

ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ УГЛЕВОДОРОДНЫХ ЦЕПЕЙ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ, ЛАТЕРАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ДЛЯ КИСЛОРОДА

Гуськова Р.А., Васильев Н.С., Локтюшкин А.В., Иванов И.И.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: ivanov36@mail.ru

Поступила в редакцию: 04.07.2018.

Аннотация. С помощью сканирующего электрохимического микроскопа (СЭХМ) с инвертированным открытым платиновым электродом (ИОПЭ), интегрированного с ванной Ленгмюра, исследовали влияние длинноцепочечных углеводов на проницаемость мембран для O_2 . Установлено, что проницаемость мембран из длинноцепочечных жирных кислот (C_{18} – стеариновая или C_{20} – арахидовая) резко снижается при возрастании поверхностного давления в диапазоне 20-50 мН/м. При добавлении холестерина к этим мембранам (до 10 %) влияние поверхностного давления на скорость переноса O_2 ингибируется. Проницаемость мембран из липидов с более короткими цепями (C_{16} и менее) остается высокой независимо от величины латерального давления. Физиологическая роль обнаруженных явлений обсуждается в связи с особенностями газообмена O_2 через мембрану эритроцитов в микрокапиллярах кровяного русла. Рассматривается формирование вытянутой формы клетки в микрокапилляре, увеличение площади мембраны клетки, снижение поверхностного натяжения в мембране, минимизация зазора между мембраной эритроцита и стенками микрокапилляра, движение клетки вдоль капилляра, скорость и причины возвращения клетки к нормальной двояковогнутой форме.

Ключевые слова: проницаемость липидных мембран для кислорода, длинноцепочечные липиды, латеральное давление, холестерин, СЭХМ.

Аэробным животным и человеку для обеспечения нормальной жизнедеятельности необходим постоянный приток молекулярного кислорода от легких к клеткам организма. Кислород сравнительно плохо растворяется в водных средах; при физиологических температурах его равновесная с воздухом концентрация не превышает 250 мкМ. Такого количества O_2 в сосудистом русле недостаточно для обеспечения потребностей живых организмов в кислороде. Резкое увеличение кислородной емкости циркулирующей жидкости (крови) у животных и человека обеспечивают специализированные клетки крови – эритроциты. Суммарный объем этих клеток в крови человека (гематокрит) в норме лишь чуть меньше 50 % от общего объема крови. Эритроциты способны концентрировать O_2 в цитоплазме до 20-22 мМ в результате быстрого обратимого связывания O_2 с гемоглобином. За время круговорота крови в организме человека (продолжительностью 23-25 с), интенсивный трансмембранный перенос кислорода происходит, когда эритроцит протискивается через микрокапилляры кровяного русла. В тканевых капиллярах мышц за время менее 1 с эритроцит человека в норме отдает окружающим тканям 5-7 мМ O_2 . Пополнение эритроцита кислородом в капиллярах легких происходит еще быстрее, примерно за четверть секунды [1, 2]. Столь высокая интенсивность этих реверсивных потоков означает, что в нормальных условиях мембрана эритроцитов легко проницаема для кислорода.

Механизмы, обеспечивающие высокую проницаемость мембран эритроцитов для кислорода, однако, все еще недостаточно ясны. Существуют две основные точки зрения на причины высокой проницаемости мембран эритроцитов для кислорода. Первая, в настоящее время наиболее распространенная, связывает высокую скорость проникновения O_2 в клетку через плазматическую мембрану эритроцита с высокой диффузионной проницаемостью липидного бислоя мембраны для O_2 (базальная проницаемость). Согласно второй – полагают, что базальная диффузия O_2 через липидный бислой идет с малой скоростью, а высокую проницаемость мембраны эритроцита для O_2 обеспечивают белковые поры (каналы) плазматической мембраны клетки.

