различных опытах, поэтому изменение потенциала в дальнейшем оценивалось только после появления заметных изменений поверхностного давления в монослое на уровне 1 мН/м. Для формирования монослоя использовались фосфолипиды компании Avanti Polar Lipids (USA): 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (POPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPhPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*L*-choline (DMPC) и 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*L*-serine (DMPS) – в большинстве случаев в виде растворов в хлороформе в исходной концентрации 10 мг/мл. Растворы насыщенных липидов DMPS и DPPC готовились из сухих препаратов, что давало возможность контролировать количество липида и использовать смесь (5/1, v/v) хлороформ–метанол (Merck, Germany), которая делает растворы более однородными при температурах ниже фазового перехода. Все фосфолипиды в концентрации 0.5 мг/мл наносились с применением шприца Hamilton на поверхность водного раствора (обычно 10 мМ KCl, если не указано иное) в тефлоновой ванне MicroTrough XS (около 12000 мм^2) После испарения растворителя в течение 20 мин осуществлялось сжатие монослоя со скоростью 10 мм^2/мин двумя барьерами из полиоксиметилена с одновременной регистрацией латерального давления металлической иглой и Вольта-потенциала с помощью вибрирующего электрода (метод Кельвина). Фоновые растворы солей, хлорпромазина и полилизина (poly-L-lysine hydrobromide, PLL) с молекулярной массой 2500 готовились из реактивов компании Sigma–Aldrich (USA) в концентрациях, указанных в тексте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Диаграммы сжатия давление–площадь монослоя ряда фосфолипидов приведены на рис. 1*a*. Во всех экспериментах латеральное давление плавно возрастало по мере сближения барьеров, а монослои из DPPC и DMPS демонстрируют небольшое “плечо” из-за наличия фазового перехода из жидкого (LE) в конденсированное (LC) состояние. Форма кривых искажается вблизи максимальных значений давления, где происходит коллапс монослоя, связанный с нарушением мениска и краевого угла смачивания на границах тефлоновой ванны. Как показывает опыт, положение кривых в шкале площадей, но не их форма зависит от условий измерения – материала ванны и барьеров, качества растворителя липида и спосо-

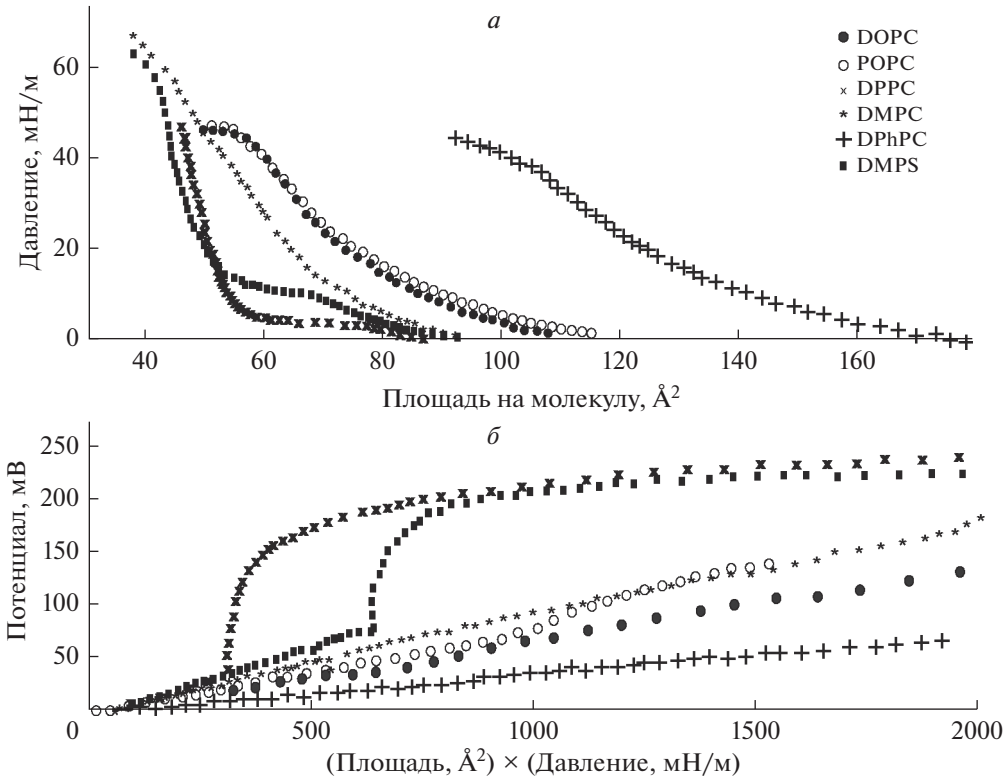

Рис. 1. Диаграммы сжатия монослоя некоторых фосфолипидов на поверхности водного раствора 10 мМ KCl (*а*) и результаты измерения Вольта-потенциала в тех же опытах (*б*). Ось абсцисс – работа по сжатию монослоя.

ба его введения в монослой, способа регистрации натяжения и т.п. По этой причине количественный анализ диаграмм сжатия может содержать плохо контролируемые ошибки. В этом отношении намного надежнее оказываются относительные изменения давления и Вольта-потенциала, которые регистрируются независимыми инструментами, но синхронно, как это предусматривает современная техника. Более того, физически более оправданным оказывается оценка изменения потенциала по отношению к энергетическим затратам на сжатие монослоя, которые представлены на рис. 1*б* и далее двумерным аналогом механической работы, *W*, как произведение измеренных в каждом опыте значений давления (мН/м) и площади (Å^2). На всех экспериментальных кривых, приведенных на рис. 1*б*, имеется начальный линейный участок, который в случае DPPC и DMPS соответствует LE-состоянию этих монослоев. Этот участок отражает свойства именно жидкокристаллического состояния всех монослоев. Его линейность указывает, что по крайней мере некоторая часть работы, затраченной на сжатие монослоя, расходуется на заряжение межфазной границы и изменение граничного потенциала. Этот факт позволяет количественно связать механохимические и электростатические характеристики монослоя примерно так, как это было сделано нами ранее в работах [24, 28].

