

ЗАМЕНА СЛОЖНОЭФИРНЫХ СВЯЗЕЙ ФОСФОЛИПИДОВ НА ПРОСТЫЕ ЭФИРЫ УВЕЛИЧИВАЕТ ПРОВОДИМОСТЬ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ ПРОНИКАЮЩИХ КАТИОНОВ ТИПА SkQ1

© 2012 г. Т.М. Ильясова¹, Т.И. Рокицкая¹, И.И. Северина²,
Ю.Н. Антоненко^{1*}, В.П. Скулачев¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119991 Москва; электронная почта: antonen@mail.genebee.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, 119991 Москва

Поступила в редакцию 07.06.12

На плоских бислойных фосфолипидных мембранах (БЛМ) показано, что замена дифитаноилфосфатидилхолина на дифитанилфосфатидилхолин увеличивает до нернстовских значений диффузионный потенциал проникающих катионов пластохинонилдодецилтрифенилфосфония (SkQ1), ускоряет транслокацию SkQ1 через мембрану, регистрируемую по кинетике спада тока мембраны в ответ на приложение напряжения к мембране (релаксация тока) и снижает до неизмеримого уровня эндогенную протонную проводимость БЛМ в присутствии SkQ1. Полученные результаты объясняются тем, что замена в фосфолипиде сложных эфиров на простые приводит к существенному снижению дипольного потенциала мембраны, который формируется как слоем прочно связанной воды, так и диполями карбонильных групп сложноэфирных связей. Разность дипольных потенциалов между этими двумя липидами составляет 100 мВ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: БЛМ, фосфолипид, протонная проводимость, дипольный потенциал, SkQ1.

Славу Ефиму Арсентьевичу Либерману как экспериментатору принесли работы на плоских бислойных фосфолипидных мембранах (БЛМ) [1–3]. Начаты еще в 60-х гг. XX в., они внесли большой вклад в доказательство хемиосмотической гипотезы окислительного фосфорилирования, за которую Питеру Митчеллу была присуждена Нобелевская премия. В своих опытах мы также использовали БЛМ как тест-систему для проверки проникающей способности новых антиоксидантов класса SkQ1 и их аналогов, синтезированных в нашей лаборатории [4–8]. Трудность, с которой мы столкнулись в этих экспериментах на БЛМ, состояла в том, что в области малых концентраций SkQ1 диффузионный потенциал SkQ1 не достигал значений, рассчитан-

ных по уравнению Нернста (~60 мВ на 10-кратный градиент катиона), а повышение концентрации исследуемого катиона приводило к дестабилизации БЛМ из-за детергентного действия соединений этого рода. Более стабильные «цветные» (толстые) фосфолипидные мембраны давали большие значения диффузионных потенциалов. Однако именно «черные» БЛМ, а не «цветные» мембраны, могут служить адекватной моделью биологических мембран, часть площади которых всегда представляет собой фосфолипидный бислой.

Еще в ранней работе Либермана и Топалы (1969 г.) было отмечено, что одинаковые по структуре проникающие катионы и анионы (тетрафенилфосфоний и тетрафенилборат) имеют совершенно разные проницаемости через нейтральные мембраны, причем анионы обладают существенно большей проницаемостью [9]. Авторы предположили, что на границе раздела мембрана–вода образуется слой диполей, которые ориентированы своим положительным зарядом внутрь мембраны. Дальнейшие работы разных лабораторий не только подтвердили это

Принятые сокращения: БЛМ – плоская бислойная фосфолипидная мембрана; дифитанилФХ – 1,2-di-O-phytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; дифитаноилФХ – 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; C₁₂R4 – катион додецилпроламида Б; SkQ1 – катион пластохинонилтрифенилфосфония.

* Адресат для корреспонденции.