В основе первой точки зрения лежат главным образом результаты серии исследований с применением встроенных в мембрану O_2 -чувствительных флуоресцентных или спиновых зондов. В этих работах на основании зависимостей от кислорода квантовых выходов флуоресценции или характера изменения спектров парамагнитных зондов в мембранах, авторы вычислили диффузионную подвижность O_2 в ближайшем окружении зондов и отсюда рассчитали величину коэффициента проницаемости липидного бислоя для O_2 (0,1-0,3 м/с). Отсюда следует, что проницаемость липидного бислоя для кислорода соизмерима с проницаемостью слоя воды аналогичной толщины. [3-6]. Проницаемость мембран эритроцитов для O_2 исследовали также в серии работ, выполненных методом остановленного потока (быстрого перемешивания). Метод позволяет регистрировать миллисекундную кинетику переноса кислорода через мембрану эритроцитов по изменению во времени соотношения окси- и дезоксигемоглобина в клетке после быстрого перемешивания суспензии дезокси-эритроцитов с окси-средой [7]. Оказалось, что скорость поглощения O_2 дезокси-эритроцитами не зависит от скорости химической реакции взаимодействия O_2 с гемоглобином в клетке (константа скорости этой реакции $\approx 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$), а определяется интенсивностью трансмембранного диффузионного поступления O_2 из внешней среды в цитоплазму. При этом скорость потребления O_2 клеткой превышает скорость его диффузионного поступления из внешнего объема среды инкубации. В результате в процессе оксигенации у поверхности клетки

концентрация O_2 снижается, вследствие чего формируется так называемый неперемешиваемый слой (НС). Диффузионное сопротивление данного слоя определяется выражением $R_{нс} = \delta/D$, где D – коэффициент диффузии O_2 в воде ($D = 2,1 \cdot 10^{-5}$ см²/с при 20 °С), а δ – толщина НС. Расчеты показали, что в разбавленных суспензиях клеток диффузионное сопротивление неперемешиваемого слоя значительно больше сопротивления мембраны. Откуда следует, что мембрана фактически не влияет на скорость поступления кислорода в клетку [8, 9]. Этот вывод и результаты, полученные с помощью флуоресцентных и парамагнитных зондов, казались столь убедительными и исчерпывающими, что дальнейшие исследования роли мембраны в кислородном газообмене эритроцитов с помощью указанных методов были фактически свернуты более 30 лет тому назад. Постепенно дискуссионные детали и выводы проведенных исследований потускнели; сохранился лишь устойчивый постулат, что «мембрана фактически не влияет на скорость поступления кислорода в клетку». Между тем, утверждение о высокой базальной диффузионной проницаемости липидного бислоя для кислорода плохо согласуется с рядом важных фактов и соображений:

- представления о высокой диффузионной подвижности кислорода в липидах мембран плохо согласуются с высокой вязкостью липидного бислоя мембран, которая более чем на два порядка превышает вязкость водной фазы [10-12]. В соответствии с законами диффузии следует ожидать, что величины молекулярной подвижности кислорода в липидах мембран будут также значительно ниже, чем в воде;

- участие неперемешиваемых слоев в процессе оксигенации одиночных эритроцитов в разбавленных модельных суспензиях понятно. Однако в микрокапиллярах кровяного русла *in vivo* газообмен протекает в совершенно иных условиях, где роль этих слоев вызывает серьезные сомнения. Наиболее интенсивный газообмен идет, когда эритроцит проходит через микрокапилляры мышц и альвеол, диаметр которых 2-3 мкм. Диаметр же большого сечения двояковогнутого эритроцита в норме составляет 6-8 мкм. Протиснуться в столь узкий сосуд эритроциту позволяет его исключительная пластичность. При этом минимальный зазор между внутренней стенкой капилляра и мембраной эритроцита, а также непрерывное поступательное продвижение клетки вдоль капилляра обеспечивают высокую эффективность газообмена. То есть газообмен идет в условиях, когда возможность формирования неперемешиваемых слоев минимизирована;

- в последнее время интенсивно исследуются и обсуждаются возможности ряда малых незаряженных молекул и газов (CO_2 , NO , NH_3 , H_2O , H_2O_2) проникать через биологические мембраны при участии белковых пор и каналов [13-15]. Высказывается возможность участия белковых каналов и в обеспечении высокой проницаемости мембран эритроцитов человека и для O_2 . Наиболее вероятными кандидатами на роль кислородной поры являются белки аквапорин 1 (AQP1) и белок резус фактора Rh, которые в относительно высоких количествах содержится в мембране эритроцитов [16]. Очевидно, что при высокой базальной проницаемости O_2 через липидный бислой мембран, функция белковых каналов в мембране теряет физический смысл,

- недавние прямые измерения диффузионных потоков O_2 через липидные мембраны с помощью специальных методов, в частности, сканирующего электрохимического микроскопа (СЭХМ) показали, что коэффициент трансмембранной проницаемости монослойных липидных мембран для O_2 $P_m \approx 10^{-3}-10^{-4}$ м/с, то есть на 2-3 порядка ниже, чем у слоя воды аналогичной толщины [17]. Близкие величины коэффициента проницаемости липидных мембран были получены независимым методом и для CO_2 – другого респираторного газа, близкого по физико-химическим свойствам к O_2 [18].

