

Vodne pore v ravninskih lipidnih dvoslojih različnih sestav

Alenka Maček Lebar in Peter Kramar

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, 1000 Ljubljana, Slovenija
E-pošta: peter.kramar@fe.uni-lj.si

Povzetek. Razumevanje biofizikalnih lastnosti lipidnih dvoslojev s kontrolirano lipidno sestavo v znanem okolju lahko pripomore k razumevanju vloge različnih lipidnih molekul v bioloških membranah. V študiji obravnavamo nastanek vodnih por v ravninskem lipidnem dvosloju, ki je izpostavljen linearno naraščajoči napetosti. Izmerili smo kapacitivnost, porušitveno napetost in čas do porušitve ravninskih lipidnih dvoslojev sestavljenih iz lipidnih molekul 1- pamitoil 2-oleoil fosfatidilholin (POPC), mešanice molekul POPC + 50 mol % holesterola, POPC + 80 mol % holesterola, molekul POPC in surfaktanta oktaetilen glikol monododecil eter $C_{12}E_8$ ter lipidnih molekul arhej *Aeropyrum pernix K1*. Na podlagi opravljenih meritev smo ovrednotili spremembo kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja v času porušitve. Predpostavili smo, da je sprememba kapacitivnosti posledica nastanka vodnih por, ki smo jim določili polmer. Določili smo tudi del površine ravninskega lipidnega dvosloja, ki ga zasedajo vodne pore. Vodne pore v ravninskih lipidnih dvoslojih sestavljenih iz lipidnih molekul, ki ob izpostavljenosti električnemu polju oblikujejo hidrofilne pore (POPC in POPC z dodatkom $C_{12}E_8$) imajo ob porušitvi ravninskega lipidnega dvosloja večji radij in zasedejo večji delež površine ravninskega lipidnega dvosloja kot vodne pore v ravninskih lipidnih dvoslojih sestavljenih iz lipidnih molekul, ki ob izpostavljenosti električnemu polju oblikujejo zgolj hidrofobne pore (mešanice POPC + holesterol (50 mol % in 80 mol %) ter lipidi arhej *Aeropyrum pernix K1*).

Ključne besede: porušitvena napetost, elektroporacija, hidrofobna pora, hidrofilna pora, POPC

Water pores in planar lipid bilayers composed of different lipids

Basic understanding of the barrier properties of biological membranes can be obtained by studying model systems, such as planar lipid bilayers. Here we study water pores in planar lipid bilayers in the presence of transmembrane voltage. Planar lipid bilayers were exposed to linearly increasing voltage. We measured the capacitance, breakdown voltage, and rupture time of planar lipid bilayers composed of 1-pamitoyl 2-oleoyl phosphatidylcholine (POPC), mixture of POPC + 50 mol % cholesterol, POPC + 80 mol % cholesterol, POPC and surfactant Octaethylene glycol monododecyl ether ($C_{12}E_8$), and archaeal lipids *Aeropyrum pernix K1*. Based on the measurements, we evaluated the change in the capacitance at the moment of the planar lipid bilayer rupture. We assumed the change in the capacitance corresponds to water pores formation. We evaluated the radius of water pores, and the fraction of the area of the planar lipid bilayer that is occupied by water pores. Water pores have larger radii and occupying greater area of the planar lipid bilayer in the planar lipid bilayers, where lipid molecules form hydrophilic pores upon exposure to the electric field (POPC and POPC with addition of $C_{12}E_8$), in comparison to the planar lipid bilayers, where lipid molecules form hydrophobic pores upon exposure to the electric field (mixture of POPC + cholesterol (50 mol % in 80 mol %) and and archaeal lipids *Aeropyrum pernix K1*).

Keywords: breakdown voltage, electroporation, hydrophobic pore, hydrophilic pore, POPC

1 UVOD

Lipidne molekule so osnoven in večinski gradnik bioloških membran. Urejene so v lipidno dvojno plast oziroma lipidni dvosloj. Celične membrane sestavljajo pretežno fosfolipidi, sfingolipidi in steroli, delež posamezne vrste lipidov pa se od ene vrste biološke membrane do druge razlikuje. Citoplazemska membrana, ki ločuje notranjost celice od zunanjega okolja, je prilagojena življenjskemu okolju celice in funkcijam, ki jih ima celica v svojem okolju.

Čeprav se zdi, da lipidni dvosloj zgolj preprečuje v vodi raztopljenim snovem prehajanje z ene strani biološke membrane na drugo, raznovrstnost lipidnih molekul in njihova nadzorovana prostorska organizacija opredeljujeta biofizikalne lastnosti biološke membrane in imata pomembno vlogo pri delovanju celic. Dolžina in stopnja nasičenosti verig maščobnih kislin na primer določata debelino in urejenost hidrofobnega dela biološke membrane; elektrostatični naboj anionskih lipidnih molekul interagira s kationskimi deli proteinov, prisotnimi v biološki membrani. Ekstremne življenjske razmere arhej pa naprimer določajo edinstvene značilnosti citoplazemske membrane arhej, ki jih v veliki meri opredeljujejo struktura in lastnosti lipidnih molekul. Medtem ko so v citoplazemski membrani evkariontskih celic in bakterij lipidi z enostavnimi nerazvejanimi verigami maščobnih kislin in esterskimi vezmi med glicerolom in

hidrofobnim delom ogljikovodikov, hidrofobni del membrane arheje sestavljajo razvezane izoprenoidne verige, ki so s preostalim delom molekule povezane z etrsko vezjo. Etrske vezi so močnejše od estrskih, kar je verjetno eden od razlogov, da arheje lahko bivajo v okoljih z visokimi temperaturami ter v ekstremno kislem, bazičnem ali slanem okolju.

