КОМПЬЮТЕРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ 2009 Т. 1 № 4 С. 423–436

Ки&М

АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ СЛОЖНЫХ ЖИВЫХ СИСТЕМ

Молекулярное моделирование липидных бислойных мембран

Д. В. Зленко[1,a], П. М. Красильников[1]

[1] Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12

E-mail: [a] zoidberg@erg.biophys.msu.ru

Получено 30 июня 2009 г.

Построена полноатомная модель молекулы липида (дистеароилфосфатидилхолина, ДСФХ) и фрагмента липидной мембраны, необходимая для описания свойств липидных мембран в рамках метода молекулярной динамики. Построенная модель устойчива во времени, обладает термодинамически адекватным распределением энергии по степеням свободы системы и имеет параметры, хорошо согласующиеся с параметрами реального ДСФХ. С использованием построенной модели проведены расчеты проницаемости липидного бислоя для ионов натрия, воды и кислорода. Получены профили подвижности и коэффициентов диффузии этих частиц при их движении сквозь бислой, на основании которых оценены соответствующие коэффициенты проницаемости модельной мембраны. Показано, что липидные мембраны обладают значительным диффузионным сопротивлением не только для молекулы воды и иона натрия, но и для неполярной молекулы кислорода. Предложены теоретические методы расчета потоков исследуемых частиц через липидный бислой, а также методы оценки коэффициентов распределения малых молекул в системах липидный бислой — вода.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, липидные мембраны, проницаемость, диффузия

Permeability of lipid membranes. A molecular dynamic study

D. V. Zlenko[1], P. M. Krasilnikov[1]

[1] *Moscow State University, Biological Faculty, MSU, 1, building 12, GSP-1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia*

Abstract. — A correct model of lipid molecule (distearoylphosphatidylcholine, DSPC) and lipid membrane in water was constructed. Model lipid membrane is stable and has a reliable energy distribution among degrees of freedom. Also after equilibration model system has spatial parameters very similar to those of real DSPC membrane in liquid-crystalline phase. This model was used for studying of lipid membrane permeability to oxygen and water molecules and sodium ion. We obtained the values for transmembrane mobility and diffusion coefficients profiles, which we used for effective permeability coefficients calculation. We found lipid membranes to have significant diffusional resistance to penetration not only by charged particles, such as ions, but also by nonpolar molecules, such as oxygen molecule. We propose theoretical approach for calculation of particle flow across a membrane, as well as methods for estimation of distribution coefficients between bilayer and water phase.

Key words: molecular modeling, lipid membranes, permeability, diffusion

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2009, vol. 1, no. 4, pp. 423–436 (Russian).

© 2009 Д. В. Зленко, П. М. Красильников

1. Введение

Липидные мембраны являются основным структурообразующим элементом живой клетки [19, 33]. В этой связи актуальной задачей является изучение проницаемости липидных мембран для различных молекул и ионов. Так, например, проницаемость мембран для воды имеет большое значение для жизнедеятельности клетки, так как именно она определяет все осмотические явления. Другим примером является низкая проницаемость мембран для ионов, которая лежит в основе использования клеткой градиентов концентраций ионов для запасания энергии. Особый интерес представляет проницаемость липидных мембран живых клеток для малых неполярных молекул, например, кислорода, прямое экспериментальное исследование которой на живых клетках сильно затруднено.

В настоящее время полагают, что диффузионное сопротивление бислойной мембраны не превышает диффузионного сопротивления слоя воды аналогичной толщины. Такие представления сложились под влиянием экспериментов, в которых вычислялась подвижность кислорода в ближайшем окружении флюоресцентных или парамагнитных зондов [1, 27]. При этом не учитывалась способность объемных органических радикалов вносить существенные возмущения в структуру бислоя. Высказывается и другая точка зрения, основанная на сравнении вязкостей воды (10^{-3} Па·сек) и микровязкости бислоя (0.1–0.6 Па·сек). Такое значительное различие в вязкости должно, видимо, влиять на проницаемость бислоя для кислорода или иной малой молекулы. Существует ряд экспериментальных работ, основанных на измерении кинетики проникновения кислорода через монослойные пленки на границе вода-воздух [13, 25, 34], а также через бислойные мембраны, сформированные на границе неперемешивающихся жидкостей [14], в которых показано, что проницаемость липидных пленок для кислорода существенно ниже, чем для слоя воды аналогичной толщины.

Целью работы является: 1. Создание адекватной модели фрагмента липидной мембраны и тестирование даваемых ею оценок макроскопических параметров. 2. Исследование проницаемости модельной мембраны для молекул воды и кислорода, а также иона натрия в экспериментах *in silico*.

2. Материалы и методы

2.1. Молекулярные расчеты

Модельная система состоит из 48 молекул дистеароилфосфатидилхолина (ДСФХ) и 1 759 молекул воды (рис. 1). Для создания адекватной модели липидной мембраны прежде всего необходимо создать полноатомную модель отдельной молекулы липида, так как именно корректная модель молекулы липида является базовым элементом молекулярной модели бислоя. Полноатомная, с явно заданными атомами водорода, модель молекулы ДСФХ была создана нами с использованием пакета программ для квантово-химических расчетов PC GAMESS [3]. Методы квантовой химии использовались для расчета параметров жесткости модели молекулы липида, а также для расчета эффективных зарядов атомов. Использование полноатомных моделей необходимо, так как структура мембраны во многом определяется свойствами гидрофобной области бислоя [19, 33], тем не менее неполноатомные модели используются [2, 16]. Такой подход частично оправдывается экономией вычислительных ресурсов, но является более грубым. Созданные модельные молекулы липидов были уложены в бислойную гексагональную структуру [33] при помощи программ собственной разработки. Для воды была использована модель tip4p [6], в которой имеется дополнительная виртуальная частица, описывающая неподеленные электронные пары атома кислорода, что необходимо для корректного образования водородных связей.