Таким образом, вопрос о том, липидный бислой, белковые поры, а возможно и их комбинация определяют проницаемость мембран эритроцитов для O_2 , все ещё окончательно не решен и нуждается в дополнительных исследованиях.

Основной концепцией трансмембранного переноса простых газов (кислорода), других малых частиц и ионов через биологические мембраны до последнего времени является модель растворения-диффузии, известная как правило Мейера-Овертона. Эта концепция позволяет представить плотность трансмембранного потока J в стационарных условиях как его интенсивность в липидном бислое, используя диффузионный закон Фика и вычисляя разность концентраций частиц в бислое от одного его края до другого на основании коэффициента распределения частиц между углеводородной (липидной) фазой и водой:

$$J = -D_m \gamma \Delta C / h = -P_m \Delta C \text{ при } P_m = D_m \gamma / h,$$

где P_m – коэффициент проницаемости липидного бислоя мембран для частицы; D_m – коэффициент диффузии частицы в липидном бислое вдоль оси x , нормальной к поверхности мембраны; h – толщина бислоя; γ – коэффициент распределения частиц между липидным слоем мембраны и водной фазой вблизи мембраны ($\gamma = C'/C$); $\Delta C = C_1 - C_2$ – разность концентраций частицы в водных фазах с двух сторон мембраны; $\Delta C' = \gamma C_1 - \gamma C_2 = \gamma \Delta C$ – разность концентраций кислорода в липидном слое мембраны от одного его края до другого.

Молекула кислорода не заряжена и не полярна; ее постоянный дипольный момент практически равен нулю, низка поляризуемость $\alpha \approx 1,57 \cdot 10^{-24}$ см³ и достаточно высок потенциал ионизации $I \approx 12,2$ эВ. В обычных условиях кислород слабо взаимодействует как с водой, так и с неполярными углеводородами. В результате он сравнительно плохо растворяется в этих средах. В равновесии при нормальных условиях коэффициент распределения кислорода в двухфазной системе длинноцепочечные углеводороды/вода, составляет ~10. Эту

величину часто принимают в качестве коэффициента распределения кислорода между липидами клеточных мембран и водной фазой. Между тем, такое заключение представляется недостаточно корректным.

Растворимость кислорода в псевдофазе, образованной плотно упакованными углеводородными цепями жирнокислотных остатков липидов в мембранных, должна быть ниже, чем в неструктурированных объемных фазах (маслах), поскольку последние содержат сравнительно много межмолекулярных свободных объемов (дефектов). Эти представления согласуются с результатами молекулярно-динамических расчетов, из которых следует, что кислород локализуется в мембране преимущественно в зоне полярных головок липидов, содержащей повышенное число дефектов, а также в разупорядоченном центре бислоя, где контактируют терминальные группы противоположащих углеводородных цепей [19]. В зонах же, образованных плотно упакованными участками жирнокислотных цепей в мембранах, число дефектов и концентрация растворенного кислорода существенно ниже. Таким образом, липидная зона мембран гетерогенна (по глубине) по способности растворять кислород, а экспериментально найденные величины коэффициентов распределения представляют собой в той или иной степени точности усредненные значения. К сожалению, надежное определение коэффициента распределения кислорода в системе мембранные липиды/вода чрезвычайно сложная и все еще до конца не решенная задача. Появляющиеся в литературе новые оценки величин коэффициентов распределения кислорода в системе липиды мембран/вода постепенно снижаются до 4-3 и даже 2. В дальнейшем для простоты мы будем использовать достаточно реальное допущение о том, что коэффициент распределения кислорода в системе липиды мембран/вода близок к единице ($\gamma \sim 1$). То есть будем полагать, что в равновесии концентрации растворенного кислорода в водной фазе, окружающей мембраны ($C(O_2)$), и в липидном бислое мембран ($C'(O_2)$), близки ($C'(O_2)/C(O_2) = \gamma \approx 1$). Отсюда следует, что приложенный к объемным водным фазам с двух сторон мембраны градиент концентрации кислорода практически целиком падает внутри липидного слоя мембран. Это означает, что плотность упаковки липидной зоны мембран, ее состав и действие других факторов, модифицирующих диффузионные свойства бислоя, прямо влияют на интенсивность трансмембранных потоков кислорода.