предположение, но и позволили определить вклад различных компонентов фосфолипида в формирование этого дипольного потенциала [10]. В частности, было показано, что существенную долю дипольного потенциала вносят карбонилы, входящие в состав сложноэфирной связи жирных кислот и глицерина в фосфолипиде [11]. Выяснилось, что синтетические фосфолипиды, различающиеся только типом данной связи (сложные эфиры и простые эфиры), имеют дипольные потенциалы, различающиеся приблизительно на 120 мВ, причем в случае простого эфира потенциал был меньше. В настоящей работе была изучена проводимость SkQ1 и его аналогов для БЛМ, сделанной из фосфолипидов с остатками фитановой кислоты (дифитаноилФХ) или остатками фитанового спирта (дифитанилФХ, рис. 1). В соответствии с предсказанием теории о дипольном потенциале проницаемость изученных катионов оказалась существенно выше в случае дифитанилФХ по сравнению с таковой в случае дифитаноилФХ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проницаемость плоских бислойных фосфолипидных мембран (БЛМ) измеряли в тefлоновой ячейке с двумя отсеками, разделенными тefлоновой перегородкой с отверстием диаметром 0,6 мм, на котором формировали мембрану из одного из двух фосфолипидов: дифитаноилФХ или дифитанилФХ (оба в концентрации 20 мг/мл в декане). Электрические параметры измеряли двумя AgCl-электродами, погруженными в ячейку по обе стороны мембраны, с использованием усилителя Keithley 6617 («Keithley», США) в случае измерения трансмембранной разности электрических потенциалов и patch clamp-усилителя OES-2 («Opus», Россия) в случае измерения тока через мембрану.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

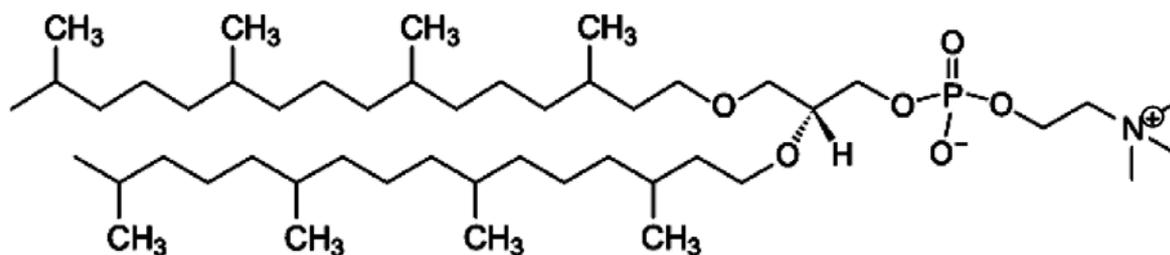
Формулы веществ, использованных в нашей работе, приведены на рис. 1. На рис. 2 представлена кинетика генерации диффузионного потенциала SkQ1 на БЛМ из дифитаноилФХ и дифитанилФХ. Потенциал имел знак «плюс» в отсеке с меньшей концентрацией SkQ1. Процесс начинали добавкой 1 мкМ SkQ1 в один из отсеков, исходно содержащих 0,1 мкМ SkQ1. Видно, что генерация потенциала для дифитанилФХ происходила быстрее, чем для дифитаноилФХ. Кроме того, стационарный потенциал был больше для дифитанилФХ. На рис. 3 диф-

фузионный потенциала SkQ1 — функция от концентрации этого катиона в одном из двух отсеков экспериментальной ячейки, разделенных БЛМ. В другом отсеке концентрация SkQ1 была постоянной и равной 0,1 мкМ. Значения потенциала на БЛМ из дифитаноилФХ оказались существенно ниже нернстовских (штриховая линия), что соответствует результатам наших опытов [3–7]. В то же время на БЛМ из дифитанилФХ были получены потенциалы, близкие к нернстовским.