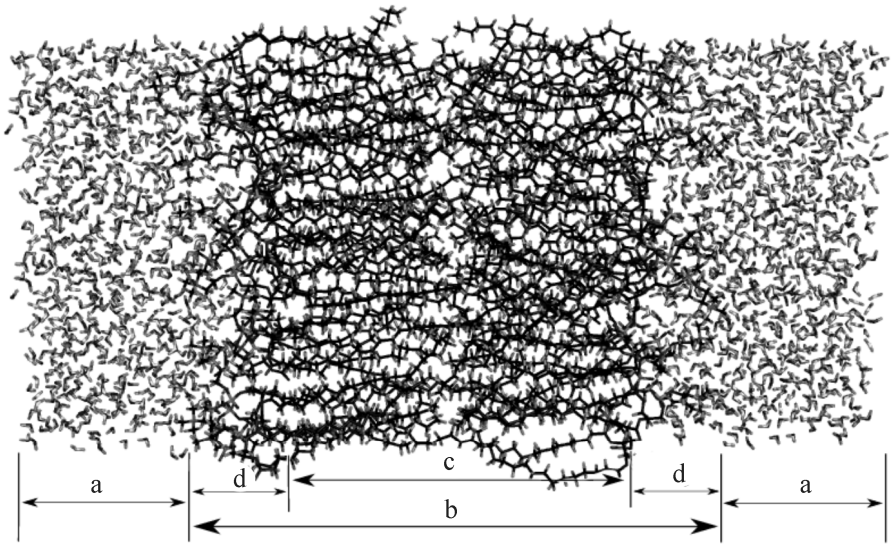

Рис. 1. Общий вид молекулярной модели участка липидной мембраны в жидкокристаллическом состоянии, окруженной водой. Модельная система состоит из 48 молекул дистеароилфосфатидилхолина и 1 759 молекул воды. На рисунке отмечены: a — вода (~ 20 Å), b — липидная мембрана (~ 65 Å), c — гидрофобная область бислоя (~ 35 Å) и d — полярные головки липидов (~ 15 Å)

Расчеты молекулярной динамики проводились с использованием пакета программ GROMACS [7, 11]. Для корректности расчетов МД важным является выбор способа численного решения уравнений движения и подбор оптимального шага интегрирования. Для решения уравнений движения был выбран «стохастически-динамический» (sd) способ как наиболее физически адекватный [6]. Оптимальный шаг интегрирования был определен как наибольший из возможных, для которых результат расчета устойчиво воспроизводился независимо от начальных условий. Анализ показал, что этому условию удовлетворяет шаг интегрирования $\tau \leq 0.25$ фс. Контроль адекватности модели производился на основании следующих критериев: распределение энергии системы по различным степеням свободы должно быть равномерным; средняя энергия, приходящаяся на одну степень свободы системы, должна составлять $\frac{1}{2}$kT. Нам удалось достичь удовлетворительного соответствия модельной системы этим критериям (рис. 3).

Для уравновешивания модели был проведен 10 нс релаксационный расчет молекулярной динамики, финальные координаты атомов которого использовались в качестве исходных для дальнейших расчетов. В результате релаксации мембрана приобрела устойчивую конформацию, характерную для реальных мембран. Параметры воды также достигли устойчивых, реалистичных значений. В частности, величина параметра упорядоченности — характеристики, отражающей локальную подвижность отдельных -CH_2- групп гидрофобных участков молекул липидов, — совпадает с результатами, полученными в реальном эксперименте (рис. 2) [19, 33]. Также в хорошем соответствии с прямым экспериментом находятся распределение плотности вдоль нормали к плоскости мембраны (рис. 2) [там же].

Параметры воды также достигли устойчивых, реалистичных значений: плотность воды составила ~ 1 г/см^3, коэффициент самодиффузии воды $\sim 10^{-5}$ см^2/с. Более того, над поверхностью мембраны образовался слой малоподвижной воды (слой Штерна), имеющий толщину порядка нескольких Å и коэффициент самодиффузии на два порядка ниже, чем в объемной фазе ($\sim 10^{-7}$ см^2/с). Такие параметры находятся в полном согласии с экспериментом [30] и свидетельствуют об адекватности модели.

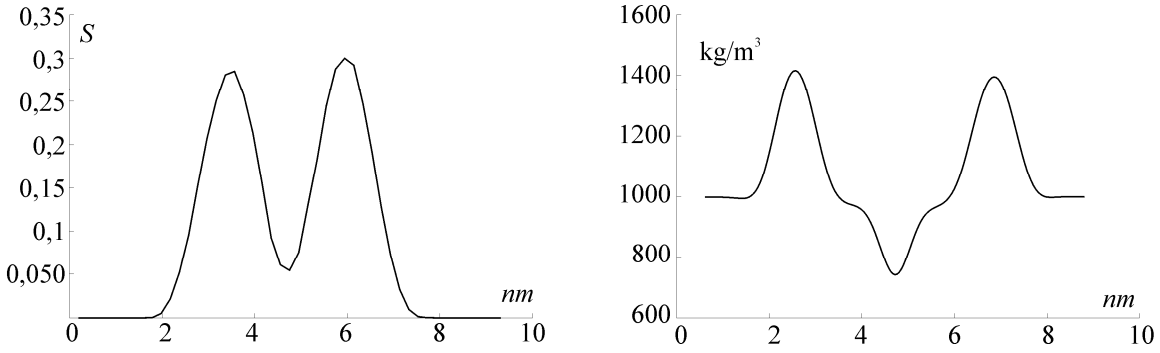

Рис. 2. Параметр упорядоченности для -CH_2- групп остатков жирных кислот (слева) и трансмембранный профиль плотности молекулярной системы (справа)

2.2. Методы оценки молекулярной подвижности

Латеральная диффузия. В случае липидного бислоя интерес представляет диффузия молекул липида в плоскости мембраны [29]. Малые перемещения липидов вдоль нормали к бислою носят колебательный характер и не могут рассматриваться как диффузионные [36]. Экспериментальное исследование диффузионных процессов в липидных мембранах связанно с усреднением по большим ансамблям частиц и временам порядка секунд [33]. В рамках же метода МД доступны времена порядка 10 нс, а количество наблюдаемых частиц измеряется сотнями или тысячами. Поэтому из МД расчетов можно получить лишь оценку коэффициентов диффузии D.