Эмпирический анализ диаграмм удобно провести, опираясь на предположение о линейной связи относительного приращении площади *A* и латерального давления в монослое [29]. Сжатие монослоя в области давлений, которой на диаграммах давление–площадь соответствует “жидкий” LE-участок, можно представить как уменьшение избыточной площади молекул, пропорциональное приращению давления в монослое, *P*:

$$\frac{dA}{A - A_0} = -\frac{dP}{K_P}, \qquad (1)$$

где K_P – модуль изотермического латерального сжатия. A_0 – минимальная несжимаемая площадь липидных молекулы. В общем случае интегрирование уравнения (1) с граничным условием в пределе высоких давлений $A \to A_0$ приводит к экспоненциальной зависимости площади от давления.

$$A = A_0 + A_e \exp\left(-\frac{P}{K_P}\right). \qquad (2)$$

Параметрами в уравнении (2) являются минимальная площадь молекулы A_0, которая не зависит от приложенного давления как некоторое жесткое “ядро”, окруженное мягкой “оболочкой”

Таблица 1. Параметры аппроксимации диаграмм сжатия согласно уравнению (2) для кривых на рис. 1*a*

Липид	A_0, Å^2	A_e, Å^2	P_0, мН/м	K_P, м/мН	$q = E/W$, мВ/(Å^2 мН/м)
DOPC	50.4	53.9	0.49	16.8	0.070
POPC	51.1	59.1	0.29	15.9	0.068
DMPC	49	36	0.77	13.4	0.094
DPhPC	97.5	74.5	0.28	15.6	0.038
DPPC (LE)	67.5	17.8	0.26	3.8	0.14
DMPS (LE)	51.8	42.8	1.38	11.37	0.12

с площадью, равной A_e при нулевом давлении. Результаты аппроксимации диаграмм сжатия, представленных на рис. 1*a*, приведены в табл. 1, где параметры для DPPC и DMPS относятся к начальному участку диаграмм до области фазового перехода. В последней колонке таблицы приведен наклон линейных участков для этих липидов, который определяет коэффициент пропорциональности $q = E/W$ между изменением потенциала E и двумерным аналогом работы по сжатию монослоя W. Параметр P_0 отражает значение давления вблизи начала координат и его небольшие значения характеризуют достаточно высокое качество аппроксимации.

Опираясь на отмеченный выше факт линейной связи Вольта-потенциала и работы по сжатию монослоя, полезно сопоставить его с наличием в субфазе веществ, способных повлиять на механические и электрические характеристики монослоев в той области, где поведение липидов соответствует жидкокристаллическому состоянию. На рис. 2 и 3 приведены результаты измерений для монослоев DPPC и DMPS, полученные при разном ионном составе водной среды. При построении обоих рисунков изменения потенциала оценивались как разность его значений и величины потенциала, измеренной в начале формирования монослоя, условно отнесенному к давлению 1 мН/м. Конечно, во всех опытах полное изменение потенциала по мере сжатия монослоя зависело от типа ионов и концентрации фонового электролита. В случае монослоев из DMPS это хорошо заметно в серии экспериментальных кривых, опубликованных нами ранее [26]. В известной степени зависимость полного потенциала от концентрации ионов и pH отражает их влияние на степень ионизации и поверхностный заряд монослоя DMPS. Примерно так же в опытах с DPPC граничный потенциал зависел от типа катионов, присутствующих в растворе электролита. Однако в данном контексте нас интересует, в какой мере заряжение межфазной границы монослоя на поверхности электролита отражает работу, затраченную на его сжатие.

$$W = A_0 P + A_e P \exp\left(-\frac{P}{K_P}\right). \quad (3)$$

Поскольку все кривые сведены на рисунке к начальной точке, в которой значение потенциала принято равным нулю, то при построении данных на рисунках игнорировалось различие ионной силы, pH и тип электролита в субфазе.

Как можно видеть из данных, представленных на рис. 2 и 3, линейная связь изменений потенциала и работы по сжатию монослоя присутствует во всех опытах. Этот результат представляется несколько неожиданным, поскольку катионы сильно различаются по эффективности взаимодействия с полярными группами фосфолипидов, а величина pH влияет на состояние их ионизации. Более того, хорошо известно, что адсорбция неорганических катионов, присутствующих в субфазе, отражается на абсолютной величине граничного потенциала, включая его диффузную и дипольную компоненты [12, 17]. Однако при параллельном смещении кривых к нулевому начальному значению становится заметно, что коэффициент пропорциональности (наклон линейного участка) практически не зависит от состава электролита.

Существенно иной результат был получен в присутствии крупных положительно заряженных органических молекул, полипептидов на основе лизина. На рис. 4 приведены данные, полученные при регистрации изотерм сжатия и потенциала монослоев DMPS при наличии поликатионов PLL в разной концентрации. На рисунке представлены результаты для значений потенциала, отнесенных к условному нулевому значению в тех же координатах, как и на предыдущих. Хорошо виден линейный участок, наклон которого уменьшается с увеличением концентрации PLL в субфазе почти вдвое вплоть до предельно малой