Razumevanje biofizikalnih lastnosti lipidnih dvoslojev s kontrolirano lipidno sestavo v znanem okolju lahko pomembno prispeva k razumevanju vloge različnih lipidnih molekul v bioloških membranah. S tem namenom so nastali preprosti modeli, kot so umetni liposomi ali vezikli, ki posnemajo geometrijo in velikost celične membrane, ter ravninski lipidni dvosloji, ki predstavljajo zgolj majhen košček celične membrane. Ravninski lipidni dvosloj običajno pripravimo na majhni odprtini v hidrofobni pregradi, ki ločuje dva rezervoarja, napolnjena z elektrolitom [1]. Elektrode, ki jih potopimo v elektrolit, omogočajo meritve električnih lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja. V tem primeru ravninski lipidni dvosloj obravnavamo kot nepopoln kondenzator, kot vzporedno vezavo idealnega kondenzatorja s kapacitivnostjo C in upora z upornostjo R [2], [3]. Z merilnimi metodami, ki omogočajo bodisi nadzorovanje napetosti na ravninskem lipidnem dvosloju bodisi nadzorovanje vsiljenega toka, lahko določimo električne lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja in opazujemo nastajanje strukturnih sprememb, ki se odražajo v spremenjenih električnih lastnostih [4], [5], [6], [7].

Če na ravninskem lipidnem dvosloju vzpostavimo napetost, se spremenita oba parametra modela ravninskega lipidnega dvosloja, R in C . Simulacije molekularne dinamike (MD) so pokazale, da ob prisotni napetosti na ravninskem lipidnem dvosloju v lipidni dvosloj vdirajo vodne molekule v obliki t. i. vodnih prstov. Če se dva vodna prsta, ki sta nastala na nasprotnih straneh lipidnega dvosloja, ujmeta, nastane vodna ali hidrofobna pora [8], [9]. Če lipidne molekule, ki so v stiku z molekulami vode v pori, preusmerijo polarne glave proti vodnim molekulam, stabilizirajo poro v hidrofilni obliki, kar omogoči, da v poro vstopi več vodnih molekul in celo ioni. Take prevodne poti zmanjšajo R ravninskega lipidnega dvosloja. Nastanek hidrofilnih por vodi tudi do zmanjšanja C ravninskega lipidnega dvosloja, saj se dielektrični konstanti lipidnega dvosloja in vode močno razlikujeta [10], [11]. Če je vzpostavljena napetost na ravninskem lipidnem dvosloju prevelika, povzroči nepopravljive poškodbe in ravninski lipidni dvosloj se poruši. Napetost, pri kateri se ravninski lipidni dvosloj poruši, imenujemo porušitvena napetost U_{br} .

Hidrofobne ali vodne pore v ravninskem lipidnem dvosloju so bile prvič predstavljene pred desetletji v Abidorjevi teoriji elektroporacije [12]. Simulacije molekularne dinamike so nastanek vodnih por potrdile [13]. Študije, ki so povezale eksperimentalne podatke z obstojem vodnih por, pa so zelo redke. Anosov in sodelavci [14] so spremembe kapacitivnosti ravninskega

lipidnega dvosloja zaradi nastanka vodnih por opazili kot majhno nihanje toka, ki so ga povezali s številom vodnih por v ravninskem lipidnem dvosloju. V eni od preteklih študij [15] smo iz eksperimentalnih podatkov ovrednotili spremembo kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja tik pred porušitvijo in predpostavili, da je sprememba kapacitivnosti posledica nastanka vodnih por. Ocenili smo velikost vodnih por in delež površine ravninskega lipidnega dvosloja, ki ga pred porušitvijo zapolnjujejo vodne pore. V pričujoči študiji smo na opisani način obravnavali ravninske lipidne dvosloje, ki smo jih zgradili iz petih lipidnih sestav. Ker so v bioloških membranah v veliki meri zastopani fosfolipidi, smo kot tipčen fosfolipid izbrali POPC (1-pamitoil 2-oleoil fosfatidilholin). Ključna komponenta bioloških membran je poleg fosfolipidov in sfingolipidov tudi skupina sterolov. V skupino sterolov uvrščamo holesterol, zato smo ravninske lipidne dvosloje pripravili tudi iz mešanic POPC in holesterola. Holesterol se v bioloških membranah sicer pojavlja v širokem razponu koncentracij, a v študiji smo obravnavali le dve; 50 mol % in 80 mol %. Kot primer lipidnih molekul, ki sestavljajo membrane arheje, smo izbrali lipide, izolirane iz arheje *Aeropyrum pernix K1*. Na električne lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev lahko vpliva tudi dodatek površinsko aktivnih snovi ali surfaktantov, zato smo proučili, kako na nastajanje vodnih por v ravninskem lipidnem dvosloju, ki je zgrajen iz molekul POPC, vpliva dodatek surfaktanta $C_{12}E_8$ (oktaetilen glikol monododecil eter).

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Priprava ravninskih lipidnih dvoslojev

Ravninske lipidne dvosloje smo pripravili z Montal-Müllerjevo metodo [16] iz lipida POPC (1-pamitoil 2-oleoil fosfatidilholin, Avanti Polar-Lipids Inc. USA), mešanic POPC in holesterola (>98%, Avanti Polar-Lipids Inc. USA), mešanic POPC in surfaktanta $C_{12}E_8$ (oktaetilen glikol monododecil eter, Fluke, Švica) ter lipidov izločenih iz arheje *Aeropyrum pernix K1*, ki so mešanica lipida AI (2,3-di-O-sesterterpanyl-sn-glycerol-1-phospho-myoinositol) in AGI (2,3-di-O-sesterterpanyl-sn-glycerol-1-phospho-1'-(2'-O- α -D-glucosyl)-myo-inositol). Lipide iz arheje so izolirali na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Lipide smo raztopili v mešanici heksana in etanola (razmerje 9:1) v koncentraciji 10 mg/ml. Mešanice POPC in izbranih molekul smo pripravili tako, da smo tik pred poskusom odmerili ustrezno količino obeh lipidnih raztopin in ju v majhni plastični epruveti zmešali v zelenem razmerju. POPC in holesterol smo zmešali v dveh razmerjih, 50 mol % in 80 mol %; POPC in surfaktant $C_{12}E_8$ pa v razmerju 10 mol %. Za pripravo torusa smo uporabili mešanico heksadekana in pentana v razmerju 3 : 7. Kot elektrolit, v katerem so bile elektrode, smo uporabili mešanico 0,1 M KCl in

0,01 M Hepesa v razmerju 1 : 1, ki smo ji dodali nekaj kapljic 1 M NaOH, da smo dobili pH 7,4.