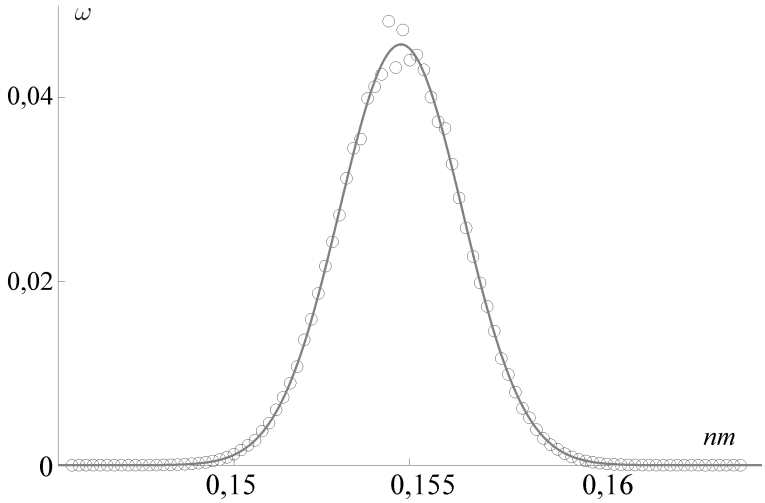

Рис. 3. Распределение длин всех углеводородных С–С связей модельной молекулярной системы. Интегральное среднее значение потенциальной энергии деформации углов, рассчитанное для модели, составляет 0.46 кДж/моль. Это значение хорошо согласуется с энергией, даваемой статистической термодинамикой, $\frac{1}{2}RT = 0.42$ кДж/моль. Сглаженная кривая (–) представляет Гауссову функцию, полученную при регрессионном анализе экспериментальных данных (о)

Допустим, имеется группа молекул липида. В процессе диффузии расстояние между молекулами будет расти: $< R^2 > = 4Dt$, где R — смещение ЦМ молекулы, а t — время. Множитель 4 связан с двухмерностью диффузионного пространства. Рассмотрим дисперсию распределения группы молекул липида по расстоянию до общего центра масс, $\sigma^2 = \frac{1}{n}\sum R_i^2$, где n — число час-

тиц, а R_i — расстояние ЦМ липида до общего центра масс. В данном случае двухмерность пространства учтена при усреднении по ансамблю частиц, следовательно, дисперсия $\sigma = Dt$, а тангенс угла наклона на графике (σ^2, t) является D. Так как исследуемая модельная система содержит только 48 молекул липида, то для эффективного увеличения исследуемого ансамбля частиц липиды были случайным образом сгруппированы в несколько (~ 100) групп. После усреднения по всем группам (σ^2, t) хорошо аппроксимируется прямой во всех рассматриваемых диапазонах времен (рис. 4), что позволяет оценить D.

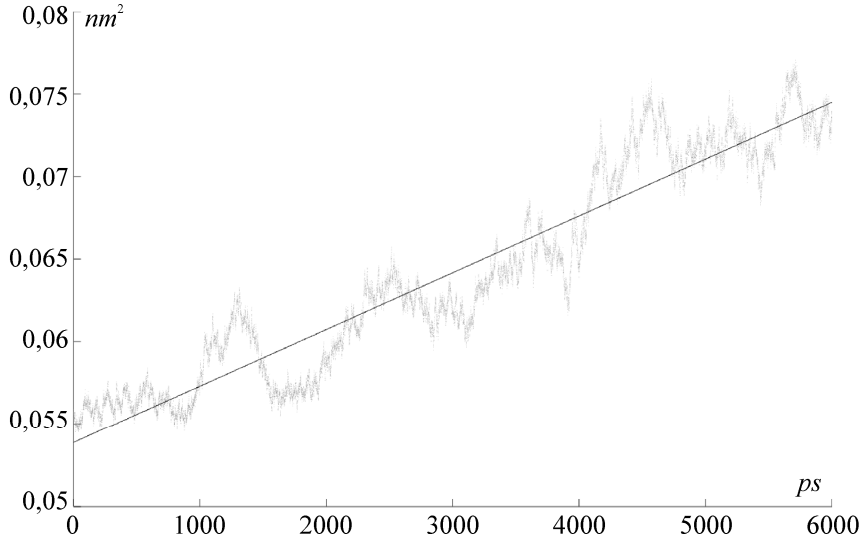

Рис. 4. Зависимость дисперсии центров масс группы молекул ДСФХ от времени. Каждая точка получена усреднением по $\sim 10^2$ измерений. Тангенс угла наклона прямой соответствует коэффициенту латеральной диффузии липидов $D = 1.46 \cdot 10^{-8}$ см^2/с

Вращательная диффузия. Можно считать, что вращение молекул липида происходит только вокруг длинной оси молекулы, так как вращение вокруг двух других осей сопряжено с нарушением бислойной структуры и крайне затруднено [18, 36]. Мы вели наблюдение за вращением вектора, связывающего ЦМ ацильных хвостов молекулы липида. Для описания интенсивности вращательного движения в эксперименте используют время вращательной корреляции (τ), отражающее характерное время, необходимое молекуле или ее части для поворота на угол $\frac{\pi}{2}$ [19, 33]. Мы разработали метод оценки этого параметра.

Рассмотрим распределение молекул липида по углу поворота относительно начального положения. В начальный момент времени углы поворота молекул равны нулю, распределение представляет δ-функцию. С течением времени молекулы поворачиваются и распределение молекул по углу поворота уширяется. По мере размывания распределения границы доверительного интервала для среднего значения угла будут расти (рис. 5). Момент времени, к которому границы доверительного интервала ($\alpha = 50$ %) для среднего угла поворота достигают $\pm\frac{\pi}{4}$, мы использовали в качестве оценки τ, так как это время, за которое, в среднем, одна половина молекул повернется относительно другой половины на угол $\frac{\pi}{2}$. Для увеличения выборки и получения более репрезентативных результатов были использованы различные группы молекул липидов (~ 100) с различными стартовыми точками.