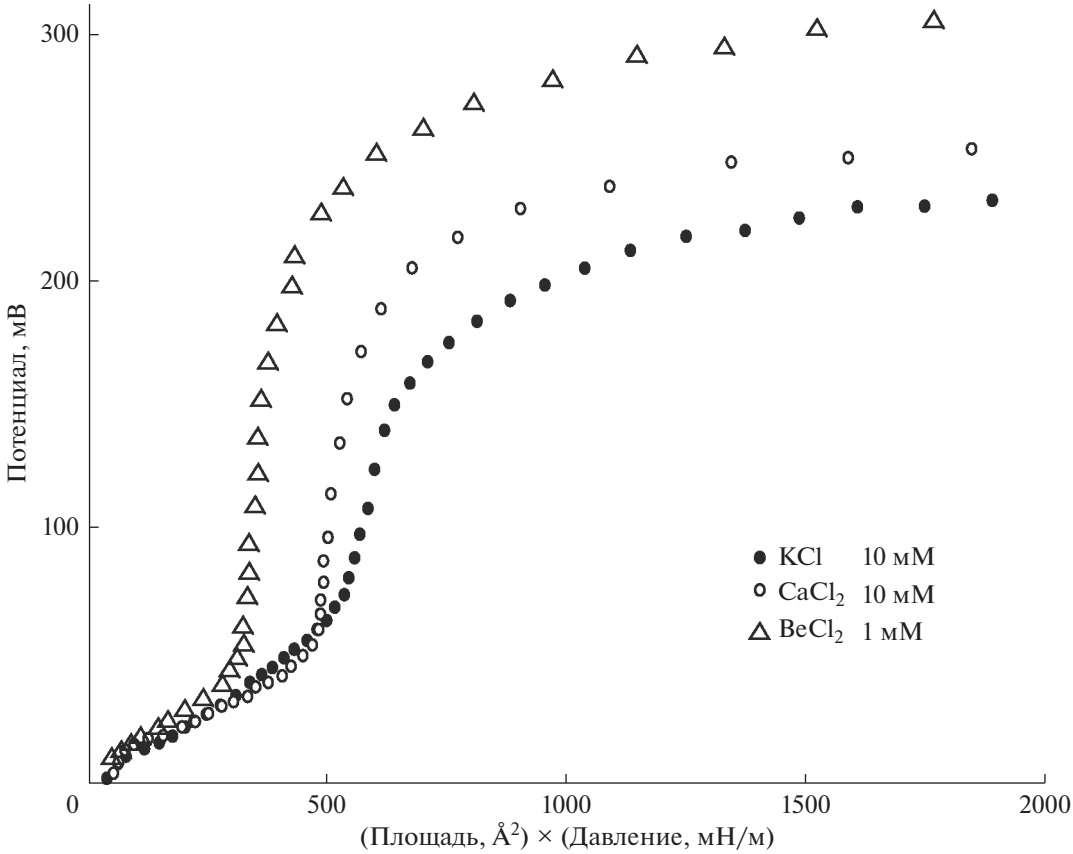

Рис. 2. Вольта-потенциал монослоев DPPC на поверхности водных растворов указанных электролитов при сжатии монослоя. Ось абсцисс – работа по сжатию монослоя. Количество экспериментальных точек здесь и далее уменьшено для ясности изображения.

величины, равной 0.06 мВ/(Å^2 мН/м). Это значение соответствует, по-видимому, полному заполнению, характерному для адсорбции полилизинов на поверхности липидных мембран из анионных фосфолипидов, включая фосфатидилсерин. Судя по известным данным электрокинетических измерений в суспензии липосом из отрицательно заряженных фосфолипидов, отрицательный дзета-потенциал таких липосом в присутствии поликатионов резко уменьшается, меняет знак и достигает плато при количестве полилизинов, соизмеримым с количеством липида, присутствующем в суспензии [30–32]. В экспериментах, результат которых представлен на рис. 4, изменение наклона линейного участка не может быть отнесено только к изменению поверхностного заряда, которое, судя по данным рис. 3, практически не влияет на этот наклон. Уменьшение наклона линейного участка в данном случае отражает понижение вклада механохимической работы в заряжение межфазной границы. Это, возможно, означает, что присутствие полимерного слоя удерживает молекулы воды в полярной области липида, тем самым понижая их влияние на изменение граничного потенциала. Это предположение основано на результатах молекулярно-динамического анализа изотерм сжатия монослоя DMPS, проведенного нами ранее в работе [25]. Как следует из этого анализа, основной вклад в изменение граничного потенциала в области LE вносят дипольные моменты молекул воды, ассоциированных с полярными группами, ориентация и количество которых уменьшается в полярной области монослоя по мере увеличения латерального давления. Естественно предположить, что присутствие полилизина на поверхности монослоя определяется в основном взаимодействием с липидом лизиновых оснований полимера. Например, вызванным ими нарушениями в сети водородных связей между водой и фосфатными группами молекул липида, как это происходит при адсорбции отдельных молекул лизина [33]. Это предположение не противоречит данным, полученными ранее с применением рентгеновской рефлектометрии в присутствии высокомолекулярных форм полилизина [34–36]. Однако исследования, проводимые в настоящее время в этом направлении, еще не завершены, и получен-

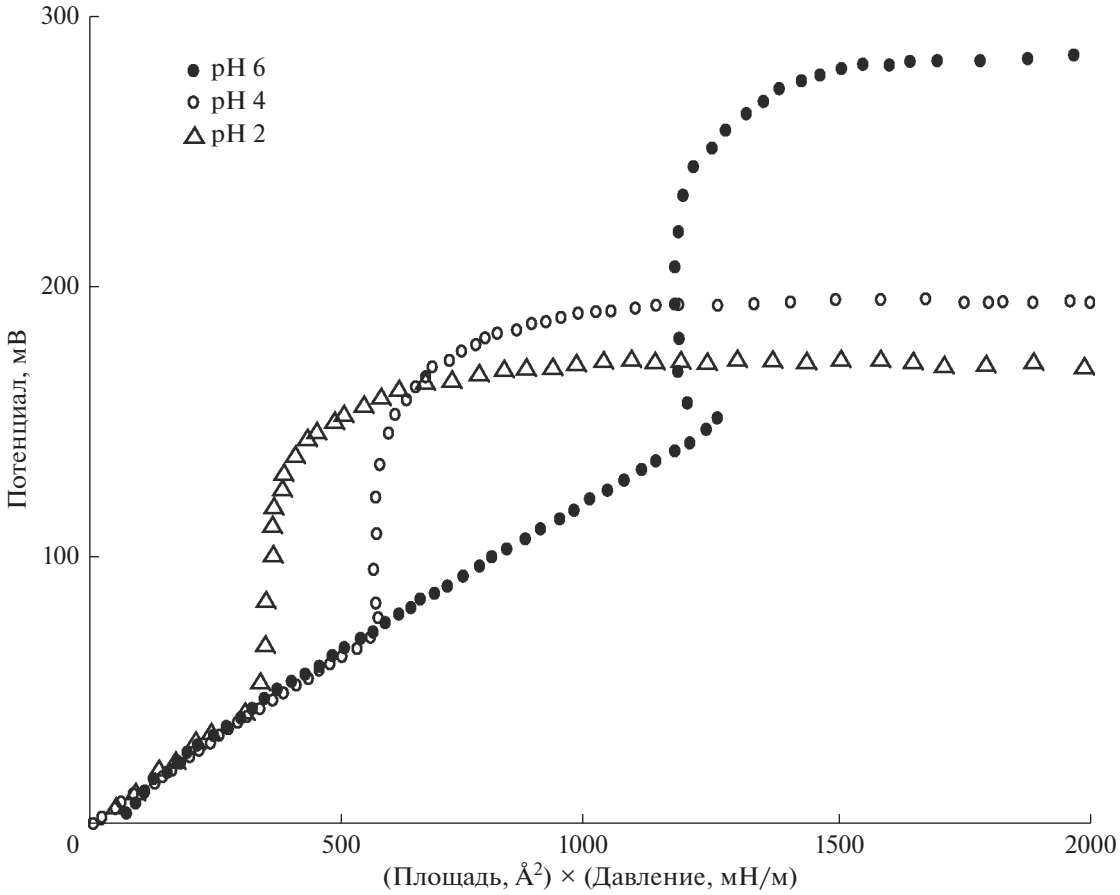

Рис. 3. Вольта-потенциал монослоев DMPS на поверхности водного раствора 10 мМ KCl при указанных значения pH по данным работы [26]. Ось абсцисс – работа по сжатию монослоя.