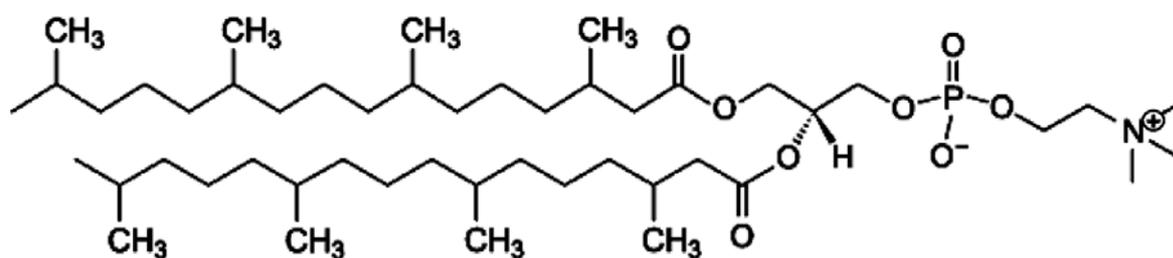
На рис. 4 представлена зависимость от времени тока через БЛМ в присутствии SkQ1 в ответ на приложение напряжения к мембране, сформированной из дифитанилФХ. Видно, что приложение разности потенциалов ведет к появлению тока, уменьшающегося со временем (релаксация тока). Как было показано ранее, этот процесс связан с перераспределением катиона SkQ1 между двумя сторонами мембраны в ответ на приложение трансмембранного электрического поля [8]. Важным условием релаксации тока является значительное связывание SkQ1 на границе раздела мембрана–вода. Серая кривая на рис. 4 — аппроксимация данных моноэкспоненциальной кривой $I = I_{\infty} + (I_0 - I_{\infty}) \exp(-t/\tau)$. Характерное время релаксации (τ) для данного процесса оказалось равным 11 с. Последующая запись показывает релаксацию тока в ответ на снятие потенциала. Серая кривая в этой части рисунка обозначает аппроксимацию моноэкспонентой с $\tau = 23$ с. Следует отметить, что нам не удалось получить достоверных записей релаксации тока SkQ1 для мембраны из дифитаноилФХ. В случае мембран, приготовленных из общего фосфолипида из *Escherichia coli*, времена релаксации были существенно больше ($\tau \sim 60$ с) [8]. Можно сделать качественный вывод, что данные по релаксации тока также свидетельствуют о существенно более высокой проницаемости SkQ1 через мембрану из дифитанилФХ по сравнению с таковой из дифитаноилФХ.

Надежные данные по проницаемостям катионов для изучаемых липидов были получены для катионного производного родамина Б, C₁₂R4 (рис. 1). На рис. 5 приведены записи тока, индуцированного C₁₂R4 в ответ на подачу потенциала 100 мВ для мембран, состоящих из этих липидов. Видно, что в случае дифитанилФХ кинетика релаксации намного быстрее (шкала времен на рис. 5, а, 10 с, тогда как на рис. 5, б — 0,35 с). Характерное время релаксации τ для дифитанилФХ было 0,03 с, а для дифитаноилФХ — 1,36 с (верхние кривые на рис. 5).

Как отмечено выше, большая проницаемость катионов через мембраны из дифитанилФХ связана с меньшим дипольным потен-



ДифитанилФХ



ДифитаноилФХ

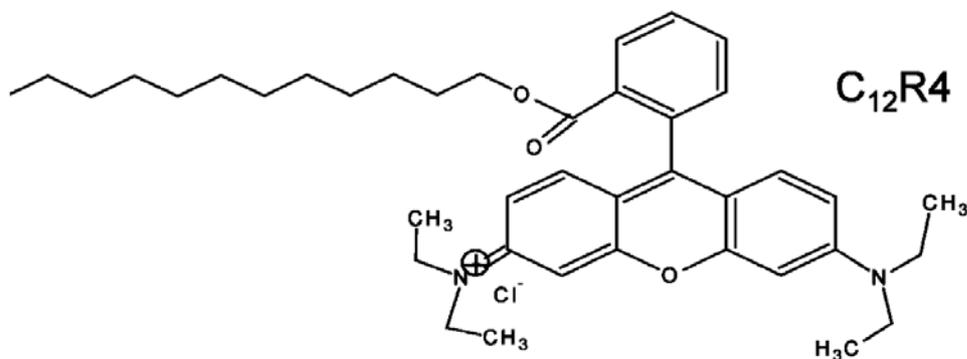
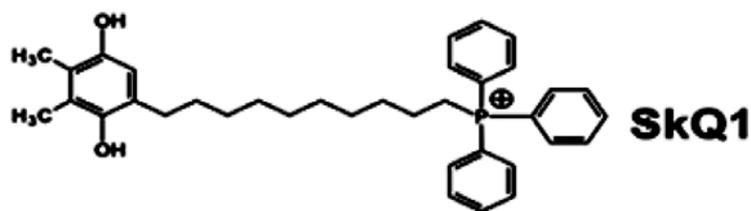