Ravninske lipidne dvosloje smo tvorili na okrogli luknjici s premerom 117 μm (d) v tanki teflonski foliji, ki smo jo vstavili med dva rezervoarja teflonske komore. Na obe strani luknjice v teflonski foliji smo najprej kanili 1 μl lipidne raztopine. Ko je lipidno topilo popolnoma izhlapelo, smo na obe strani luknjice kanili še 1,5 μl mešanice heksadekana in pentana. Oba rezervoarja smo napolnili z elektrolitom, tako da je bila gladina elektrolita tik pod luknjo. Na površino elektrolita v vsakem rezervoarju smo previdno nanесли 2 μl lipidne mešanice in počakali vsaj 15 minut, da se je lipidna kapljica razširila po gladini in tako tvorili lipidni enosloj. Ravninski lipidni dvosloj smo nato zgradili tako, da smo gladino elektrolita v obeh rezervoarjih sočasno dvignili tik nad luknjico (slika 1A). Lipidna enosloja na gladini elektrolita v obeh rezervoarjih med dvigovanjem gladine na luknjici tvorita ravninski lipidni dvosloj. Ko smo ravninski lipidni dvosloj porušili, smo novega zgradili tako, da smo gladini elektrolita znižali pod luknjico in ju nato ponovno dvignili. Vsi poskusi so bili izvedeni pri sobni temperaturi (24°C).

Napetost na ravninskem lipidnem dvosloju smo vzpostavili z napetostno krmiljenim merilnim sistemom [17]. Sistem je sestavljen iz signalnega generatorja, dveh elektrod Ag-AgCl (E-205, IVM, ZDA), ki ju potopimo v elektrolit (po eno v rezervoar na vsaki strani ravninskega lipidnega dvosloja), ojačevalnikov za merjenje transmembranskega toka in transmembranske napetosti ter osciloskop. Transmembransko napetost smo izmerili z diferencialnim ojačevalnikom LeCroy 1822, za meritve transmembranskega toka pa smo uporabili v laboratoriju narejen ampermeter [18]. Oba signala smo shranili z osciloskopom LeCroy Waverunner-2 354M in ju analizirali pozneje v programskem okolju Matlab.

2.2 Meritve

Vsakemu tvorjenemu ravninskemu lipidnemu dvosloju (slika 1A) smo izmerili kapacitivnost C z metodo razelektritve kondenzatorja (slika 1B) in ga nato izpostavili linearno naraščajoči napetosti (slika 1C). Uporabili smo 7 različnih strmin linearno naraščajoče napetosti k_u : 4,8 kV/s, 5,5 kV/s, 7,8 kV/s, 11,5 kV/s, 16,7 kV/s, 21,6 kV/s in 48,1 kV/s [18]. V trenutku t_{br} , tj. čas porušitve ravninskega lipidnega dvosloja, ko smo zaznali nenaden porast transmembranskega toka, smo izmerili napetost, ki povzroči porušitev ravninskega lipidnega dvosloja, tj. porušitveno napetost U_{br} (slika 1C). Kapacitivnost C smo normalizirali na površino luknjice v teflonski foliji ($A = 1,075 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2$) in izračunali specifično kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja c_{BLM} .

2.3 Analiza eksperimentalnih podatkov

V analizo smo zajeli vsaj 18 ravninskih lipidnih dvoslojev, ki smo jih zgradili iz izbranih lipidov. Vsem smo izmerili specifično kapacitivnost in nato določili

povprečno vrednost c_{BLM} ravninskih lipidnih dvoslojev z enako lipidno sestavo. Za vsako lipidno sestavo in vsak naklon naraščajoče napetosti k_u smo naredili vsaj tri meritve porušitvene napetosti U_{br} . Povprečne U_{br} , izmerjene za dano lipidno sestavo pri različnih naklonih linearno naraščajoče napetosti, smo primerjali z enosmernim testom ANOVA. Za primerjavo povprečnih U_{br} pri enakih naklonih k_u , a različnih lipidnih sestavah pa smo uporabili t-test. Ker so bile variance povprečnih U_{br} pri naklonih linearno naraščajoče napetosti $k_u = 7,8 \text{ kV/s}$ in $k_u = 11,5 \text{ kV/s}$ statistično različne, smo za primerjavo uporabili Mann-Whitneyjev test. Privzeli smo, da je razlika med eksperimentalnimi skupinami statistično značilna pri vrednostih $p < 0,05$.

Povprečnim vrednostim U_{br} , ki smo jih določili za ravninske lipidne dvosloje določene lipidne sestave pri različnih naklonih linearno naraščajoče napetosti, smo prilagodili dvoparametersko funkcijo

$$U = \sqrt[4]{a + \frac{b}{t}}, \quad (1)$$

ki jo je predlagal Sabotin idr. [19]. Parameter $\sqrt[4]{a}$ je asimptota funkcije in po analogiji z intenzivnostno-časovno krivuljo za vzdražne celice predstavlja najmanjšo napetost U_{brmin} , s katero porušimo ravninski lipidni dvosloj določene lipidne sestave. Parameter b pa določa ukrivljenost funkcije. Po analogiji z intenzivnostno-časovno krivuljo za vzdražne celice smo tudi za ravninske lipidne dvosloje različnih sestav določili kronaksijo $t_c = \frac{b}{15 \cdot a}$, čas, v katerem dosežemo porušitev ravninskega lipidnega dvosloja z napetostjo, ki znaša $2 \cdot U_{brmin}$.

2.4 Sprememba kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja ob porušitvi

Tok $i(t)$, ki prinaša naboj na ravninski lipidni dvosloj, lahko zapišemo kot

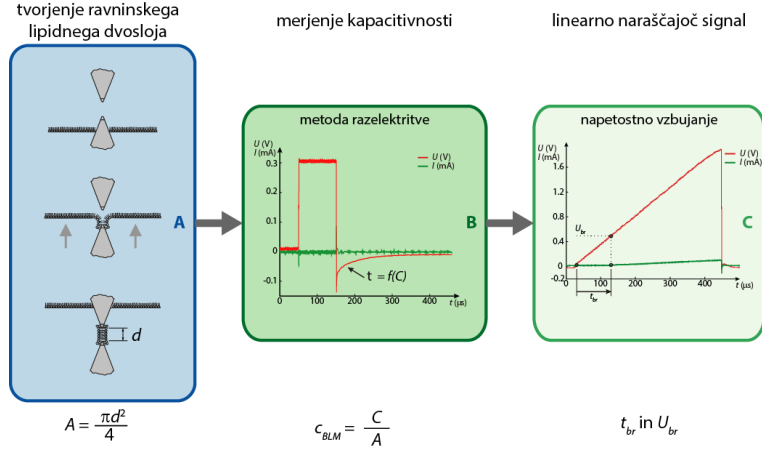
$$\begin{aligned} i(t) &= \frac{u(t)}{R(t)} + \frac{dQ(t)}{dt} = \\ &= \frac{u(t)}{R(t)} + \frac{d(C(t)u(t))}{dt} = \\ &= \frac{u(t)}{R(t)} + C(t) \frac{du(t)}{dt} + u(t) \frac{dC(t)}{dt}. \end{aligned} \quad (2)$$