ных результатов еще недостаточно для подтверждения такой интерпретации.

Особый интерес представляют измерения диаграмм сжатия в тех случаях, когда присутствующие в субфазе заряженные молекулы способны встраиваться в монослой. В литературе описаны исследования с применением монослойной техники некоторых анестетиков, среди которых наиболее изучен хлорпромазин и родственные ему соединения [37]. Количественное описание процесса встраивания молекул CPZ в монослой из фосфатидилхолинов проведено в работе [22] на основании смещения диаграмм сжатия в шкале площадей. Присутствие неорганических катионов заметно влияет на этот процесс, поскольку молекулы CPZ также несут положительный заряд в нормальных условиях [23]. Однако ожидаемые в этом случае электростатические эффекты оставались малоизученными. Предлагаемый выше подход, основанный на прямой регистрации Вольта-потенциала монослоев из отрицательно заряженного липида DMPS позволяет получить важные дополнительные сведения о молекулярном механизме встраивания CPZ.

На рис. 5 приведены экспериментальные зависимости латерального давления в монослое DMPS от площади на молекулу фосфолипида, измеренные при нескольких концентрациях CPZ в фоно-

Таблица 2. Параметры, используемые для аппроксимации данных рис. 4 с применением соотношения (2)

Концентрация CPZ, мкМ	A_0, Å^2	A_e, Å^2	P_0, мН/м	K_p, м/мН
0	51.6	35.1	0.55	10.0
1	61.8	42.9	0.86	18.4
10	60.9	58.6	1.44	24.3
100	72.1	49.4	3.97	21.4

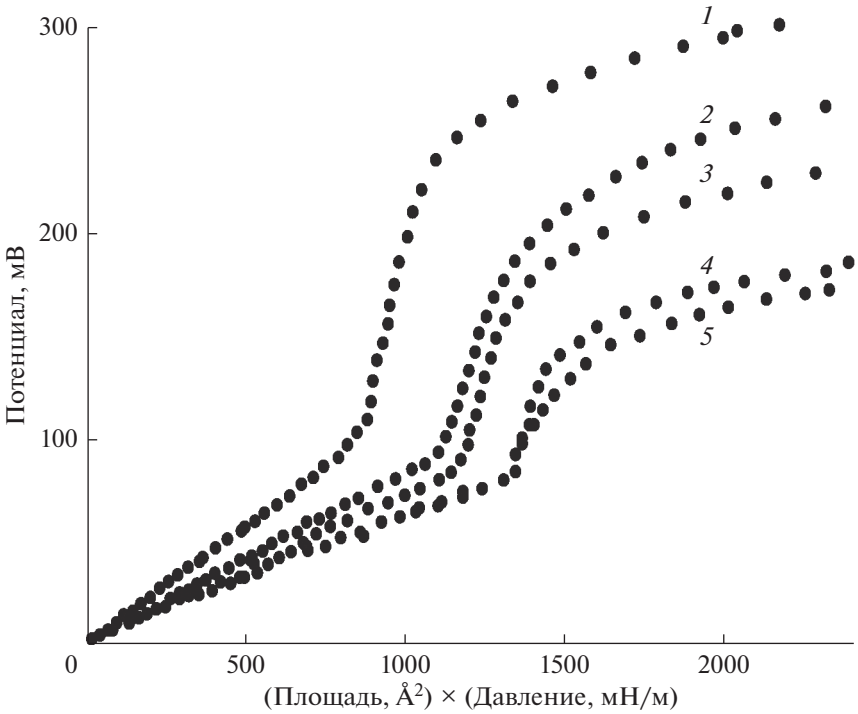

Рис. 4. Вольта-потенциал монослоев DMPS, измеренный в присутствии полилизина PLL-12 в субфазе с 10 мМ KCl в концентрации, равной 0, 0.27, 0.66, 3.32 и 26.6 мкг/мл для кривых *1*, *2*, *3*, *4* и *5* соответственно. Ось абсцисс – работа по сжатию монослоя.

вом электролите. Теоретические кривые построены по формуле (2) с параметрами, найденными при аппроксимации экспериментальных данных и приведенными в табл. 2. Следует отметить, что аппроксимация этих данных проведена без дополнительных условий. Например, не фиксируя минимальный размер площади "жесткого ядра" молекул липида A_0. В данном случае этот размер может оставаться неизменным, если полагать, что посторонние молекулы CPZ включаются только в "мягкое" окружение липида. Однако такое допущение потребует дополнительных сведений о структуре комплексов липид–CPZ. Тем не менее можно заключить, что встраивание молекул CPZ приводит не только к увеличению эффективного размера молекул липида, но и существенно повышает механическую жесткость монослоя, а значит, и работу по его сжатию. Обращает на себя внимание участок кривых, отражающий фазовые изменения в монослое, который перемещается в область высоких значений давления. Этот факт заставляет предположить, что присутствие молекул CPZ в монослое препятствует сближению молекул фосфолипида и образованию конденсированной LC-фазы. По мере увеличения давления эти молекулы удаляются из монослоя, и LC-фаза реализуется.