Рис. 1. Формулы фосфолипидов, C₁₂R4 и SkQ1

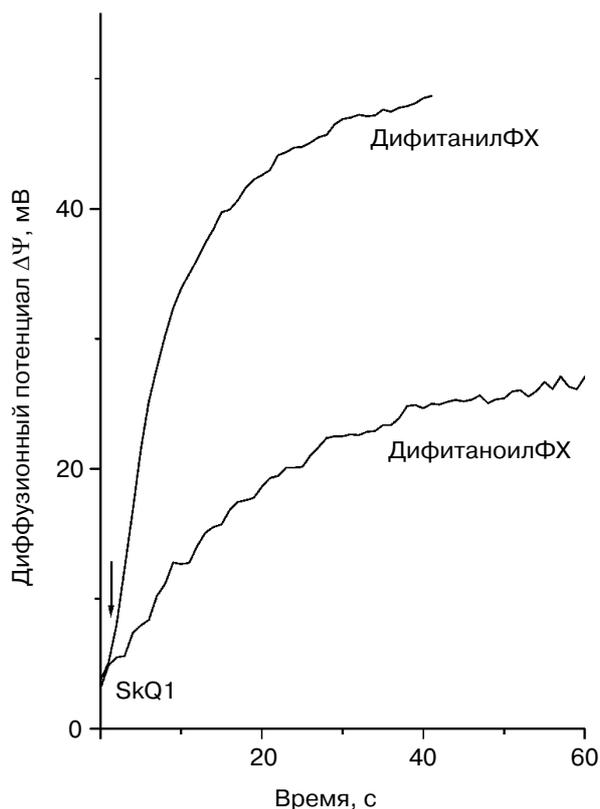


Рис. 2. Кинетика генерации диффузионного потенциала SkQ1. В обоих отсеках кюветы исходная концентрация SkQ1 была 0,1 мкМ. В нулевое время в один из отсеков добавили 1 мкМ SkQ1. Здесь и на рис. 3 инкубационная смесь содержала 10 мМ Tris, 10 мМ Mes, 10 мМ KCl (pH 7,0)

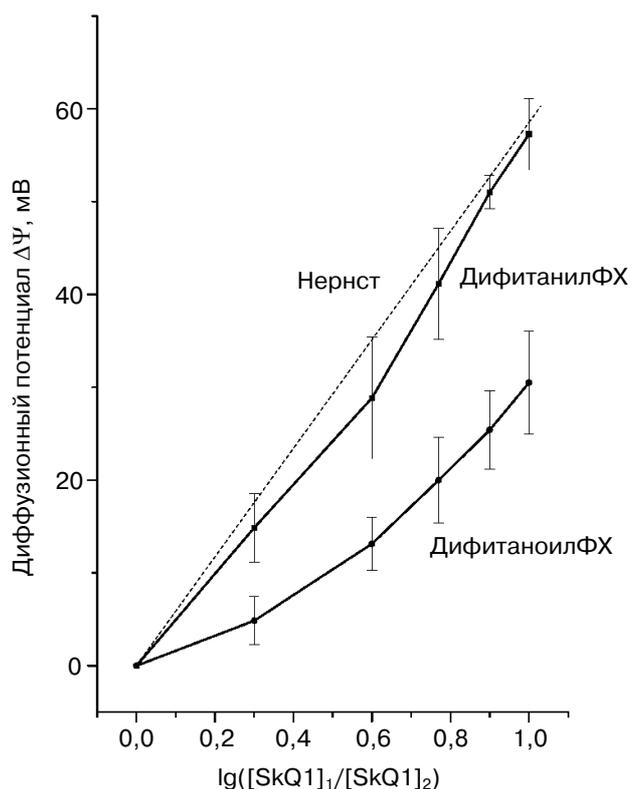


Рис. 3. Зависимость диффузионного потенциала SkQ1 от градиента концентрации этого катиона. В одном из отсеков $[SkQ1] = 0,1$ мкМ. Концентрация SkQ1 в другом отсеке указана на оси абсцисс