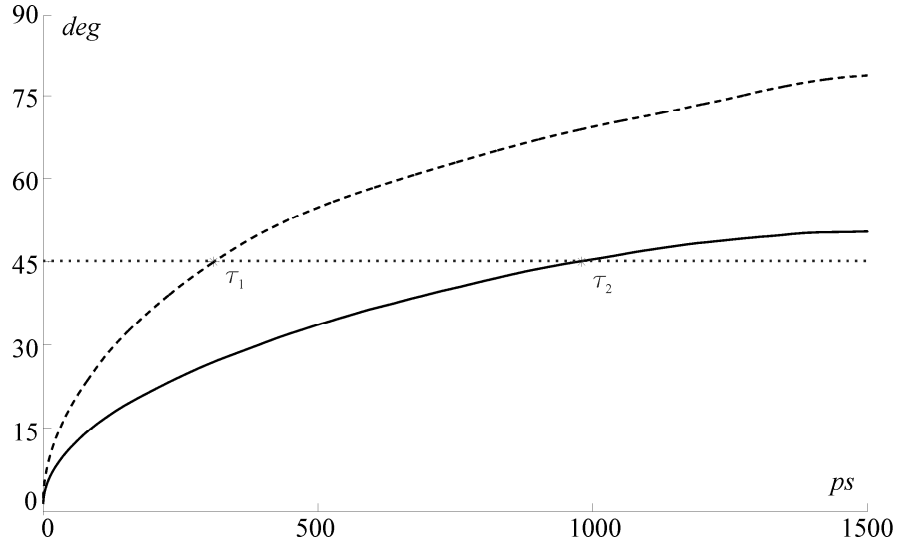

Рис. 5. Временная зависимость положения границ симметричного доверительного интервала $(\alpha = 50\ \%)$ для математического ожидания распределения молекул ДСФХ по углу поворота относительно начального положения. Графики построены для полярных головок (- -) и ацильных хвостов молекул ДСФХ (–). Горизонтальная прямая $(\cdots)$ соответствует пороговому значению $\frac{\pi}{4}$, точки пересечения графиков и прямой соответствуют временам вращательной корреляции, составляющим $\tau_1 = 311$ пс и $\tau_2 = 974$ пс для полярных головок и ацильных хвостов соответственно

2.3. Оценка проницаемости бислоя

Исследование проницаемости липидных мембран методом МД существенно осложняется тем, что максимальные доступные для расчетов времена не превышают десятков наносекунд, в то время как характерные времена проникновения частиц через мембраны существенно больше. Таким образом, в МД расчетах невозможно наблюдать проникновение малой молекулы через бислой, обусловленное исключительно случайными молекулярными флуктуациями. Необходимо искусственно ускорить этот процесс. Для этого мы использовали внешнее силовое поле, которое в процессе МД расчетов складывалось с результирующей силой, действующей на наблюдаемую частицу со стороны окружения. Такое силовое поле увеличивало вероятность проникновения малой молекулы через мембрану. Величина приложенного поля варьировалась в широких пределах, что необходимо для исключения возмущения, вносимого силовым воздействием в оценку коэффициента диффузии. Так, в численных экспериментах с молекулой воды величина приложенного поля составляла от 2 до 32 нм/пс^2, для молекулы кислорода — в пределах 2–16 нм/пс^2, для иона натрия — в пределах 64–256 нм/пс^2. Столь большие значения поля связанны с необходимостью «протащить» исследуемую частицу через бислой за наносекундные времена. В среднем время проникновения исследуемой частицы через бислой составляло 500–1 000 пс.

Для исследования проницаемости бислоя, в котором присутствует гидрофобная неинвертированная пора, мы модифицировали исходную систему. Из каждого монослоя была удалена одна молекула липида, причем таким образом, чтобы образовалась сквозная пора (рис. 6). Затем образовавшаяся полость была заполнена водой. После короткого (100 пс) релаксационного расчета центры масс липидов, образующих стенки полученной поры, были зафиксированы. Это позволило предотвратить коллапс поры, сохранив при этом подвижность отдельных атомов и групп в стенках, что необходимо для корректного описания границы липид/вода. В численных экспериментах, лишенных подобных ограничений, пора схлопывалась с характерным временем $\sim 10^{-10}$ сек.

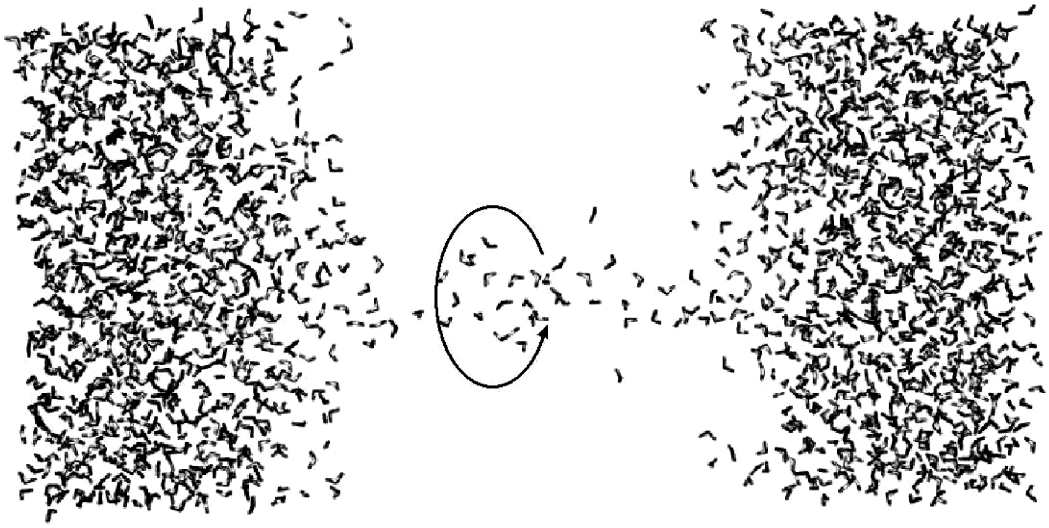

Рис. 6. Общий вид водной фазы в модели липидного бислоя с неинвертированной гидрофобной порой, липиды не показаны. Стрелкой показан столб воды в гидрофобной области бислоя. Координаты липидов, образующих стенки поры, «заморожены» для предотвращения схлопывания поры

Трансмембранные профили подвижности исследуемых частиц вычислялись как $B = v / F$, где B — подвижность частицы, v — дрейфовая скорость движения частицы в соответствующей области, F — сила, действующая на частицу со стороны приложенного поля. Далее из профилей подвижности рассчитывались профили коэффициентов диффузии: $D = kTB$, на основании которых вычислялись усредненные трансмембранные коэффициенты диффузии и потоки соответствующих частиц.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Моделирование структуры бислоя

Модель жидкокристаллического состояния. Из эксперимента известно, что для ДСФХ мембраны в жидкокристаллическом (ЖК) состоянии характерны следующие геометрические параметры. Средняя площадь, приходящаяся на молекулу липида, составляет ~ 52 Å^2 [19, 33]. Толщина гидрофобной части бислоя ~ 32 Å. Также известно, что ацильные хвосты молекул липида не упорядочены [15, 33]. Коэффициент латеральной диффузии липидов в ЖК фазе составляет $\sim 10^{-8}$ см^2/с, а τ имеет среднюю величину 100–1000 пс [19, 33].