В контексте приведенных выше результатов требуется оценить взаимосвязь электростатических и механохимических характеристик липида в присутствии заряженных молекул CPZ. При этом следует учесть, что молекулы CPZ имеют pK = 8.6 [38], т.е. в нормальных условиях они протонированы и несут единичный положительный заряд, тогда как полярные группы фосфатидилсерина ионизованы полностью и имеют суммарный единичный отрицательный заряд с pK около 3.0 (см., например, [39] и результаты электрокинетических измерений в суспензии липосом [10]). Эти факты известны в литературе [18, 40] и подтверждены нами измерением дзета-потенциала липосом из фосфатидилсерина в присутствии хлорпромазина (рис. 6). Электрокинетические данные доказывают, что в области нейтральных pH адсорбция молекул CPZ меняет среднюю плотность поверхностного заряда липидных мембран и может даже менять ее знак. Измерение дзета-потенциала позволяет оценить величину поверхностного потенциала коллоидных частиц (липосом), а затем связать его с плотностью заряда поверхности, учитывая распределение CPZ между поверхностью и объемом раствора. Подробное описание теоретической модели электрического двойного слоя, используемой для анализа электрокинетических данных, приведено в обзоре [41]. Здесь ограничимся лишь основными

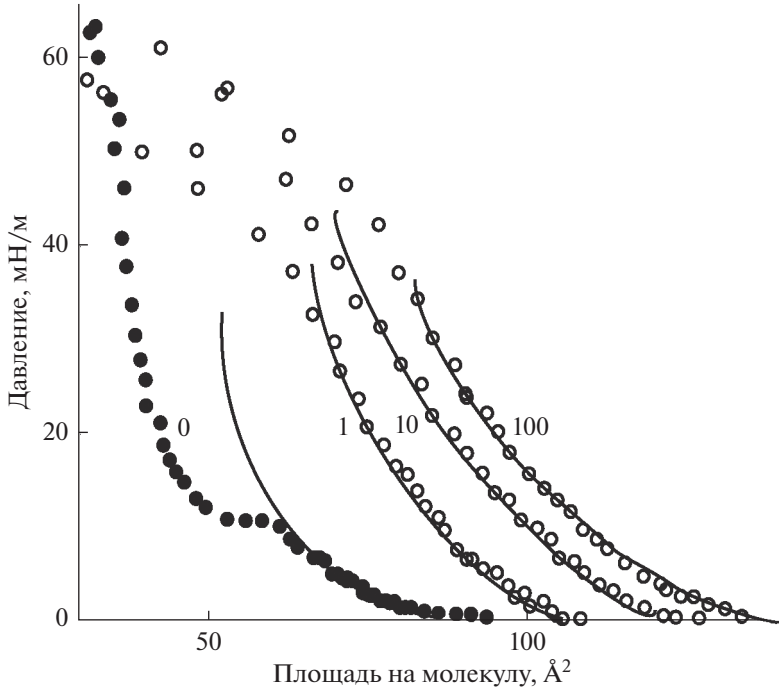

Рис. 5. Диаграммы сжатия монослоя DMPS (черные точки) и в присутствии хлорпромазина (светлые точки) в субфазе 10 мМ KCl в концентрации, указанной около кривых в мкМ. Сплошные теоретические кривые построены по уравнению (2) с параметрами, указанными в табл. 2.

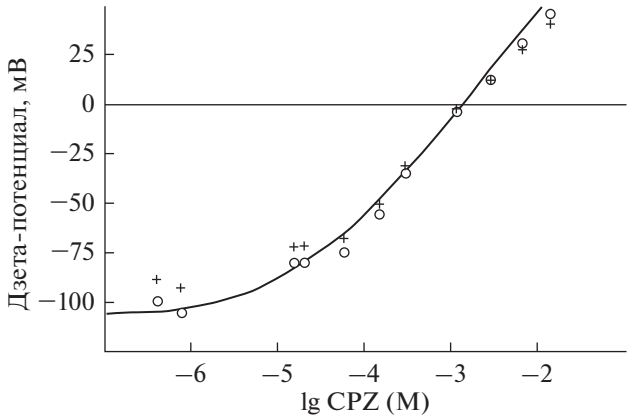

Рис. 6. Зависимость электрокинетического дзета-потенциала липосом из фосфатидилсерина в растворе 10 мМ KCl, измеренная при увеличении концентрации CPZ в суспензии. Сплошная кривая построена в рамках модели Гуи–Чепмена–Штерна с учетом количества адсорбированных на поверхности молекул CPZ, пропорционального их приповерхностной концентрации.

результатами, полученными при количественном анализе результатов, представленных на рис. 5–7, и необходимыми для решения поставленных в данной работе задач.

Для описания процесса заряжения межфазной границы работу по сжатию монослоя W прежде всего следует дополнить оценкой энергии, затраченной на встраивание в него заряженных молекул. Концентрация заряженных молекул хлорпромазина вблизи поверхности C_s связана с их объемной концентрацией в субфазе C_0 соотношением Больцмана:

$$C_S = C_0 \exp\frac{e\phi}{kT}. \quad (4)$$

Поверхностный потенциал ϕ в этом соотношении представляет собой падение потенциала вблизи поверхности в диффузной части граничного по-

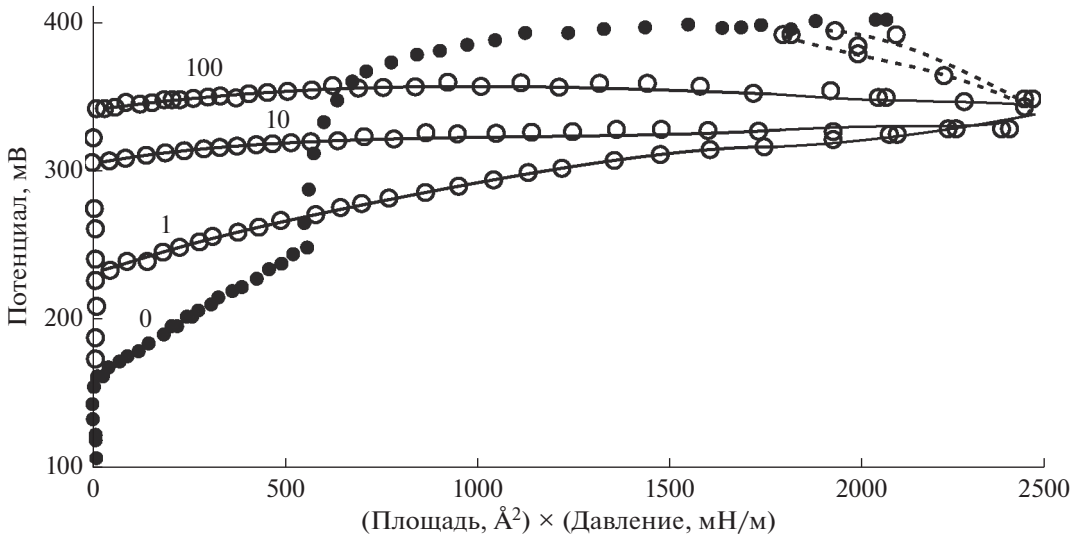

Рис. 7. Вольта-потенциал монослоя DMPS, измеренный в присутствии CPZ в субфазе 10 мМ KCl в концентрации, указанной около кривых в мкМ. Ось абсцисс – работа по сжатию монослоя. Сплошные теоретические кривые построены по уравнению (8) с параметрами, указанными в табл. 2 и 3, пунктиром показана область перехода от LE- к LC-состоянию монослоя после удаления из него молекул CPZ.