Ker smo med eksperimenti izpostavili ravninski lipidni dvosloj linearno naraščajoči napetosti z naklonom k_u , enačbo 2 zapišemo kot

$$i(t) = \frac{k_u}{R(t)}t + C(t)k_u + k_u t \frac{dC(t)}{dt}. \quad (3)$$

Tok $i(t)$ v trenutku t_{br} je

$$i(t_{br}) = \frac{k_u}{R(t_{br})}t_{br} + C(t_{br})k_u + k_u t_{br} \left. \frac{dC(t)}{dt} \right|_{t_{br}}. \quad (4)$$



Slika 1: Merilni protokol obsega tvorjenje ravninskega lipidnega dvosloja (A), merjenje kapacitivnosti (B) in merjenje porušitvene napetosti U_{br} ravninskega lipidnega dvosloja izpostavljenega linearno naraščajočem signalu (C).

Ker smo eksperimentalno izmerili t_{br} in $i(t_{br})$, lahko izračunamo $\frac{d(C(t))}{dt}|_{t_{br}}$. Privzamemo, da so spremembe C zaradi tanjšanja ravninskega lipidnega dvosloja v električnem polju dovolj majhne, da jih lahko zanemarimo. Zato v enačbi 4 upoštevamo, da je vrednost $C(t_{br})$ enaka vrednosti C pred izpostavljenostjo ravninskega lipidnega dvosloja linearno naraščajoči napetosti. $R(t_{br})$ smo določili iz eksperimentalnih podatkov na način, ki sta ga podrobneje opisala Kramar in Miklavčič [20].

2.5 Površina ravninskega lipidnega dvosloja, ki jo zasedajo vodne pore

Študije molekularne dinamike so pokazale, da se ob prisotnosti dovolj velikega električnega polja v ravninski lipidni dvosloj vrinejo vodne molekule, ki ustvarijo nekakšen vodni most med raztopinama na obeh straneh ravninskega lipidnega dvosloja. Prisotnost vodnih molekul so poimenovali vodne pore [10], [11], [21]. Privzamemo lahko, da so tik pred trenutkom t_{br} v ravninskem lipidnem dvosloju že prisotne strukturne nepravilnosti v obliki vodnih por. Zato C_{br} zapišemo kot

$$C_{br} = \sum_{i=1}^n C_{pi} + \sum_{j=1}^m C_{lj}, \quad (5)$$

kjer je $C_{pi} = \varepsilon_p \varepsilon_0 \frac{A_{pi}}{D}$ kapacitivnost i -te vodne pore in $C_{lj} = \varepsilon_l \varepsilon_0 \frac{A_{lj}}{D}$ kapacitivnost j -tega področja urejenega ravninskega lipidnega dvosloja. Dielektrična konstanta področja, kjer je nastala vodna pora, ε_p , je enaka dielektrični konstanti vode ($\varepsilon_p = 80$), dielektrična konstanta področja, kjer vodnih por ni, ε_l , pa je enaka dielektrični konstanti ravninskega lipidnega dvosloja ($\varepsilon_l = 2$). ε_0 je dielektrična konstanta vakuumu ($\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$). Debelina D lipidnega dvosloja določene sestave je bila določena s simulacijami molekularne dinamike ali pa povzeta iz literature (tabela 1). Ker za mešanico POPC in 80 mol % holesterola v literaturi nismo našli

podatka o debelini, smo zanjo privzeli vrednost 44,0 Å. Površina ravninskega lipidnega dvosloja A je sestavljena iz področja, ki ga zasedajo vodne pore $\sum_{i=1}^n A_{pi}$, in iz področja, kjer vodnih por ni $\sum_{j=1}^m A_{lj}$. Zato celotno površino ravninskega lipidnega dvosloja zapišemo kot

$$A = \sum_{i=1}^n A_{pi} + \sum_{j=1}^m A_{lj}. \quad (6)$$

Zapis 6 upoštevamo v enačbi 5 in dobimo

$$C_{br} = \frac{\varepsilon_0}{D} (\varepsilon_l A + \sum_{i=1}^n A_{pi} (\varepsilon_p - \varepsilon_l)). \quad (7)$$

Če upoštevamo, da je kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja C na začetku poskusa, ko vodnih por ni, $C = \varepsilon_l \varepsilon_0 \frac{A}{D}$, lahko spremembo kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja ΔC zaradi prisotnosti vodnih por zapišemo kot

$$\Delta C = C_{br} - C = -\frac{\varepsilon_0}{D} \sum_{i=1}^n A_{pi} \cdot (\varepsilon_p - \varepsilon_l). \quad (8)$$

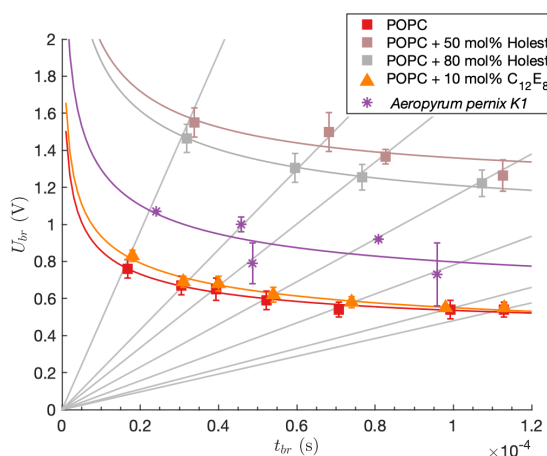
Na podlagi enačbe 8 lahko ocenimo delež površine ravninskega lipidnega dvosloja, ki ga zasedajo vodne pore ($\sum_{i=1}^n A_{pi}/A$). Spremembo kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja ΔC smo izračunali iz eksperimentalnih podatkov na podlagi enačb 1 in 4 kot $t_c \cdot \frac{d(C(t))}{dt}|_{t_{br}}$.