Для нашей модели жидкокристаллического состояния характерны следующие равновесные параметры. Средняя площадь, приходящаяся на молекулу ДСФХ, составила 48.7 Å^2. Среднее по нормали расстояние между атомами фосфора в противоположных монослоях составило 35.3 Å. Ацильные хвосты молекул липидов разупорядоченны. Коэффициент латеральной диффузии равняется $(1.46 \pm 0.22)10^{-8}$ см^2/с. Время вращательной корреляции составило 974 ± 238 пс. Равновесные параметры модельной системы удовлетворительно согласуются с данными реального эксперимента (табл. 1). Это свидетельствует о том, что модель достаточно корректна для исследований процессов, протекающих в липидных мембранах. В частности, полученная модель может быть использована для исследований подвижности молекул липидов, а также их взаимодействия друг с другом.

Таблица 1

Геометрические и динамические характеристики ДСФХ мембраны
в гелевом и жидкокристаллическом состоянии

Состояние	жидкокристаллическое		гелевое	
	модель	эксперимент	модель	эксперимент
S(Å^2)	48.7	52	34.1	~ 40
L (Å)	35.3	32	53	~ 50
α (град)	–	–	10	12
D (см^2/с)	$1.46 \cdot 10^{-8}$	$\sim 10^{-8}$	$\sim 10^{-9}$	$\sim 10^{-12}$
τ (с)	$\sim 10^{-10}$	$\sim 10^{-10}$	$\sim 10^{-9}$	$\sim 10^{-6}$

В табл. 1 представлены величины, рассчитанные для модели, и экспериментальные данные. S — средняя площадь, приходящаяся на липидную молекулу; L — толщина гидрофобной области бислоя; α — угол наклона ацильных цепей в гелевом состоянии; D — коэффициент латеральной диффузии; τ — время вращательной корреляции.

Модель гелевого состояния. Экспериментально показано, что для фосфатидилхолинов в гелевом состоянии средняя площадь, приходящаяся на липид, составляет $\sim 40-45$ Å^2 [17, 28, 33]. Толщина гидрофобной части ДСФХ бислоя в гелевой фазе в литературе не обнаружена, но ее можно оценить, опираясь на параметры других фосфатидилхолинов. Толщина гидрофобной части бислоя из димеристоилфосфатидилхолина в гелевой фазе составляет ~ 30 Å [28]. Для дипальмитоилфосфатидилхолина этот параметр ~ 40 Å [17]. Что позволяет оценить толщину гидрофобной области ДСФХ как ~ 50 Å [5, 15]. Также известно, что гидрофобные участки молекул фосфатидилхолинов в гелевой фазе наклонены относительно нормали к бислою на угол $\sim 12^{\circ}$ [17, 28, 33].

Для создания модели гелевой фазы необходимо расположить остатки жирных кислот строго определенным способом. Причем экспериментально известны лишь общие принципы расположения ДСФХ в гелевой фазе [17, 28], в то время как точные параметры упаковки липидов неизвестны. В таком положении физически наиболее разумным способом создания модели гелевого состояния было бы аккуратно заморозить модельную ЖК мембрану. Но в рамках метода МД это невозможно из-за большой ($\sim$ мс) длительности фазового перехода [19, 33]. Из литературы известно, что при увеличении давления существенно повышаются температура плавления липидных мембран [21, 23], соответственно увеличивается и скорость протекания фазового перехода, чем мы и воспользовались. Для ускорения перехода в гелевое состояние давление в модельной системе было ступенчато увеличено до 10^5 бар, с промежуточной релаксацией системы при повышенном давлении. Затем температура была поднята до 600 К и проведен 10 нс расчет, при тангенциальном давлении 10^5 бар, нормальное к бислою давление при этом равнялось атмосферному. По окончании расчета температура была уменьшена до 300 К, а тангенциальное давление ступенчато приведено в норму.

После нормализации давления модельная липидная мембрана приобрела следующие геометрические параметры: 1. Ацильные хвосты вытянуты и плотно упакованы. 2. Средняя площадь, приходящаяся на молекулу липида, 34.1 Å^2. 3. Среднее по нормали к бислою расстояние между атомами фосфора в разных монослоях составило 53 Å. 4. Наклон ацильных цепей относительно нормали к бислою составил $\sim 10^{\circ}$. Такие значения характерны для реальных ДСФХ мембран в гелевом состоянии (табл. 1).

Коэффициент латеральной диффузии, расчитанный для модели гелевого состояния, составил $D \sim 10^{-9}$ см^2/с, а время вращательной корреляции $\tau \sim 10^{-9}$ с. Полученные оценки парамет-

ров подвижности существенно больше, чем следует из эксперимента, что свидетельствует об отличии модели от равновесного гелевого состояния ДСФХ бислоя (табл. 1). В ходе расчетов МД мы обнаружили, что при температуре 300 К, которая ниже температуры фазового перехода в реальных ДСФХ мембранах ($53\,^{\circ}C$ [26]), с течением времени все параметры модельной системы стремятся к значениям, характерным для ЖК фазы. Это может означать, что в ходе подготовки модели гелевого состояния молекулярная система не претерпела фазовый переход полностью и в структуре бислоя сохранились дефекты. Наличие дефектов может быть причиной неустойчивости модели, так как она очень мала (48 молекул ДСФХ), то есть по сути является лишь зародышем гелевой фазы и чувствительна к любым малым тепловым флуктуациям. Другая причина неустойчивости модели гелевого состояния заключается в особенностях метода МД. В процессе численного интегрирования уравнений движения возникают ошибки. Накапливаясь, эти ошибки приводят к постепенному разогреву модельной системы. Для компенсации этого негативного эффекта используется алгоритм отвода излишков энергии (термостат) [7, 11]. Возможно, переход модельной системы из гелеподобного в ЖК состояние связан с тем, что лишняя энергия не только отводится термостатом, но и расходуется на плавление мембраны.