тенциала, который влияет на электрофоретическую подвижность липосом. Его величина зависит от ионного состава среды и в рамках модели Гуи–Чепмена–Штерна дает возможность оценить вклад адсорбированных ионов в изменение поверхностного заряда. При распределении молекул между липидом и водным раствором поверхностная плотность встроенных в бислой молекул пропорциональна их приповерхностной концентрации $C_L = K_d C_s$, где, согласно электрокинетическим измерениям, $K_d = 0.5$ М$^{-1}$. С другой стороны, встраиванию молекул в монослой препятствует поверхностное давление, а приращение площади, приходящейся на каждую молекулу фосфолипида, экспоненциально связано с давлением в монослое (2). Встраивание новых молекул в монослой требует затрат энергии и сопровождается увеличением давления в монослое. Эта дополнительная энергия может быть учтена выражением, аналогичным соотношению Больцмана (4), в котором концентрация встроенных молекул CPZ связана с давлением в монослое выражением

$$C_L = K_{Ld} \exp\left(-\frac{P}{K_P}\right). \quad (5)$$

Используя соотношения (4) и (5), нетрудно получить линейную зависимость диффузной компоненты потенциала ϕ от давления в монослое:

$$\frac{e\phi}{kT} = -\frac{P}{K_P} + \text{const}, \text{ где } \text{const} = \ln\left(\frac{K_{Ld}}{K_d C_0}\right). \quad (6)$$

Это означает, что величина потенциала при встраивании положительно заряженных молекул в монослой с увеличением давления должна смещаться в отрицательном направлении, приближаясь к его значению для исходного монослоя отрицательно заряженных молекул DMPS. В конечном итоге работа по сжатию монослоя W описывается выражением:

$$W = AP + \frac{kT}{e}\left[-\frac{P}{K_P} + \text{const}\right]. \quad (7)$$

Предполагая, как и прежде, что заряжение межфазной границы пропорционально работе, затраченной на сжатие монослоя, экспериментальные зависимости рис. 7 были аппроксимированы выражением (8)

$$\Delta E = N\left[A_0 P + A_e P \exp\left(-\frac{P}{K_p}\right)\right] + D\left[-\frac{P}{K_p} + \text{const}\right] + \phi_0, \quad (8)$$

где помимо параметров, определенных ранее и указанных в табл. 2, использованы дополнительные параметры N, D, const и ϕ_0, численные значения которых найдены при аппроксимации данных и приведены в табл. 3. Изменение концентрации CPZ приводит к смещению кривых на величину, определяемую значением ϕ_0. Поскольку значение потенциала в начале каждого опыта

Таблица 3. Параметры, используемые для аппроксимации данных рис. 7 с применением соотношения (8), дополняющие данные табл. 2

Концентрация CPZ, мкМ	*N*	*D*	const	ϕ_0, мВ
0	55	0	0	–165
1	32	50	14	460
10	14	50	14	390
100	12	50	14	360

определяется во многом случайными причинами, то более информативным параметром оказывается соотношение двух других слагаемых в выражении (9). Значения *N* и *D* определяют, соответственно, вклад в потенциал упругих характеристик монослоя и процесса “выдавливания” из него заряженных молекул CPZ. Теоретические зависимости на рис. 7 построены без приведения значений потенциала к началу координат. Они достаточно хорошо описывают полученную экспериментально взаимосвязь Вольта-потенциала и энергию монослоя при встраивании в него заряженных молекул в той области, где начальный наклон кривых несколько уменьшается по мере сжатия монослоя. Однако затем значения потенциала снова возрастают и приближаются к максимальным значениям, характерным для исходного монослоя DMPS. Эта особенность кривых вблизи точки фазового перехода заметна также у некоторых кривых рис. 3, где работа по сжатию монослоя частично убывает при почти неизменной величине потенциала. Этот факт отражает повышенную “податливость” монослоя к сжатию, поскольку более конденсированное его состояние оказывается энергетически выгоднее. А значит, кооперативный процесс фазового перехода и возвращение монослоя в конденсированное состояние происходит только после удаления посторонних молекул. Конечно, посторонними можно считать даже молекулы воды в гидратной оболочке фосфолипида, которые в какой-то степени препятствуют сближению молекул фосфолипида. Однако в случае заряженных молекул CPZ этот эффект становится более заметным. Судя по оценкам, сделанным на основании приведенной выше модели, участие этих молекул в повышении упругих свойств монослоя и их вклад в механическую работу его сжатия (параметр *D* в табл. 3) остается одинаковым, а доля энергии латерального взаимодействия молекул липидов (параметр *N*) убывает по мере увеличения концентрации CPZ в субфазе, поскольку уменьшается область контакта между молекулами фосфолипидов Конечно, такая интерпретация остается во многом умозрительной пока не получит независимого экспериментального подтверждения и подробного анализа подобных систем, симулированных методами молекулярной динамики.

Резюмируя приведенные выше факты, можно утверждать, что взаимосвязь Вольта-потенциала с механохимическими характеристиками монослоя отражается на его зависимости от работы по латеральному сжатию липидов, которая может существенно различаться в LE- и LC-состояниях. В данной работе основное внимание уделяется жидкокристаллическому состоянию липидов, характерному для большинства фосфолипидов в биологических мембранах. Как видно из приведенных данных, в тех областях площадей и давлений, где состояние липидов остается жидкокристаллическим, наблюдается линейная связь граничного потенциала и работы по сжатию монослоев. В тех случаях, когда присутствующие в водном окружении ионы влияют только на ионизацию полярных групп и величину поверхностной плотности заряда, эта работа расходуется на заряжение монослоя одинаковым образом для всех типов ионов. Адсорбция крупных полипептидов на основе лизина уменьшает вклад механохимических изменений в монослое в заряжение границы раздела липид–вода, хотя такие пептиды не погружаются в монослой и формируют полимерный слой в области диффузной части электрического двойного слоя. Заряженные органические молекулы, способные встраиваться в липидные мембраны и монослои, приводят к тому, что их вклад в механохимические изменения в монослое убывает по мере его сжатия. В этом случае нарушается линейная зависимость граничного потенциала от работы по сжатию монослоя, поскольку существенный вклад в эту работу вносит процесс удаления заряженных молекул. Выше использовано одно из возможных количественных описаний таких зависимостей в предположении, что энергия проникновения молекул в липидный монослой описывается зависимостью от латерального давления, аналогичной по форме соотношению Больцмана. Однако простая экспериментальная корреляция изменений Воль-