циалом липидов, которые имеют простые эфирные связи и не содержат карбонильных групп. Изменение дипольного потенциала можно оценить в наших опытах из отношения проницаемостей $C_{12}R_4$ для этих двух мембран в соответствии с уравнением [12]

$$\Delta V = (RT/F) \log(\tau_1/\tau_2) = 98 \text{ мВ.}$$

Это значение $\Delta V < 120$ мВ, что отмечено в случае мембран из гексадецилфосфатидилхолина [11], однако эти значения близки. В случае мембран из диолеилфосфатидилхолина разница составляла 110 мВ [13]. Различие может быть связано с различиями во вкладах других компонентов дипольного потенциала, в частности в различиях между структурой прочно связанной воды для мембран из липидов, содержащих фитановый и гексадециловый спирт.

Возникает вопрос: насколько дипольный потенциал искусственных мембран соответству-

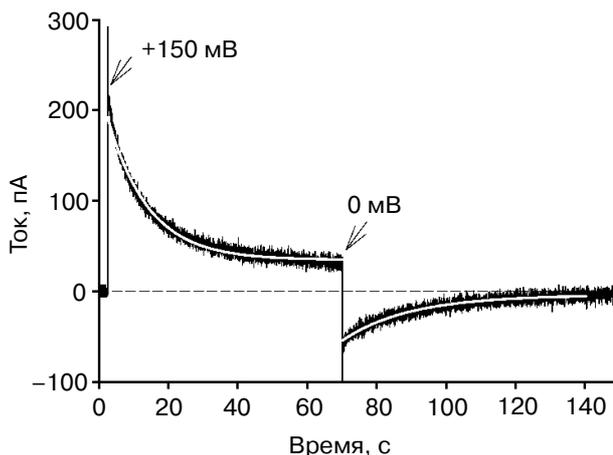


Рис. 4. Запись тока БЛМ из дифитанилФХ в присутствии 2 мкМ SkQ1 при приложении к мембране 150 мВ с последующим снятием потенциала. Серые кривые – моноэкспоненциальные кривые с $\tau = 11$ и 23 с. Здесь и на рис. 5 состав среды: 100 мМ KCl, 10 мМ Tris, pH 7,4