Сравнительно недавно для исследования базальной диффузионной проницаемости липидных пленок был разработан новый метод и в двух-трех лабораториях сконструированы соответствующие установки – сканирующие электрохимические микроскопы с инвертированными открытыми платиновыми/ртутными электродами. Микроскопы интегрированы с ванной Ленгмюра, оборудованной весами Вильгельми. В целом приборный комплекс позволяет получать монослойные мембраны из липидов заданного состава на границе раздела фаз воздух/вода, создавать и контролировать поверхностное давление в пленке, измерять плотность трансмембранного диффузионного тока из газовой фазы к электроду через липидный монослой и микрослой водной фазы контролируемой толщины от поверхности раздела фаз (мембрана/вода) до электрода. Важно, что в этих условиях исключаются ошибки, связанные с наличием перемешиваемых слоев воды у поверхности мембраны. Прямые измерения в нашей лаборатории модификация условий экспериментов и алгоритм обработки результатов позволяют полностью учитывать градиент концентрации кислорода между газовой фазой и поверхностью работающего электрода (рис. 1). Это позволяет путем сравнения проницаемости мембраны с диффузионной проницаемостью для O_2 слоя воды известной толщины, прямо вычислять коэффициенты проницаемости мембран для O_2 в заданных условиях [17].

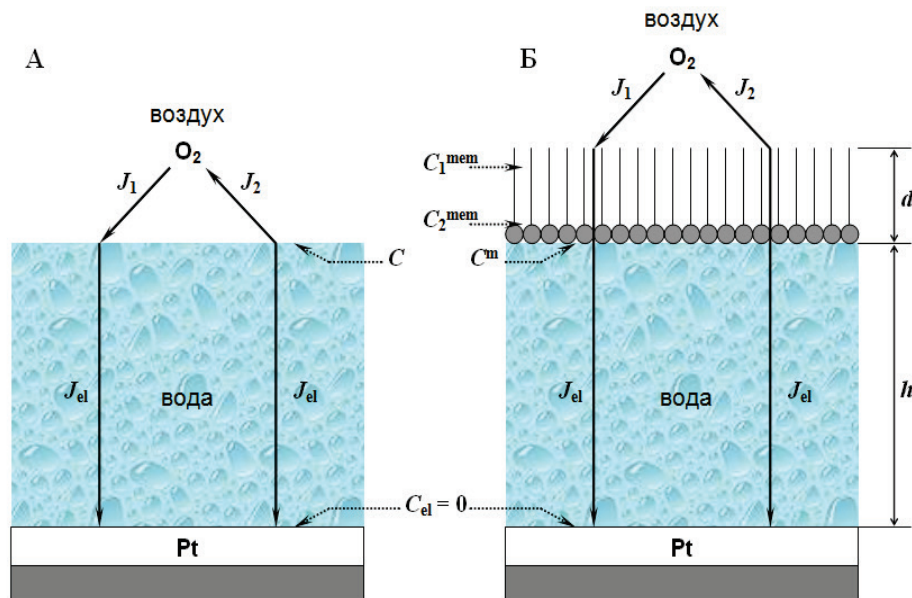


Рисунок 1. Схема диффузионных потоков O_2 для чистой границы раздела фаз воздух/вода (А) и в присутствии липидной монослойной мембраны (Б). J_1 – поток O_2 из воздуха к межфазной границе, J_2 – поток от границы в воздушную фазу, J_{el} – поток O_2 от межфазной границы к поверхности электрода