3.2. Моделирование проницаемости бислоя

Для проверки работоспособности численного метода оценки коэффициентов диффузии через подвижность были проведены расчеты молекулярной динамики, в которых исследуемые частицы двигались в чистой воде под действием внешней силы. Полученные коэффициенты диффузии представлены в табл. 2. Из этой таблицы видно, что полученные из МД расчетов оценки коэффициентов диффузии по порядку величины согласуются с экспериментальными значениями [31, 37, 38] для объемной водной фазы. Таким образом, предлагаемый способ оценки коэффициентов диффузии может быть использован в рамках метода МД.

Таблица 2

Коэффициенты диффузии (см^2/сек) молекул воды и кислорода, и иона натрия в воде и липидном бислое

Коэффициены диффузии	Молекула кислорода	Молекула воды	Ион натрия
в воде (рассчетный)	$3.38 \pm 1.02 \cdot 10^{-5}$	$2.10 \pm 0.71 \cdot 10^{-5}$	$6.33 \pm 2.37 \cdot 10^{-5}$
в воде (истинный)*	$1.8 - 2.6 \cdot 10^{-5}$	$2.27 \cdot 10^{-5}$	$1 - 2 \cdot 10^{-5}$
трансмембранный	$3.09 \pm 1.75 \cdot 10^{-6}$	$3.79 \pm 3.72 \cdot 10^{-7}$	$2.61 \pm 4.00 \cdot 10^{-9}$
в гидрофобной поре	$3.31 \pm 2.42 \cdot 10^{-5}$	$3.14 \pm 2.14 \cdot 10^{-5}$	$5.74 \pm 1.68 \cdot 10^{-5}$

В табл. 2 коэффициенты диффузии рассчитаны как $D = kTB$, где B — измеренная в МД подвижность.

Для исследования подвижности молекул воды, кислорода и иона натрия в бислое была проведена серия МД расчетов, в которых исследуемая частица под действием внешнего силового поля проникала через бислой в направлении перпендикулярном к его поверхности. Проведенные расчеты показали, что внутри бислоя подвижность исследуемых частиц существенно снижается (табл. 2). Усредненный трансмембранный коэффициент диффузии для молекулы воды на два порядка ниже, чем коэффициент самодиффузии воды. Для молекулы кислорода в мембране происходит снижение коэффициента диффузии на порядок. Для иона натрия падение коэффициента диффузии в бислое достигает четырех порядков величины, что делает мембраны практически непроницаемыми для заряженных ионов. Таким образом, проведенные расчеты показали (табл. 2), что липидный бислой оказывает существенное диффузиионное сопротивление не только заряженным ионам, но и неполярным молекулам, таким как молекула кислорода.

* Экспериментально измеренные коэффициенты диффузии [31, 37, 38].

Вычислим коэффициент проницаемости липидного бислоя для кислорода с учетом коэффициента диффузии, полученного из МД: $L_{oxygen} = \frac{\gamma D}{l} = 12$ см/сек, где $\gamma = 4$ — коэффициент распределения кислорода [8, 22], l — толщина мембраны, принятая равной 10 нм. Полученное значение почти на порядок ниже проницаемости слоя воды аналогичной толщины [31], что косвенно подтверждает данные, полученные в работах [13, 34]. Вместе с тем, значение L_{oxygen} также несколько ниже экспериментально измеренного значения коэффициента проницаемости плазматической мембраны клетки млекопитающего для кислорода, равного 42 см/сек [32]. Из табл. 2 видно, что значение коэффициента диффузии кислорода в толще липидного бислоя также занижено, по сравнению с экспериментальным результатом, полученным для плазмалеммы эритроцита — $7.3 \cdot 10^{-6}$ см^2/сек [27], что соответствует коэффициенту проницаемости 29 см/сек. Наблюдаемое отклонение может быть связанно с существенной неидеальностью реальных плазматических мембран, обладающих дефектами и неоднородностями. Такое несоответствие, возможно, указывает на существование механизмов, облегчающих диффузию кислорода через реальные клеточные мембраны, в частности на существование аквапоринов [9].

В классических экспериментах с аксонами гигантского кальмара были измерены потоки ионов через плазматическую мембрану [12], в частности паразитный поток натрия в покое, для которого было получено значение $J_{Na} = 2.86 \cdot 10^{-7}$ моль/м$^2 \cdot$сек. В этих экспериментах разность концентраций ионов натрия по разные стороны мембраны составляла ~ 430 мМ, а средняя разность потенциалов –60 мВ. Подставив приведенные параметры в уравнение Нэрнста–Планка, в приближении постоянного поля, получим следующее выражение:

$$J = \gamma \Delta\phi \cdot \frac{FD}{RTl} \cdot \frac{C(Na)_{out} - C(Na)_{in} \exp(F\phi / RT)}{1 - \exp(F\phi / RT)},$$

где γ — коэффициент распределения иона натрия, равный $6.8 \cdot 10^{-7}$ [10], D — рассчитанный нами коэффициент диффузии иона натрия $\sim 2.6 \cdot 10^{-9}$ см^2/сек, l — толщина мембраны (10 нм). Расчет дает $J = 2.40 \cdot 10^{-8}$ моль/м$^2 \cdot$сек, что на порядок меньше экспериментального значения. Полученная таким образом оценка потока является оценкой снизу, так как модельная система представляет собой идеализированный фрагмент мембраны, в то время как плазмалемма реального аксона имеет дефекты. Кроме того, на свойства нативных мембран существенное влияние оказывают белки, отсутствующие в рассматриваемой модели.