3 REZULTATI

3.1 Eksperimentalni rezultati

Za vse ravninske lipidne dvosloje smo določili specifično kapacitivnost c_{BLM} . Povprečne vrednosti c_{BLM} za posamezno lipidno sestavo in število meritev smo podali v tabeli 1. Izmerili smo tudi porušitveno napetost

U_{br} in čas porušitve za vse lipidne sestave in strmine linearno naraščajoče napetosti (slika 2).



Slika 2: Porušitvene napetosti različnih sestav ravninskih lipidnih dvoslojev, izmerjenih z linearno naraščajočim napetostnim signalom. Sive črte predstavljajo naklone (k_u) linearno naraščajočih napetosti. Barvne krivulje predstavljajo dvoparametersko krivuljavo (1), ki je napeta na izmerjene vrednosti porušitvenih napetosti U_{br} in življenskih časov t_{br} ravninskih lipidnih dvoslojev iz POPC, mešanice POPC in 50 mol % holesterola, mešanice POPC in 80 mol % holesterola, mešanice POPC in 10 mol % surfaktanta $C_{12}E_8$ ter lipidov arhej *Aeropyrum pernix K1*.

3.2 Velikost vodnih por in njihova površina v ravninskem lipidnem dvosloju

Za vseh pet lipidnih sestav smo izračunali spremembo kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja v časovni enoti pri t_{br} . Rezultati so predstavljeni na sliki 3. Spremembe kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja so eksponentno odvisne od U_{br} :

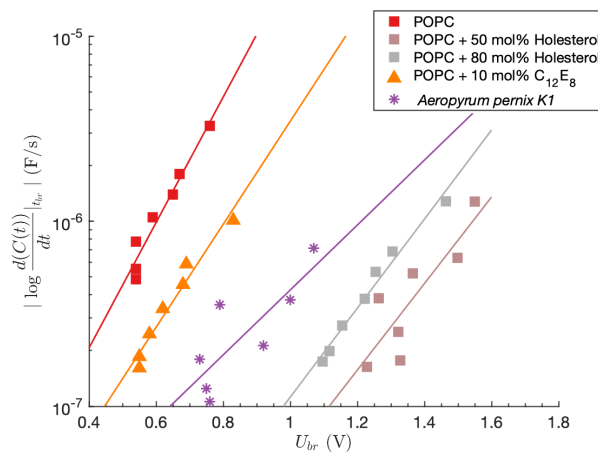
$$\ln\left(\frac{dC}{dt}\right) = m \cdot U_{br} + n. \quad (9)$$

Evans s sodelavci je opazil podobno odvisnost ob porušitvi ravninskih lipidnih dvoslojev s hitrim spreminjanjem mehanične napetosti [22] in predstavil model, ki parameter m povezuje s polmerom por r , v skladu z enačbo

$$m = \frac{\pi r^2}{k_B T}, \quad (10)$$

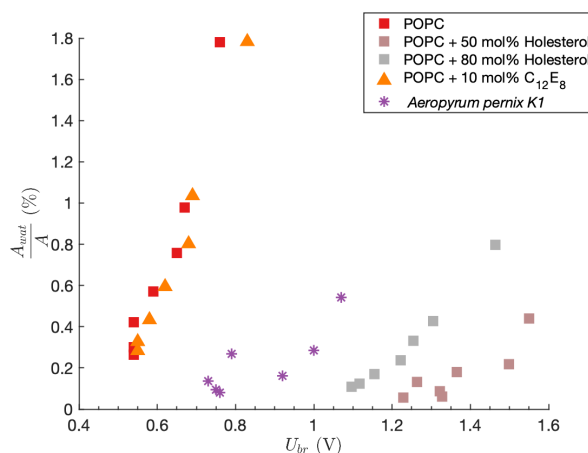
kjer je k_B Boltzmannova konstanta in T absolutna temperatura. Relacijo smo uporabili za oceno polmera por v trenutku porušitve pri sobni temperaturi ($T = 298$ K) po izpostavitvi ravninskih lipidnih dvoslojev linearno naraščajoči napetosti, so bili 0,101 nm, 0,084 nm, 0,085 nm, 0,092 nm, 0,073 nm za ravninske lipidne dvosloje, sestavljene iz POPC, POPC + 50 mol % holesterola, POPC + 80 mol % holesterola, POPC in $C_{12}E_8$ in lipidov arhej *Aeropyrum pernix K1*. Parameter $\exp(n)$

lahko obravnavamo kot hitrost spremembe kapacitivnosti ali hitrost tvorbe vodnih por [22]. Vrednost parametra $\exp(n)$ znaša $9,1 \cdot 10^{-9}$ F/s, $2,5 \cdot 10^{-10}$ F/s, $4,4 \cdot 10^{-10}$ F/s, $5,7 \cdot 10^{-9}$ F/s in $7,5 \cdot 10^{-9}$ F/s za ravninske lipidne dvosloje, sestavljene iz POPC, POPC + 50 mol % holesterola, POPC + 80 mol % holesterola, POPC in $C_{12}E_8$ in lipidov arhej *Aeropyrum pernix K1*.



Slika 3: Sprememba kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja v časovni enoti pri t_{br} v odvisnosti od porušitvene napetosti U_{br} . Naklon m linearne zveze med $\ln\left(\frac{dC}{dt}\right)$ in U_{br} je povezan z radijem por, ki nastanejo v ravninskem lipidnem dvosloju. Podrobnosti so zapisane v besedilu.

Na sliki 4 je prikazan delež površine vodnih por v ravninskem lipidnem dvosloju v odvisnosti od porušitvene napetosti U_{br} , ki smo ga določili po enačbi 8. Največji delež površine, zaseden z vodnimi porami, je bil dosežen pri ravninskih lipidnih dvoslojih, sestavljen zgolj iz lipidnih molekul POPC in ravninskih lipidnih dvoslojev, pri katerih smo lipidnim molekulam POPC dodali surfaktant $C_{12}E_8$.



Slika 4: Delež površine vodnih por v ravninskem lipidnem dvosloju v odvisnosti od porušitvene napetosti U_{br} .