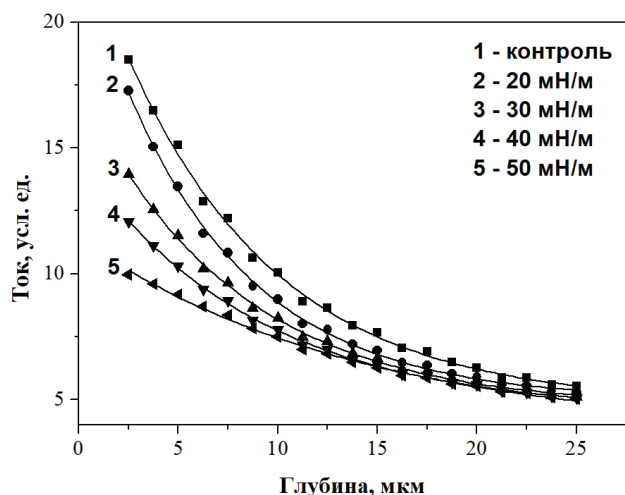


Рисунок 2. Зависимости величины диффузионного тока от глубины погружения электрода для чистой поверхности воды (кривая 1) и при нанесении на поверхность воды монослоев арахидоновой кислоты с различным величинами поверхностного давления (кривые 2-5)

Результаты, полученные методом СЭХМ, показали, что проницаемость для O_2 монослойных мембран достаточно велика и слабо зависит от поверхностного давления в мембранах, собранных из углеводородных цепей, длина которых менее C_{16} . Наиболее четко это продемонстрировано на примере спиртов. Влияние поверхностного давления на проницаемость для O_2 монослоев длинноцепочечных спиртов быстро нарастает в ряду $C_{16} < C_{18} < C_{20}$. Близкий характер зависимости проницаемости от давления мы получили и для длинноцепочечных жирных кислот. На рисунке 2 представлена эта зависимость на примере арахидоновой кислоты C_{20} .

Из приведенных данных видно, что при поверхностном давлении в слое 30 мН/м, что примерно соответствует латеральному давлению в клеточных мембранах, коэффициент проницаемости монослоя арахидоновой кислоты равен $2,5 \cdot 10^{-3}$ м/с. Эта величина более чем на два порядка меньше, чем при минимальных значениях латерального давления в монослойной мембране. Холестерин при концентрации не выше 10 % при давлении 30 мН/м снижает тормозящее действие латерального давления на проницаемость монослоя для кислорода. Действие доксилстеарата, фосфатидной кислоты и дифитаноилфосфатидилхолина на кислородный транспорт через арахидоновый монослой также требует учета роли длины углеводородных цепей липидов мембран.

Обнаруженная зависимость диффузионного сопротивления липидных монослоев из длинноцепочечных липидов от латерального давления позволяет по-новому интерпретировать низкое диффузионное сопротивление мембран эритроцитов в фазе интенсивного трансмембранного переноса кислорода *in vivo*. По предварительным оценкам вытянутая форма эритроцита в микрокапилляре требует почти удвоения площади мембраны клетки. Этот энергозависимый процесс может осуществляться за счет гидромеханической энергии кровотока. В результате растяжения мембраны снижается ее диффузионное сопротивление трансмембранному переносу кислорода. Клетка протискивается с минимальным зазором у стенки капилляра. При этом она непрерывно набегаем на «свежий» участок, уравновешенный после прохождения предыдущего эритроцита. Важно, что длинноцепочечные жирнокислотные остатки за счет вязкоупругих свойств участвуют также в быстром восстановлении двояковогнутой формы нормоцита.

Список литературы / References:

1. West J.B. *Respiratory physiology – The essentials*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008, 192 p.
2. Endeward V., Musa-Aziz R., Cooper G.J., Chen L.M., Pelletier M.F., Virkki L.V., Supuran C.T., King L.S., Boron W.F., Gros G. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO_2 transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB J.*, 2006, vol. 20, pp. 1974-1981.
3. Fischkoff S., Vanderkooi J.M. Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene. *J. Gen. Physiol.*, 1975, vol. 65, pp. 663-676.
4. Subczynski W.K., Hopwood L.E., Hyde J.S. Is the mammalian cell plasma membrane a barrier to oxygen transport? *J. Gen. Physiol.*, 1992, vol. 100, pp. 69-87.
5. Ligeza A., Tikhonov A.N., Hyde J.S., Subczynski W.K. Oxygen permeability of thylakoid membranes: electron paramagnetic resonance spin labeling study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, vol. 1365, pp. 453-463.
6. Subczynski W.K., Wisniewska A. Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions. *Acta Biochim. Pol.*, 2000, vol. 47, pp. 613-625.
7. Coin J.T., Olson J.S. The rate of oxygen uptake by human red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, pp. 1178-1190.
8. Huxley V.H., Kutchai H. The effect of the red cell membrane and a diffusion boundary layer on the rate of oxygen uptake by human erythrocytes. *J. Physiol.*, 1981, vol. 316, pp. 75-83.
9. Yamaguchi K., Nguyen-Phu D., Scheid P., Piiper J. Kinetics of O_2 uptake and release by human erythrocytes