Для трансмембранного коэффициента диффузии воды расчеты дают значение $3.8 \cdot 10^{-7}$ см^2/сек (табл. 2). Оценим поток воды в эритроцит при осмотическом лизисе. Величина объемного потока воды в клетку прямо пропорциональна градиенту осмотического давления, что эквивалентно градиенту концентраций осмотически активных веществ. $J_v = L_w \cdot V_{mol} \cdot S \cdot (C_i - C_o)$, где V_{mol} — молярный объем воды, L_w — коэффициент проницаемости для воды, S — площадь эритроцита, равная 140 мкм^2, C — суммарная концентрация всех растворенных веществ внутри и снаружи клетки соответственно [20]. Оценить разность концентраций веществ между плазмой нормальной крови и дистиллированной водой можно, исходя из разности их осмотических давлений: $\Delta\pi = RT\Delta C = 7.6$ атм. Таким образом, средняя концентрация осмотически активных веществ внутри клетки $C_i \sim 295$ мМ, тогда в среднем нормальный эритроцит содержит $N_i = C_i \cdot V_o = 2.5 \cdot 10^{-14}$ моль веществ, $V_o = 85$ мкм^3 — объем нормального эритроцита. Таким образом,

$$\frac{dV}{dt} = L_w \cdot V_{mol} \cdot S \cdot \frac{N_i}{V},$$

откуда для среднего времени осмотического гемолиза получается выражение:

$$t_{lysis} = \frac{l}{2D\gamma_{(H_2O)}V_{mol}} \cdot \frac{(V^2 - V_0^2)}{SN_i},$$

где $\gamma_{(H_2O)}$ — коэффициент распределения воды, D — трансмембранный коэффициент диффузии воды, l — толщина бислоя. Растворимость воды в органических жидкостях составляет ~ 90 мг/100 мл [35], следовательно, коэффициент распределения воды $\gamma_{(H_2O)} = 9.1 \cdot 10^{-4}$.

Объем разбухшего, но еще не лопнувшего эритроцита составляет $V_1 = \frac{4}{3}\pi\left(\sqrt{\frac{S}{4\pi}}\right)^3 = 155$ мкм^3.

Иходя из рассчитанного нами коэффициента диффузии воды, для достижения такого объема эритроциту, помещенному в дистиллят, необходимо ~ 40 секунд. Известно, что среднее время разбухания эритроцита в дистиллированной воде составляет 6.5 секунд [4]. Завышенное значение времени осмотического набухания связанно с неидеальностью реальных мембран эритроцитов, как и в случае потока ионов натрия. Кроме того, это несоответствие косвенно свидетельствует о наличии в мембранах эритроцитов механизмов, облегчающих транспорт воды, в частности аквапоринов [9]. В альтернативных экспериментах было показано, что коэффициент проницаемости мембран теней эритроцитов для воды ($\sim 10^{-2}$ см/сек) существенно выше, чем коэффициент проницаемости фосфатидилхолиновых везикул ($\sim 5 \cdot 10^{-4}$ см/сек) [24]. Последнее значение хорошо согласуется со значением коэффициента проницаемости, полученным в наших расчетах, — $3.2 \cdot 10^{-4}$ см/сек. Это подтверждает, что построенная модель фрагмента бислойной липидной мембраны корректно описывает процессы, происходящие в реальных мембранах, и может быть использована для получения оценок макроскопических параметров. В частности, модель может быть использована для оценки проницаемости особых областей мембраны, таких как гидрофобные поры (табл. 2). Кроме того, из вышеприведенных расчетов видно, что построенная молекулярная модель может быть использована для уточнения значений коэффициентов распределения исследуемых частиц.

Заключение

Сравнение оценок параметров модельной бислойной мембраны с экспериментально измеренными величинами (табл. 1) показывает, что модельная система в ЖК состоянии хорошо описывает реальную ДСФХ мембрану. В созданной модели хорошо воспроизводится геометрическая структура бислойной мембраны и упаковка липидов. Кроме того, в модели получены реалистичные оценки коэффициента латеральной диффузии и времен вращательной релаксации молекул ДСФХ.

Была создана модель гелевого состояния бислоя, по своим геометрическим характеристикам соответствующая реальной мембране. Однако подвижность молекул липида в модели гелевого состояния оказалась существенно выше, чем в реальных мембранах. Кроме того, с течением времени геометрические параметры модели гелевого состояния со временем релаксировали к значениям, характерным для ЖК фазы. Мы предполагаем, что наблюдающаяся неустойчивость модели связанна с недостаточными размерами систем, доступных для МД расчета. Размеры созданной нами модели соответствуют зародышу гелевой фазы, следовательно, она чувствительна к любым случайным флуктуациям. Кроме того, неустойчивость модели гелевого состояния связанна с численными ошибками дискретной процедуры интегрирования уравнений движения и функционированием процедуры термостатирования. Мы предполагаем, что накапливающаяся вследствие ошибок интегрирования энергия не полностью отбирается термостатом, а частично расходуется на плавление неустойчивого зародыша гелевой фазы.

Хорошее соответствие между моделью ЖК фазы и реальными мембранами позволило использовать эту модель для исследования проницаемости липидных мембран. Создан инструмент, позволяющий изучать динамическое поведение отдельных молекул ДСФХ с пикосекундным временным разрешением, что недоступно прямому эксперименту. Кроме того, для конструирования гелевой фазы был создан физически адекватный метод, позволивший наблюдать перестройку геометрической структуры бислойной мембраны из ЖК в гелевое состояние, что позволит в дальнейшем моделировать фазовые переходы в липидных мембранах.

С использованием модели жидкокристаллического состояния были разработаны методы оценки параметров подвижности малых молекул и ионов, а также методы оценки проницаемости бислойных мембран на основе молекулярного моделирования. Полученные в модельных экспериментах значения коэффициентов диффузии и подвижностей как в объемной водной фазе, так и в толще липидного бислоя хорошо согласуются с данными реальных экспериментов (табл. 2). Значения коэффициентов проницаемости липидных мембран для кислорода и воды также согласуются с экспериментальными значениями. Даны корректные оценки потоков различных малых молекул и ионов через липидные мембраны в физиологически адекватных условиях. Показано, что диффузионное сопротивление чисто липидного бислоя существенно выше сопротивления слоя воды аналогичной толщины. Анализ трансмембранных потоков исследованных частиц показал, что численные эксперименты позволяют оценивать коэффициенты распределения веществ в системе липидный бислой — вода. Таким образом, несмотря на технические ограничения по времени вычислений и размеру исследуемых систем, эксперименты *in silico* способны давать адекватные оценки макроскопических величин. Как было отмечено выше, необходимым условием работоспособности расчетных методик является построение адекватной молекулярной модели исследуемой системы.