Tabela 1: Specifična kapacitivnost c_{BLM} , izmerjena na ravninskih lipidnih dvoslojih izbrane sestave z metodo razelektritve; ocenjeni polmeri por r v trenutku porušitve in izračunana hitrost spremembe kapacitivnosti oziroma hitrost nastajanja vodnih por $\exp(n)$ [22]; debelina (D) ravninskega lipidnega dvosloja izbrane sestave in površina, ki jo v ravninskem lipidnem dvosloju zajema ena lipidna molekula (A_m). Podatka D in A_m smo določili s simulacijami molekularne dinamike ali pa povzeli iz literature.

lipidna molekula / mešanica	c_{BLM} ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	r (nm)	$\exp(n)$ nF/s	D (\AA)	A_m (\AA^2)
POPC	0.51 ± 0.17 (48)	0.101	9.10	37.5 [23]	60.4 ± 0.7 [23]
POPC + 50 mol % holesterol	0.55 ± 0.16 (40)	0.084	0.25	44.0 [24]	40.7 ± 0.4 [25]
POPC + 80 mol % holesterol	0.52 ± 0.12 (25)	0.085	0.44	N/A*	N/A*
POPC + 10 mol % C_{12}E_8	0.21 ± 0.02 (37)	0.092	5.72	34.8 [23]	60.7 ± 0.7 [23]
<i>Aeropyrum pernix K1</i>	0.16 ± 0.06 (18)	0.073	7.49	42.5 [26]	83.4 ± 0.4 [26]

* Podatek ni znan.

4 DISKUSIJA

V študiji smo analizirali rezultate dobljene v predhodnih študijah, v katerih smo ravninske lipidne dvosloje petih različnih sestav izpostavili linearno naraščajočim napetostnim signalom s sedmimi različnimi nakloni. Pri vsakem naklonu linearne naraščajoče napetosti smo izmerili napetost U_{br} , pri kateri se ravninski lipidni dvosloj poruši, in čas porušitve t_{br} . Na podlagi meritev smo določili spremembo kapacitivnosti ob porušitvi in delež površine ravninskega lipidnega dvosloja, ki ga ob porušitvi zasedajo vodne pore.

Porušitvena napetost U_{br} je odvisna od sestave ravninskega lipidnega dvosloja 2. Med izbranimi lipidnimi sestavami smo pri vseh naklonih linearno naraščajoče napetosti najmanjše U_{br} izmerili pri ravninskih lipidnih dvoslojih, ki so bili sestavljeni iz lipidnih molekul POPC. Dodatek surfaktanta C_{12}E_8 (10 mol %) U_{br} ni znatno spremenil (slika 2). Statistično značilno višje U_{br} smo pri vseh naklonih linearno naraščajoče napetosti izmerili pri ravninskih lipidnih dvoslojih, zgrajenih iz lipidov arhej *Aeropyrum pernix K1*; še višje porušitvene napetosti pa smo izmerili pri ravninskih lipidnih dvoslojih, ki so jih sestavljale mešanice lipida POPC in holesterola.

Meritve U_{br} z različnimi nakloni napetostnega signala (slika 2) so pokazale tudi, da je U_{br} odvisna od hitrosti naraščanja napetosti na ravninskem lipidnem dvosloju. Večji je naklon linearno naraščajočega signala, večjo napetost na ravninskem lipidnem dvosloju potrebujemo za njegovo porušitev. Rezultatom (t_{br} , U_{br}) za vse različne lipidne sestave smo prilagodili krivuljo, ki jo je predlagal Sabotin idr. [19]. Ravninski lipidni dvosloj so avtorji obravnavali kot tanek visko-elastičen film z nihajočima površinama in model uporabili za napovedovanje t.i. kritične napetosti in kritičnega časa, v katerem se ravninski lipidni dvosloj poruši ob izpostavitvi enosmerni električni napetosti.

Že pred desetletji so spreminjanje kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja pred porušitvijo teoretično

povezovali s hitrostjo nastajanja vodnih por [12], [10], [14]. Eksperimentalno pa je na ravninskem lipidnem dvosloju tako majhne spremembe kapacitivnosti težko meriti [14]. V študiji smo spremembo kapacitivnosti ocenili iz meritev napetosti in toka ob porušitvi ravninskega lipidnega dvosloja z linearno naraščajočimi napetostmi različnih naklonov. Spremembe kapacitivnosti v časovni enoti so eksponentno odvisne od U_{br} . Evans s sodelavci je opazoval pogostost nastajanja strukturnih nepravilnosti v membrani lipidnih veziklov, ki so bili na izbranem mestu izpostavljeni linearno naraščajočemu raztezanju med sesanjem v mikropipeto [22]. Opazili so podobno odvisnost med pogostostjo nastajanja strukturnih nepravilnosti oziroma por in velikostjo mehanične obremenitve ter predstavili model, ki omogoča oceno polmera nastalih por (10). Z omenjenim modelom smo izračunali polmere vodnih por, ki v ravninskih lipidnih dvoslojih različnih sestav nastanejo v trenutku porušitve. Ocenili smo, da v ravninskem lipidnem dvosloju, ki je zgrajen iz lipida POPC, nastanejo vodne pore s polmerom 0,101 nm. Nekoliko manjši je polmer vodnih por v ravninskih lipidnih dvoslojih, kjer smo lipidu POPC dodali C_{12}E_8 , 0,092 nm. Še nekoliko manjši je polmer vodnih por, ki nastanejo v mešanicah lipida POPC in holesterola, 0,085 nm v primeru POPC + 80 mol % holesterola ter 0,084 v primeru POPC + 80 mol % holesterola. Ocenili smo, da najmanjše pore nastanejo v ravninskih lipidnih dvoslojih, zgrajenih iz lipidov arhej *Aeropyrum pernix K1*, tj. z radijem 0,073 nm. Izračunane vrednosti velikosti vodnih por se dobro skladajo z velikostmi vodnih por, ki so jih s teoretičnim modelom določili Akimov idr. [11]. Ravninski lipidni dvosloji sestavljeni iz lipidnih molekul, ki smo jih uporabili v eksperimentih, so bili izpostavljeni električnemu polju tudi v simulacijah molekularne dinamike. Simulacije so pokazale, da so v ravninskih lipidnih dvoslojih, zgrajenih iz lipidov arhej *Aeropyrum pernix K1*, pore zgolj hidrofobne; pore se namreč ne stabilizirajo z upogibom lipidnih molekul v notranjost lipidnega dvosloja [26].