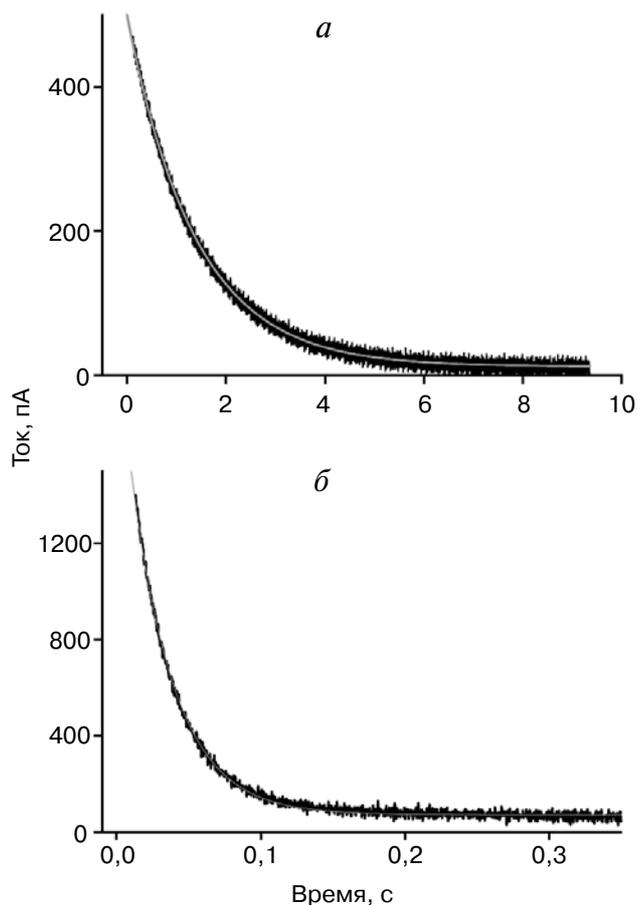


Рис. 5. Запись тока БЛМ из дифитаноилФХ (а) или дифитанилФХ (б) в присутствии 0,1 мкМ $C_{12}R4$ при приложении к мембране +100 мВ. Верхние кривые – моноэкспоненциальные кривые с $\tau = 1,36$ с (а) и 0,03 с (б)

ет природным мембранам? К сожалению, количественные оценки дипольного потенциала на плазматических мембранах клеток или митохондрий отсутствуют в литературе. Однако есть несколько работ, в которых отмечено участие дипольного потенциала в ряде процессов, происходящих на плазматических мембранах [14]. По нашему мнению, наличие пептидов и белков в природных мембранах должно существенно снижать дипольный потенциал, определяемый фосфолипидами, поскольку они должны разрушать непрерывность слоя диполей тех же карбоновых групп сложноэфирных связей фосфолипидов. Вот почему дипольный потенциал митохондриальных мембран должен быть ближе к БЛМ из дифитанилФХ, а проницаемость этих мембран для SkQ1 должна быть более высокой, чем у БЛМ из дифитаноилФХ.

Помимо влияния природы фосфолипида на проницаемость катионов мы исследовали также

генерацию диффузионного потенциала ионов водорода при создании ΔpH на БЛМ. Дело в том, что в более ранних опытах наблюдалась некоторая индукция протонной проводимости мембран под действием SkQ1. Этот эффект можно было связать с совместным действием проникающего катиона SkQ1 и жирных кислот [15], которые появляются в фосфолипиде в результате его спонтанного гидролиза. Поскольку дифитанилФХ содержит остатки только фитанового спирта, то даже если бы и происходил спонтанный гидролиз, он приводил бы к образованию фитанового спирта, не способного протонироваться (в отличие от жирной кислоты, анион которой может связывать H^+ , что необходимо для создания протонной проводимости БЛМ). Добавка КОН в один из отсеков сдвигала pH на единицу (рис. 6). В результате небольшой, но измеримый потенциал (знак «плюс» в отсеке с меньшей концентрацией H^+)

