

А. П. ЕЛКИН, Г. Н. БЕРЕСТОВСКИЙ, М. З. ГЮЛЬХАНДЯНИН

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ  
ОДНО- И ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА РАССТОЯНИЕ  
МЕЖДУ ДВУМЯ ЛИПИДНЫМИ БИСЛОЯМИ В ЗОНЕ КОНТАКТА**

(Представлено академиком Г. М. Франком 15 VII 1974)

Одним из существенных параметров при изучении межклеточных взаимодействий является расстояние между наружными мембранами клеток. Электронно-микроскопические методы измерения расстояния между клетками обладают одним общим недостатком — наличием слишком больших артефактов фиксации. Других же прямых методов измерения толщины межклеточных «щелей» пока нет.

Ранее нами был предложен оптический метод измерения расстояния между двумя контактирующими бимолекулярными липидными мембрана-

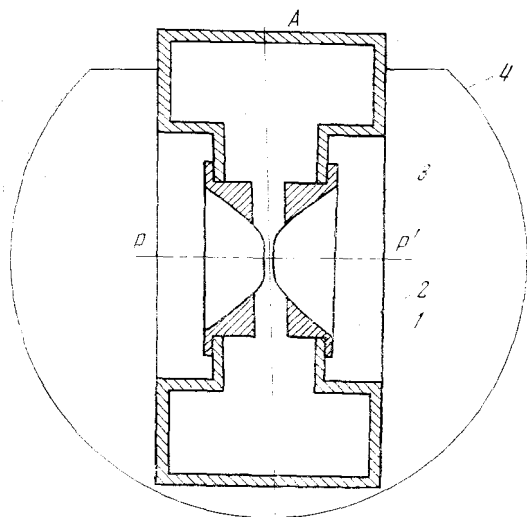


Рис. 1. Конструкция ячейки. 1 — тефлоновая шайба с отверстием для посадки мембраны, 2 — корпус камеры, 3 — контактирующие мембраны, 4 — сферическая ювета

ми (БЛМ) в водной среде (1); описаны схема экспериментальной установки и метод работы (2). Первые же полученные данные (2) оказались в хорошем количественном соответствии с известными в цитологии величинами расстояний между клетками и послужили отправной точкой для данной работы.

Для опытов использовалась рабочая ячейка несколько измененной по сравнению с описанной ранее (2) конструкции. Благодаря равенству гидростатических давлений на обе мембраны область контакта мембран симметрична относительно средней плоскости  $A$  и оси  $PP'$ , проходящей через центр мембран (рис. 1). Сканирование лазерным лучом (диаметр луча менее 0,1 мм) по области контакта мембран и визуальное наблюдение в отраженном бе-

лом свете показало, что при равновесных расстояниях контактирующие участки мембран параллельны друг другу. Диаметр отверстия в тефлоновой шайбе 1 равен 2 мм, расстояние между отверстиями, т. е. расстояние между разведенными плоскими мембранами, 0,2 мм, диаметр области контакта  $1,2 \pm 0,2$  мм.

Формула для расчета расстояния между БЛМ имеет вид (2)

$$\cos^2 \left[ \frac{2\pi (n_{cp}t + n_n t_n) \cos \theta}{\lambda} \right] = \frac{I_2}{4I_1},$$

где  $I_1, I_2$  — интенсивности светового пучка, отраженного от одной и двух контактирующих БЛМ, соответственно;  $n_{cp}, n_m$  — показатели преломления среды и мембраны;  $\theta$  — угол падения луча на мембрану;  $\lambda$  — длина волны падающего света;  $t_m$  — толщина мембраны;  $t$  — искомое расстояние между двумя контактирующими БЛМ.

Для вычисления  $t$  в формулу подставляли следующие значения величин:  $n_{cp}=1,33$ ,  $n_m=1,46$ ,  $\lambda=633,3$  нм,  $t_m=7$  нм,  $\theta=22^\circ$  ( $\cos \theta=0,92$ ). Растворителем липидов служил либо гептан, либо смесь гептан/декан. Использование одного декана давало БЛМ с микролинзами толщиной до 15–20 нм, что не позволяло получать расстояния менее 30–40 нм между мембранами. Общие фосфолипиды (ОФ), используемые для получения БЛМ, были выделены из бычьих мозгов по методу Мюллера. Опыты проводились в 0,1 ММ эквимолярном буферном растворе  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O - H_3BO_3 - Na_2HPO_4$ .