та-потенциала и работы сжатия монослоя позволяет различать качественно разные варианты взаимодействия ионов и молекул с поверхностью мембран, даже не обращаясь к конкретным молекулярным моделям.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № АААА-А19-119010990119-9), а также проекта РФФИ № 19-04-00242-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Laroche G., Carrier D., Pezolet M. 1988. Study of the effect of poly-l-lysine) on phosphatidic acid and phosphatidylcholine/phosphatidic acid bilayers by Raman spectroscopy. *Biochemistry*. **27**, 6220–6228.
2. Kim J., Mosior M., Chung L.A., Wu H., McLaughlin S. 1991. Binding of peptides with basic residues to membranes containing acidic phospholipids. *Biophys. J.* **60** (1), 135–148.
3. Rink T., Bartel H., Jung G., Bannwarth W., Boheim G. 1994. Effects of polycations on ion channels formed by neutral and negatively charged alamethicins. *Eur. Biophys. J.* **23** (3), 155–165.
4. Arbuzova A., Wang L., Wang J., Hangyas-Mihalyne G., Murray D., Honig B., McLauglin S. 2000. Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry*. **39,** 10330–10339.
5. Harries D., May S., Ben Shaul A. 2002. Adsorption of charged macromolecules on mixed fluid membranes. *Coll. Surfs. A: Physicochem. Eng. Aspects*. **208** (1–3), 41–50.
6. Wu Z., Cui Q., Yethira A. 2013. Why do arginine and lysine organize lipids differently? Insights from coarse-grained and atomistic simulations. *J. Phys Chem. B.* **117**, 12145–12156.
7. Vorobyov I., Allen T.W. 2011. On the role of anionic lipids in charged protein interactions with membranes. *Biochim. Biopsys. Acta*. **1808**, 1673–1683.
8. Doltchinkova V., Vitkova V. 2020. Polylysine effect on thylakoid membranes. *Biophys. Chem.* **266**, 106440
9. Alvares D.S., Cabrera M.P.S., Neto J.R. 2016. Strategies for exploring electrostatic and nonelectrostatic contributions to the interaction of helical antimicrobial peptides with model membranes. In: *Advances in biomembranes and lipid self-assembly.* London, UK: Elsevier Inc., p. 43–73.
10. Ермаков Ю.А., Авербах А.З., Арбузова А.Б., Сухарев С.И. 1998. Липидные и клеточные мембраны в присутствии гадолиния и других ионов с высоким сродством к липидам. 2 Дипольная компонента граничного потенциала мембран с разным поверхностным зарядом. *Биол. мембраны*. **15** (3), 330–341.
11. Ермаков Ю.А. 2005. Биоэлектрохимия липидных мембран. *Рос. хим. журн.* **49** (5), 114–121.
12. Ermakov Y.A., Averbakh A.Z., Yusipovich A.I., Sukharev S. 2001. Dipole potentials indicate restructuring of the membrane interface induced by gadolinium and beryllium ions. *Biophys. J.* **80** (4), 1851–1862.
13. Ermakov Yu., Kamaraju K., Dunina-Barkovskaya A., Vishnyakova K., Egorov Y., Anishkin A., Sukharev S. 2017. High-affinity interactions of beryllium (2+) with phosphatidylserine result in a cross-linking effect reducing surface recognition of the lipid. *Biochemistry*. **56**, 5457–5470.
14. Hammoudah M.M., Nir S., Isac T., Kornhouser R., Stewart T.P., Hui S.W., Vaz W.L.C. 1979. Intreraction of La^{3+} with phosphatidylserine vesicles: Binding, phase transition, leakage and fusion. *Biochim. Biopsys. Acta*. **558**, 338–343.
15. Han K.-H., Tong Y., Huang W., Wang E. 2002. Study of the interaction between lanthanide ions and a supported bilayer lipid membrane by cyclic voltammetry and ac impedance. *J. Electroanal. Chem.* **523**, 136–141.
16. Li X., Zhang Y., Ni J., Chen J., Hwang F. 1994. Effect of lanthanide ions on the phase behaviour of dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar liposomes. *J. Inorg. Biochem*. **53**, 139–149.
17. Ermakov Y.A., Makhmudova S.S., Averbakh A.Z. 1998. Two components of boundary potentials at the lipid membrane surface: electrokinetic and complementary methods studies. *Coll. Surf. A – Physicochem. Eng. Aspects*. **140** (1–3), 13–22.
18. Barthel D., Zschoernig O., Lange K., Lenk R., Arnold K. 1988. Interaction of electrically charged drug molecules with phospholipid membranes. *Biochim. Biopsys. Acta*. **945**(2), 361–366.
19. Jutila A., Soderlund T., Pakkanen A.L., Huttunen M., Kinnunen P.K. 2001. Comparison of the effects of clozapine, chlorpromazine, and haloperidol on membrane lateral heterogeneity. *Chem. Phys. Lipids*. **112**(2), 151–163.
20. Nussio M.R., Sykes M.J., Miners J.O., Shapter J.G. 2009. Kinetics membrane disruption due to drug interactions of chlorpromazine hydrochloride. *Langmuir*. **25** (2), 1086–1090.
21. Steinkopf S., Simeunovic A., Bustad H.J., Ngo T.H., Sveaass H., Gjerde A.U., Holmsen H. 2010. pH-dependent interaction of psychotropic drug with glycerophospholipid monolayers studied by the Langmuir technique. *Biophys. Chem.* **152** (1–3), 65–73.
22. Agasosler A.V., Holmsen H. 2001. Chlorpromazine associates with phosphatidylserines to cause an increase in the lipid's own interfacial molecular area role of the fatty acyl composition. *Biophys. Chem.* **19**, 37–47.
23. Agasosler A.V., Tungodden L.M., Cejka D., Bakstad E., Sydnes L.K., Holmsen H. 2001. Chlorpromazine-induced increase in dipalmitoylphosphatidylserine surface area in monolayers at room temperature. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 817–825.
24. Ермаков Ю.А. 2011. Взаимосвязь механических и электростатических характеристик монослоя димиристоилфосфатидилсерина. *Биол. мембраны*. **28** (5), 408–414.