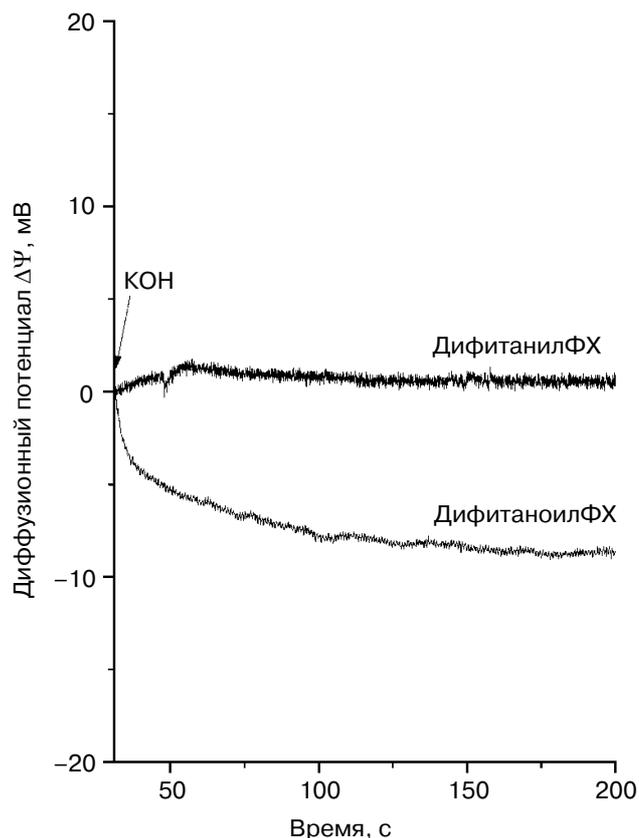


Рис. 6. Генерация диффузионного потенциала H^+ в присутствии 1 мкМ SkQ1 в обоих отсеках кюветы, разделяющих БЛМ. Исходно в обоих отсеках pH 7,0. Через 75 с после начала опыта в один из отсеков добавили КОН, чтобы сдвинуть pH в этом отсеке до 8,0

возникал, если БЛМ была сделана из дифитанилФХ. В случае мембраны из дифитанилФХ никакого потенциала не наблюдалось, т.е. на такой БЛМ SkQ1 не вызывал появления измеримой протонной проводимости. Наши результаты подтверждают предположение, что протонная проводимость БЛМ, индуцированная SkQ1, обусловлена присутствием жирных кислот, возникающих при гидролизе сложноэфирных связей между остатками жирной кислоты и глицерина в молекуле фосфолипида.

Определение условий получения нернстовских диффузионных потенциалов при градиенте SkQ1 на БЛМ открывает возможность применения таких БЛМ как SkQ1-чувствительных электродов для измерения поглощения SkQ1 животными клетками, митохондриями и бактериями. Такая возможность измерения концент-

рации SkQ1 имеет ряд преимуществ по сравнению с другими аналитическими методами, такими как хроматография. В данном случае можно непосредственно измерять кинетику поглощения или высвобождения SkQ1 живыми системами без стадии отбора проб, разделения химических компонентов и их последующего анализа. Такие измерения показали свою эффективность в случае определения концентрации катиона тетрафенилфосфония в среде инкубации при оценке мембранного потенциала на выделенных митохондриях и пермеабелизованных гепатоцитах [3, 16, 17].