Hidrofobne pore so znatno manjše od hidrofilnih, ki so bile v simulacijah molekularne dinamike opažene, kadar je bil električnemu polju izpostavljen iz molekul POPC sestavljen ravninski lipidni dvosloj [23]. Če v simulacijah molekularne dinamike molekulam POPC dodamo surfaktant $C_{12}E_8$ se molekule $C_{12}E_8$ združijo v skupek s svojimi hidrofilnimi deli v hidrofobnem delu lipidnega dvosloja. Vodne molekule nato v obliki vodnih prstov prodrejo v hidrofilni del skupka molekul $C_{12}E_8$ in z združitvijo dveh vodnih prstov z obeh strani ravninskega lipidnega dvosloja nastane vodna pora, ki je že stabilizirana s hidrofilnimi glavami molekul $C_{12}E_8$. Torej so pore v ravninskem lipidnem dvosloju, zgrajenem iz molekul POPC in z dodatkom molekul $C_{12}E_8$, že od začetka nastanka hidrofilne, zato so podobne velikosti kot pore v ravninskih lipidnih dvoslojih, ki so zgrajeni zgolj iz molekul POPC. Kot rezultat številnih študij lahko zasledimo, da molekule holesterola povežejo preostale lipidne molekule med seboj ter učvrstijo in stabilizirajo lipidni dvosloj [20]. Simulacije molekularne dinamike pa so pokazale, da so pore v lipidnih dvoslojih, ki vsebujejo holesterol, obložene s številnimi molekulami holesterola, ki povečajo togost roba por [28]. Tako ne preseneča, da so pore v ravninskih lipidnih dvoslojih, ki vsebujejo holesterol, nekoliko manjše kot v ravninskem lipidnem dvosloju enake sestave, a brez holesterola.

Na podlagi eksperimentalnih rezultatov smo ocenili tudi delež površine, ki ga zajemajo vodne pore ob porušitvi ravninskega lipidnega dvosloja. Delež površine, ki ga zajemajo vodne pore v ravninskem lipidnem dvosloju zaradi izpostavljenosti eksponentno padajočemu napetostnemu impulzu ter monopolarnemu in bipolarnemu pravokotnemu napetostnemu impulzu, so teoretično ovrednotili Freeman idr. [10]. Po njihovih izračunih je le 0,1 % površine ravninskega lipidnega dvosloja zasedene z vodnimi porami. Nedavno je Anosov (idr. [14]) predstavil teoretični model, ki napove število vodnih por v ravninskem lipidnem dvosloju na podlagi meritev spreminjanja toka ob konstantni napetosti na ravninskem lipidnem dvosloju. Njihovi izračuni so pokazali, da površina vodnih por ob faznem prehodu lipidnih molekul (odsotnost dražljaja) ne presega 4,5 % površine ravninskega lipidnega dvosloja. Naši rezultati so v področju med 0,26 % in 1,78 %. Največji delež površine ravninskega lipidnega dvosloja zasedajo vodne pore v ravninskih lipidnih dvoslojih iz molekul POPC in molekul POPC z dodatkom surfaktanta $C_{12}E_8$ (1,78 %). V primeru ravninskih lipidnih dvoslojev, ki jih sestavljajo manj gibljive in med seboj bolj povezane lipidne molekule, pa delež površine, zapolnjen z vodnimi porami, pade na polovico (0,80 % za mešanico POPC in 80 mol % holesterola) ali več (*Aeropyrum pernix* K1 0,54 % in mešanice POPC in holesterola 50 mol % 0,44 %).

Naša ocena polmera vodnih por, ki nastanejo ob porušitvi ravninskega lipidnega dvosloja, in deleža

površine ravninskega lipidnega dvosloja, ki ga zasedajo vodne pore v trenutku porušitve, temelji na preprosti predpostavki, da so majhne vodne pore prisotne v ravninskem lipidnem dvosloju že pred porušitvijo; znatna razlika v dielektričnosti ravninskega lipidnega dvosloja ($\epsilon = 2$) in vode ($\epsilon = 80$) pa je edini razlog za spremembo kapacitivnosti ravninskega lipidnega dvosloja. Ta predpostavka je precejšnja poenostavitev vseh pojavov, ki so vključeni v nastanek in obstoj vodnih por. Blizu naelektrene površine, kot je ravninski lipidni dvosloj v električnem polju, se namreč preurejajo in orientirajo tako ioni kot vodne molekule [29], [30], [31], kar lahko povzroči spremembe dielektričnosti. Za zanesljivejše rezultate bi bilo tako treba upoštevati vsaj orientacijo vodnih molekul v porah in blizu ravninskega lipidnega dvosloja. Vseeno pa lahko trdimo, da je mogoče na podlagi opisanih meritev sklepati, kako velike, kakšne in kako številne vodne pore nastajajo v ravninskem lipidnem dvosloju, kar znatno razširi uporabnost tovrstnih meritev.

ZAHVALA

Raziskavo je omogočila Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) v okviru raziskovalnega programa: Elektroporacija v biologiji, biotehnologiji in medicini P2-0249.

LITERATURA

- [1] C. Siontorou, G.P. Nikoleli, D. Nikolelis, S. Karapetis, *Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future*, *Membranes (Basel)*. 7 (2017) 38.
- [2] C. Brosseau, E. Sabri, *Resistor-capacitor modeling of the cell membrane: A multiphysics analysis*, *J. Appl. Phys.* 129 (2021) 011101.
- [3] M. Naumowicz, Z.A. Figaszewski, *Pore Formation in Lipid Bilayer Membranes made of Phosphatidylcholine and Cholesterol Followed by Means of Constant Current*, *Cell Biochem. Biophys.* 66 (2013) 109–119.
- [4] P. Kramar, D. Miklavčič, M. Kotulska, A.M. Lebar, *Voltage- and Current-Clamp Methods for Determination of Planar Lipid Bilayer Properties*, in: *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes*, 2010: pp. 29–69.
- [5] M. Naumowicz, J. Kotynska, A. Petelska, Z. Figaszewski, *Impedance analysis of phosphatidylcholine membranes modified with valinomycin*, *Eur. Biophys. J.* (2006).
- [6] V. Shlyonsky, F. Dupuis, D. Gall, *The OpenPicoAmp: An Open-Source Planar Lipid Bilayer Amplifier for Hands-On Learning of Neuroscience*, *PLoS One*. 9 (2014) e108097.
- [7] L.D. Mosgaard, K.A. Zecchi, T. Heimburg, R. Budvytyte, *The effect of the nonlinearity of the response of lipid membranes to voltage perturbations on the interpretation of their electrical properties. A new theoretical description*, *Membranes (Basel)*. 5 (2015) 495–512.
- [8] T. Kotnik, L. Rems, M. Tarek, D. Miklavčič, *Membrane Electroporation and Electroporation: Mechanisms and Models*, *Annu. Rev. Biophys.* 48 (2019) 63–91.
- [9] Y. Hu, S.K. Sinha, S. Patel, *Investigating Hydrophilic Pores in Model Lipid Bilayers Using Molecular Simulations: Correlating Bilayer Properties with Pore-Formation Thermodynamics*, *Langmuir*. 31 (2015) 6615–6631.
- [10] S.A. Freeman, M.A. Wang, J.C. Weaver, *Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation*, *Biophys. J.* 67 (1994) 42–56.