25. Ermakov Yu.A., Asadchikov V.E., Roshchin B.S., Volkov Yu.O., Khomich D.A., Nesterenko A.M., Tikhonov A.M. 2019. Comprehensive study of the LE–LC phase transition in DMPS monolayers: Surface pressure, Volta potential, X-ray reflectivity and MD modeling. *Langmuir*. **35**, 12326–12338.
26. Ermakov Y.A., Kamaraju K., Sengupta K., Sukharev S. 2010. Gadolinium ions block mechanosensitive channels by altering the packing and lateral pressure of anionic lipids. *Biophys. J*. **98** (6), 1018–1027
27. Shapovalov V.L. 1998. Interaction of DPPC monolayer at air–water interface with hydrophobic ions. *Thin Solid Films*. **327–329**, 599–602.
28. Молотковский Р.Ю., Ермаков Ю.А. 2014. Два возможных подхода к количественному анализу диаграмм сжатия липидного монослоя. *Биол. мембраны*. **31** (6), 410–415.
29. Cevc G., Marsh D. 1987. *Cell biology*: A series of monographs. New York: Willey-Interscience Publ. **V. 5**. 1442 p.
30. Marukovich N., McMurray M., Finogenova O., Nesterenko A., Batishchev O., Ermakov Yu. 2013. Interaction of polylysines with the surface of lipid membranes: The electrostatic and structural aspects. In*: Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Ed. Iglic A. et al. Amsterdam, London, San Diego: Elsevier Acad. press, p. 139–166.
31. Финогенова О.А., Батищев О.В., Инденбом А.В., Золотаревский В.И., Ермаков Ю.А. 2009. Адсорбция полилизинов на липидных мембранах и слюде. *Биол. мембраны*. **26** (5), 429–436.
32. Финогенова О.А., Филинский Д.В., Ермаков Ю.А. 2008. Электростатические эффекты при адсорбции и десорбции полилизинов на поверхности липидных мембран разного состава. *Биол. мембраны*. **25** (3), 217–226.
33. Марукович Н.И., Нестеренко А.М., Ермаков Ю.А. 2014. Структурные факторы во взаимодействии лизина и полилизинов с липидными мембранами. *Биол. мембраны*. **31** (6), 401–409.
34. Асадчиков В.Е., Тихонов А.М., Волков Ю.О., Рощин Б.С., Ермаков Ю.А., Рудакова Е.Б., Дьячкова И.Г., Нуждин А.Д. 2017. Рентгеновское исследование структуры монослоев фосфолипида на поверхности воды. *Письма в ЖЭТФ*. **106** (8), 515–520.
35. Тихонов А.М., Асадчиков В.Е., Волков Ю.О., Рощин Б.С., Ермаков Ю.А. 2017. Ренгеновская рефлектометрия монослоев DMPS на водной подложке. *ЖЭТФ*. **152**(12), 1233–1240.
36. Ермаков Ю.А., Асадчиков В.Е., Волков Ю.О., Нуждин А.Д., Рощин Б.С., Хонкимаки В., Тихонов А.М. 2019. Электростатические и структурные эффекты при адсорбции полилизина на поверхности монослоя DMPS. *Письма в ЖЭТФ*. **109** (5), 340–346.
37. Steinkopf S., Simeunovic A., Bustad H.J., Ngo T.H., Sveaass H., Gjerde A.U., Holmsen H. 2010. pH-dependent interaction of psychotropic drug with glycerophospholipid monolayers studied by the Langmuir technique. *Biophys. Chem*. **152** (1–3), 65–73.
38. Wajnberg E., Tabak M., Nussenzveig P.A., Lopes C.M.B., Louro S.R.W. 1988. pH dependent phase transition of chlorpromazine micellat solutions in the physiological range. *Biochim. Biopsys. Acta*. **944**, 185–190.
39. Eisenberg M., Gresalfi T., Riccio T., McLaughlin S. 1979. adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids. *Biochemistry*. **18** (23), 5213–5223.
40. Bennouna M., FerreiraMarques J., Banerjee S., Caspers J., Ruysschaert J.M. 1997. Interaction of chlorpromazine with phospholipid membranes: A monolayer and a microelectrophoresis approach. *Langmuir*. **13** (24), 6533–6539.
41. Ермаков Ю.А. 2000. Равновесие ионов вблизи липидных мембран – эмпирический анализ простейшей модели. *Коллоидн. журн*. **6** (4), 437–449.

Boundary Potential and the Energy of Lipid Monolayer Compression at the Liquid Expanded State

Yu. A. Ermakov*

Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia
**e-mail: yury.a.ermakov@gmail.com*

Compression diagrams were obtained and analyzed for monolayers composed from DOPC, POPC, DMPC, DPPC, DphPC, and DMPS at the surface of solutions containing KCl, CaCl2, or BeCl2 and in the presence of polylysine (PLL) or chlorpromazine (CPZ). Elastic properties of monolayers are characterized by the area of lipid molecules, presented as an uncompressible area with a soft shell, the size of which exponentially depends on the lateral pressure and the coefficient of elasticity. This assumption describes well the shape of the lipid compression diagrams, including lipids with saturated hydrocarbon chains (DPPC and DMPS) in the region, where they exhibit liquid crystal properties (liquid expanded state, LE). All lipids show changes in the interfacial Volta potential in this region; these changes linearly depend on the effective value of the work applied to compress the monolayer. Choosing for zero value of the Volta potential its magnitude at the point with a lateral pressure of about 1 mN/m, the slope of linear section of this dependence was estimated. The slope of this dependence makes it possible to identify the different type of membrane-active compounds affected on the elastic and electrostatic characteristics of the monolayer. It turned out that this slope is practi-

cally independent of the pH and ionic composition of the aqueous subphase but decreases upon adsorption of PLL polypeptides on the surface of the DMPS monolayer. The adsorption of small positively charged CPZ molecules on this monolayer leads to the deviation in the potential vs work dependence from the linear. A quantitative description of this deviation is in a good agreement with the assumption that CPZ molecules are incorporated into the monolayer. Their contribution to the change in the energy of the monolayer and the Volta potential is described at varied CPZ bulk concentration by the amount of incorporated molecules affected on lateral pressure similar to the Boltzmann relation.

Keywords: lipid monolayers, compression diagram, boundary (Volta) potential, work of compression, phase transition, expanded liquid