Равновесное расстояние между контактирующими БЛМ не зависело от весового содержания липидов в пределах от 10 до 40 мг/мл, от относительного состава смеси гептан/декан, от диаметра области контакта в пределах  $0,2 \pm 1,8$  мм. Кроме того, расстояние между БЛМ не зависело от величины зазора между тефлоновыми шайбами, однако при разведении шайб более чем на 0,3 мм контактирующие мембраны часто разрывались, хотя те же самые БЛМ могли выгибаться до сферы радиусом более 1 мм.

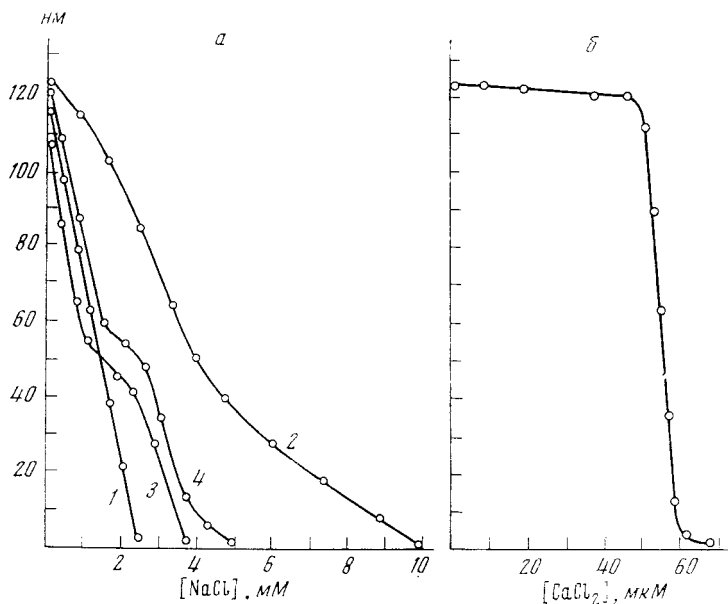


Рис. 2. Зависимость расстояния  $t$  между мембранами от концентрации  $NaCl$  (а) и  $CaCl_2$  (б). 1 — рН 3,6; 2 — рН 4,8; 3 — рН 6,9; 4 — рН 8,9

Результаты опытов с влиянием ионной силы среды на равновесное расстояние между БЛМ приведены на рис. 2.

Как видно, расстояние между мембранами уменьшается с увеличением ионной силы. Это происходит по двум причинам: уменьшается толщина диффузионного слоя у заряженной поверхности мембраны и уменьшается поверхностная плотность заряда самой мембраны, причем второй фактор более четко проявляется для ионов двухвалентного  $Ca^{2+}$  по сравнению с одновалентным  $Na^+$ . При замене ионов  $Na^+$  на  $K^+$  ( $KCl$  вместо  $NaCl$ ) измеряемые при одинаковых концентрациях расстояния оказывались на несколько нанометров меньше, что находится в соответствии с лиотропным рядом адсорбируемости одновалентных катионов и вновь указывает на

определенную роль поверхностной плотности заряда мембраны. При достаточном увеличении ионной силы среды происходит слияние двух контактирующих мембран в одну БЛМ (рис. 2). Визуальное наблюдение в отраженном белом свете показывает различие между слиянием «декановых» и гептановых БЛМ. Слияние «декановых» мембран начинается в одной точке через 10—15 мин. после установления равновесного расстояния в 30—40 нм и постепенно распространяется на всю область контакта. При использовании гептана или смеси гептан / декан мембраны сливаются в одну сразу по всей области контакта и измеряемое при этом расстояние между БЛМ не более 4 нм (при точности измерения  $\pm 2$  нм<sup>(2)</sup> относительная ошибка быстро возрастает с уменьшением расстояния между БЛМ до нескольких нанометров, хотя повторяемость результатов остается практически полной). Это расстояние принято равным нулю, и на рис. 2 концентрации солей, при которых происходит слияние мембран, можно определить по точкам пересечения кривых с осью абсцисс.

Изложенные результаты показывают, что расстояние между контактирующими бислойными липидными мембранами зависит от электростатических параметров мембран и среды между мембранами и может варьировать в пределах от единиц до нескольких десятков нанометров.

Институт биологической физики  
Академии наук СССР

Поступило  
7 VII 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. П. Елкин, Г. Н. Берестовский, Сб. Биофизика мембран, Паланга, 1973.  
<sup>2</sup> А. П. Елкин, Г. Н. Берестовский, Биофизика, т. 19, № 5 (1974).