Авторы благодарны Г.А. Коршуновой и Н.В. Сумбатян за синтез проникающих катионов и Д.А. Черепанову за предложение исследовать дифитанилФХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev, V.P., Sharaf, A.A., and Liberman, E.A. (1967) *Nature*, **216**, 718–719.
2. Liberman, E.A., Topaly, V.P., Tsofina, L.M., Jasaitis, A.A., and Skulachev, V.P. (1969) *Nature*, **222**, 1076–1078.
3. Liberman, E.A., and Skulachev, V.P. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 30–42.
4. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Черняк Б.В., Чертков В.А., Домнина Л.В., Иванова О.Ю., Изюмов Д.С., Хайлова Л.С., Коршунова Г.А., Лямзаев К.Г., Мунтян М.С., Непряхина О.К., Пашковская А.А., Плетюшкина О.Ю., Пустовидко А.В., Рогинский В.А., Рокицкая Т.И., Рууге Э.К., Сапрунова В.Б., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев И.В., Скулачев М.В., Сумбатян Н.В., Свириева И.В., Ташлицкий В.Н., Васильев Ю.М., Высоких М.Ю., Ягужинский Л.С., Замятнин А.А., Скулачев В.П. (2008) *Биохимия*, **73**, 1587–1604.
5. Skulachev, V.P., Anisimov, V.N., Antonenko, Y.N., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Elichev, V.P., Filenko, O.F., Kalinina, N.I., Kapelko, V.I., Kolosova, N.G., Kopnin, B.P., Korshunova, G.A., Lichinitser, M.R., Obukhova, L.A., Pasyukova, E.G., Pisarenko, O.I., Roginsky, V.A., Ruuge, E.K., Senin, I.I., Severina, I.I., Skulachev, M.V., Spivak, I.M., Tashlitsky, V.N., Tkachuk, V.A., Vyssokikh, M.Y., Yaguzhinsky, L.S., and Zorov, D.B. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 878–889.
6. Skulachev, M.V., Antonenko, Y.N., Anisimov, V.N., Chernyak, B.V., Cherepanov, D.A., Chistyakov, V.A., Egorov, M.V., Kolosova, N.G., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Plotnikov, E.Y., Roginsky, V.A., Savchenko, A.Y., Severina, I.I., Severin, F.F., Shkurat, T.P., Tashlitsky, V.N., Shidlovsky, K.M., Vyssokikh, M.Y., Zamyatnin, A.A., Jr., Zorov, D.B., and Skulachev, V.P. (2011) *Curr. Drug Targets*, **12**, 800–826.
7. Lyamzaev, K.G., Pustovidko, A.V., Simonyan, R.A., Rokitskaya, T.I., Domnina, L.V., Ivanova, O.Y., Severina, I.I., Sumbatyan, N.V., Korshunova, G.A., Tashlitsky, V.N., Roginsky, V.A., Antonenko, Y.N., Skulachev, M.V., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. (2011) *Pharm. Res.*, **28**, 2883–2895.
8. Rokitskaya, T.I., Klishin, S.S., Severina, I.I., Skulachev, V.P., and Antonenko, Y.N. (2008) *J. Membr. Biol.*, **224**, 9–19.
9. Либерман Е.А., Топалы В.П. (1969) *Биофизика*, **14**, 452–461.
10. Brockman, H. (1994) *Chem. Phys. Lipids*, **73**, 57–79.
11. Gawrish, K., Ruston, D., Zimmerberg, J., Parsegian, V.A., Rand, R.P., and Fuller, N. (1992) *Biophys. J.*, **61**, 1213–1223.
12. Malkov, D.Y., and Sokolov, V.S. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1278**, 197–204.
13. Berkovich, A.K., Lukashev, E.P., and Melik-Nubarov, N.S. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 375–383.
14. Cladera, J., Martin, I., Ruysschaert, J.M., and O'Shea, P. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 29951–29959.
15. Severin, F.F., Severina, I.I., Antonenko, Y.N., Rokitskaya, T.I., Cherepanov, D.A., Mokhova, E.N., Vyssokikh, M.Y., Pustovidko, A.V., Markova, O.V., Yaguzhinsky, L.S., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663–668.
16. Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., and Kobatake, Y. (1979) *J. Membr. Biol.*, **49**, 105–121.
17. Labajova, A., Vojtkova, A., Krivakova, P., Kofranek, J., Drahota, Z., and Houstek, J. (2006) *Anal. Biochem.*, **353**, 37–42.

**SUBSTITUTION OF ETHER LINKAGE FOR ESTER
BOND IN PHOSPHOLIPID INCREASES PERMEABILITY
OF BILAYER LIPID MEMBRANE FOR SkQ1-TYPE
PENETRATING CATIONS**

**T. M. Il'yasova¹, T. I. Rokitskaya¹, I. I. Severina²,
Y. N. Antonenko^{1*}, V. P. Skulachev¹**

¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991,
Russia; E-mail: antonen@mail.genebee.msu.ru*

² *M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological
Faculty, Moscow 119991, Russia*

Received June 7, 2012

Using dialkylphospholipid (diphytanylphosphatidylcholine) instead of the conventional diacylphospholipid (diphytanoylphosphatidylcholine) in planar lipid bilayer membranes (BLM) led to an increase in the diffusion potential of the penetrating cation plastoquinonyl-decyl-triphenylphosphonium (SkQ1), making it close to the Nernst value, and accelerated translocation of SkQ1 across the BLM as monitored by the kinetics of decrease in the transmembrane electric current upon voltage application (current relaxation). The consequences of changing from an ester to an ether linkage between the head groups and the hydrocarbon chains are associated with a substantial reduction of the membrane dipole potential known to originate from dipoles of tightly bound water molecules and carbonyl groups in ester bonds. The difference in the dipole potential between BLM formed from the ester phospholipid and that of the ether phospholipid was estimated to be 100 mV. In the latter case, suppression of SkQ1-mediated proton conductivity of BLM was also observed

Key words: BLM, phospholipid, proton conductivity, dipole potential, SkQ1