studied by a stopped-flow technique. *J. Appl. Physiol.*, 1985, vol. 58, pp. 1215-1224.

10. Cogan U., Shinitzky M., Weber G., Nishida T. Microviscosity and order in the hydrocarbon region of phospholipid and phospholipid-cholesterol dispersions determined with fluorescent probes. *Biochemistry*, 1973, vol. 12, pp. 521-528.

11. Edidin M. Rotational and translational diffusion in membranes. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1974, vol. 3, pp. 179-201.

12. Sinensky M. Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, vol. 71, pp. 522-525.

13. Herrera M., Hong N.J., Garvin J.L. Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension*, 2006, vol. 48, pp. 157-164.

14. Uehlein N., Lovisollo C., Siefritz F., Kaldenhoff R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*, 2003, vol. 425, pp. 734-737.

15. Saparov S.M., Liu K., Agre P., Pohl P. Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, pp. 5296-5301.

16. Agre P., Sasaki S., Chrispeels M. J. Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am. J. Physiol. - Renal Physiol.*, 1993, vol. 265, pp. F461-F461.

17. Ivanov I.I., Fedorov G.E., Gus'kova R.A., Ivanov K.I., Rubin A.B. Permeability of lipid membranes to dioxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 322, pp. 746-750.

18. Endeward V., Cartron J.P., Ripoché P., Gros G. RhAG protein of the Rhesus complex is a CO₂ channel in the human red cell membrane. *FASEB J.*, 2008, vol. 22, pp. 64-73.

19. Shaitan K.V., Antonov M.Yu., Tourleigh Ye.V., Levtsova O.V., Tereshkina K.B., Kirpichnikov M.P., Nikolaev I.N. Comparative study of molecular dynamics, diffusion, and permeability for ligands in biomembranes of different lipid composition. *Biochemistry (Mosc.) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.*, 2008, vol. 2, pp. 73-81.

THE EFFECT OF HYDROCARBON CHAIN LENGTH OF MEMBRANE LIPIDS, LATERAL PRESSURE AND CHOLESTEROL CONCENTRATION ON MEMBRANE OXYGEN PERMEABILITY

Gus'kova R.A., Vasil'ev N.S., Loktyushkin A.V., Ivanov I.I.

M.V. Lomonosov Moscow State University

Leninskie gori, 1, building 12, Moscow, 119234, Russia; e-mail: ivanov36@mail.ru

Abstract. We employed scanning electrochemical microscope (SECM) with inverted open platinum electrode (IOPE), integrated with Langmuir bath, to investigate the impact of long-chain hydrocarbons on the permeability of membranes for O₂. We show that oxygen permeability of membranes composed of long-chain fatty acids (C₁₈ – stearic or C₂₀ – arachidic) sharply decreases in response to increasing surface pressure in the range 20-45 mN/m. Addition of cholesterol to these membranes (up to 10%) inhibits the effect of surface pressure on the O₂ transfer rate. Permeability of membranes composed of lipids with shorter chains (C₁₆ and less) remains high regardless of lateral pressure. Physiological role of the detected phenomena is discussed in connection with O₂ gas exchange through the membrane of erythrocytes in blood capillaries. We discuss formation of the elongated cell shape in the capillary, increase in the surface area of the cell membrane, reduction of surface tension in the membrane, reduction of the gap between the erythrocyte membrane and the walls of the capillary, movement of the cell along the capillary, the causes and speed of the cell return to its normal biconcave shape.

Key words: Dioxygen diffusion, long-chain hydrocarbons monolayers, surface pressure, cholesterol, SECM.