- [11] S.A. Akimov, P.E. Volynsky, T.R. Galimzyanov, P.I. Kuzmin, K.V. Pavlov, O.V. Batishchev, *Pore formation in lipid membrane II: Energy landscape under external stress*, *Sci. Rep.* 7 (2017) 12509.
- [12] I.G. Abidor, V.B. Arakelyan, L.V. Chernomordik, Y.A. Chizmadzhev, V.F. Pastushenko, M.P. Tarasevich, *Electric breakdown of bilayer lipid membranes. I. The main experimental facts and their qualitative discussion*, *J. Electroanal. Chem.* (1979).
- [13] D.P. Tieleman, H. Leontiadou, A.E. Mark, S.J. Marrink, *Simulation of Pore Formation in Lipid Bilayers by Mechanical Stress and Electric Fields*, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 6382–6383.
- [14] A.A. Anosov, E.Y. Smirnova, A.A. Sharakshane, E.A. Nikolayeva, Y.S. Zhdankina, *Increase in the current variance in bilayer lipid membranes near phase transition as a result of the occurrence of hydrophobic defects*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1862 (2020) 183147.
- [15] A.M. Lebar, D. Miklavčič, M. Kotulska, P. Kramar, *Water pores in planar lipid bilayers at fast and slow rise of transmembrane voltage*, *Membranes (Basel)*. 11 (2021).
- [16] M. Montal, P. Mueller, *Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69 (1972) 3561–3566.
- [17] P. Kramar, D. Miklavčič, A.M. Lebar, *A system for the determination of planar lipid bilayer breakdown voltage and its applications*, *IEEE Trans. Nanobioscience.* 8 (2009) 132–138.
- [18] P. Kramar, D. Miklavčič, A.M. Lebar, *Determination of the lipid bilayer breakdown voltage by means of linear rising signal*, *Bioelectrochemistry.* 70 (2007) 23–27.
- [19] I. Sabotin, A.M. Lebar, D. Miklavčič, P. Kramar, *Measurement protocol for planar lipid bilayer viscoelastic properties*, *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.* 16 (2009) 1236–1242.
- [20] P. Kramar, D. Miklavčič, *Effect of the cholesterol on electroporation of planar lipid bilayer*, *Bioelectrochemistry.* 144 (2022) 108004.
- [21] Z.A. Levine, P.T. Vernier, *Life cycle of an electropore: Field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation*, *J. Membr. Biol.* 236 (2010) 27–36.
- [22] E. Evans, V. Heinrich, F. Ludwig, W. Rawicz, *Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes*, *Biophys. J.* 85 (2003) 2342–2350.
- [23] A. Polak, A. Velikonja, P. Kramar, M. Tarek, D. Miklavčič, *Electroporation threshold of POPC lipid bilayers with incorporated polyoxyethylene glycol (C12E8)*, *J. Phys. Chem. B.* 119 (2015) 192–200.
- [24] M.L. Fernández, G. Marshall, F. Sagués, R. Reigada, *Structural and Kinetic Molecular Dynamics Study of Electroporation in Cholesterol-Containing Bilayers*, *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 6855–6865.
- [25] M. Casciola, D. Bonhenry, M. Liberti, F. Apollonio, M. Tarek, *A molecular dynamic study of cholesterol rich lipid membranes: Comparison of electroporation protocols*, *Bioelectrochemistry.* 100 (2014) 11–17.
- [26] A. Polak, M. Tarek, M. Tomšič, J. Valant, N.P. Ulrih, A. Jamnik, P. Kramar, D. Miklavčič, *Electroporation of archaeal lipid membranes using MD simulations*, *Bioelectrochemistry.* 100 (2014).
- [27] D.S. Dimitrov, *Electric field-induced breakdown of lipid bilayers and cell membranes: A thin viscoelastic film model*, *J. Membr. Biol.* 78 (1984) 53–60.
- [28] T. Shigematsu, K. Koshiyama, S. Wada, *Line tension of the pore edge in phospholipid/cholesterol bilayer from stretch molecular dynamics simulation*, *J. Biomech. Sci. Eng.* (2016).
- [29] A.M. Lebar, A. Velikonja, P. Kramar, A. Igljič, *Internal configuration and electric potential in planar negatively charged lipid head group region in contact with ionic solution*, *Bioelectrochemistry.* 111 (2016) 49–56.
- [30] A. Igljič, E. Gongadze, V. Kralj-Igljič, *Differential capacitance of electric double layer – Influence of asymmetric size of ions, thickness of stern layer and orientational ordering of water dipoles*, *Acta Chim. Slov.* 66 (2019) 534–541.
- [31] M. Drab, E. Gongadze, V. Kralj-Igljič, A. Igljič, *Electric double layer and orientational ordering of water dipoles in narrow channels within a modified Langevin Poisson-Boltzmann model*, *Entropy.* (2020).

Alenka Maček Lebar je diplomirala (1991), magistrirala (1995) in doktorirala (1999) na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Je izredna profesorica na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Raziskovalno in pedagoško se ukvarja z vplivom električnega polja na biološke sisteme.

Peter Kramar je diplomiral (2003), magistriral (2005) in doktoriral (2010) na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Je docent na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Raziskovalno se ukvarja z elektroporacijo ravninskih lipidnih dvoslojev.