Список литературы

1. *Ligeza A., Tikhonov A. N., Hyde J. S., Subczynski W. K.* 1998. Oxygen Permeability of Thylakoid. Membranes: Electron Paramagnetic Resonance Spin Labeling Study. Biochim. Biophys. Acta., 1365, 453–463.
2. *Smondyrev A. M., Berkowitz M. L.* 2000. Molecular dynamics simulation of dipalmitoylphosphatidylcholine membrane with cholesterol sulfate. Biophys. J., 78, 1672–1680.
3. *Nemukhin A. V., Grigorenko B. L., Granovsky A. A.* 2004. Molecular modeling by using the PC GAMESS program: From diatomic molecules to enzymes. Moscow University Chemistry Bulletin, 45(2), 75.
4. *Jay A. W. L., Rowlands S.* 1975. The stages of osmotic haemolysis. J. Physiol., 252, 817–832.
5. *Lewis B. A., Engelman D. M.* 1983. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. J. Mol. Biol., 166(2), 211–217.
6. *Van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., et. all.* GROMACS user manual. Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, the Netherlands. 1991–2000.
7. *Lindahl E., Hess B., van der Spoel D.* 2001. GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. J. Mol. Mod., 7, 306–317.
8. *Smotkin E. S., Moy F. T., Plachy W. Z.* 1961. Dioxygen solubility in aqueous phosphatidylcholine dispersions. Biochimica et Biophysica Acta, 1061, 33–38.
9. *Preston G. M., Carroll T. P., Guggino W. B., Agre P.* 1992. Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science, 256, 385–387.
10. *Davson H. & Danielli J. F.* 1952. The Permeability of Natural Membranes. Cambridge: Cambridge University Press.

11. *Berendsen H. J. C., van der Spoel D., van Drunen R.* 1995. A message-passing parallel molecular dynamics implementation. Comp. Phys. Comm., 91, 43–56.
12. *Atwater I., Bezanilla F., Rojas J.* 1969. Sodium influxes in internally perfused squid giant axon during voltage clamp. J. Physiol., 201, 657–664.
13. *Ivanov I. I., Fedorov G. E., Gus'kova R. A., Ivanov K. I., Rubin A. B.* 2004. Permeability of lipid membranes to dioxygen. Biochem. and Biophys. Res. Communs., 322, 746–750.
14. *Strutwolf J., Zhang J., Barker A. L., Unwin P. R.* 2001. Effect of Phospholipids on the Kinetics of Dioxygen Transfer Across a 1,2-Dichloroethane/Water Interface. Phys. Chem and Chem. Phys., 3, 5553–5558.
15. *Ipsen J. H., Mouritsen O. G., Bloom M.* 1957. Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. The effects of cholesterol. Biophys. J., 90, 405–412.
16. *Pitman M. C., Grossfield A., Suits F., Feller S. E.* 2005. Role of cholesterol and polyunsaturated chains in lipid-protein interactions: Molecular dynamics simulation of rhodopsin in a realistic membrane environment. J. Am. Chem. Soc., 127, 4576–4577.
17. *Wiener M. C., Suter R. M., Nagle J. F.* 1989. Structure of the fully hydrated gel phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. Biophys. J., 55(2), 315–325.
18. *Miller I. R.* 1984. Energetics of fluctuation in Lipid Bilayer Thickness. Biophys. J., 45, 643–644.
19. *Mouritsen, Ole G.* 2005. LIFE — AS A MATTER OF FAT. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
20. *Kedem O., Katchalsky A.* 1958. Thermodynamics analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. Biochim. Biophys. Acta., 27, 229–246.
21. *Yager P., Peticolas W. L.* 1980. Statistical mechanical parameters of Raman spectroscopic order parameter changes in pressure-induced lipid bilayer phase transitions. Biophys. J., 31, 359–370.
22. *Battino R., Evans F., Danforth W.* 1968. The solubilities of seven gases in olive oil with reference to theories of transport through the cell membrane. J. Am. Oil Chem. Soc., 45, 830–833.
23. *Benz R., Conti F.* 1986. Effects of hydrostatic pressure on lipid bilayer membranes. Biophys. J., 50, 91–98.
24. *Ye R., Verkman A. S.* 1989. Osmotic and diffusional water permeability measured simultaneously in cells and liposomes. Biochemistry, 28, 824–829.
25. *Gus'kova R. A., Fedorov G. E., Belevich N. P., Akhobadze V. V., Ivanov I. I.* 2000. Effect of lipid monolayers on diffusion of oxygen through the air/water interface. Biophysics, 45, 654–659.
26. *Ali S., Minchey S., Janoff A., Mayhew E.* 2000. A differential scanning calorimetry study of phosphocholines mixed with paclitaxel and its bromoacylated taxanes. Biophys. J., 78(1), 246–256.
27. *Fischkoff S., Vanderkooi J. M.* 1975. Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene. J. Gen. Physsiol., 65, 663–676.
28. *Tristram-Nagle S., Liu Y., Legleiter J., Nagle J. F.* 2002. Structure of Gel Phase DMPC Determined by X-Ray Diffraction. Biophys. J., 83, 3324–3335.
29. *Singer S. J., Nicolson G. L.* 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 175(23), 720–731.
30. *Stern O.* 1924. Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht. Z. Elektrochem., 30, 508–516.
31. *Subczynski W. K., Hyde J. S.* 1984. Diffusion of oxygen in water and hydrocarbons using an electron spin resonance spin label technique. Biophys. J., 45, 743–748.
32. *Subczynski W. K., Hopwood L. E., Hyde J. S.* 1992. Is the mammalian cell plasma membrane a barrier to oxygen transport? J. Gen. Physiol., 100, 69–87.

33. *Генис Р. Б.* 1997. Биомембраны. М.: Мир.

34. *Иванов И. И., Локтюшкин А. В., Гуськова Р. А., Васильев Н. С., Федоров Г. Е., Рубин А. Б.* 1998. Кислородные каналы мембраны эритроцита. Доклады Академии наук, 414(5), 1–4.

35. *Хабибуллина Л. Р., Ибрагимов Р. Г., Коваль А. В., Тутубалина В. П.* Исследование факторов, влияющих на растворимость воды в масле. Энергосбережение в городском хозяйстве, энергетике промышленности. Материалы Четвертой Российской научно-технической конференции. Ульяновск.

36. *Намиот В. А.* 1986. Дальние взаимодействия и движения макромолекул гидродинамического типа в мембране и жидкости. Биофизика, XXXI(3), 449–452.

37. *Влаев Л. Т., Гениева С. Д.* 2004. Электротранспортные свойства ионов в растворах селенита натрия. Структурная химия, 45(5), 870–876.

38. *Шапошник В. А.* 2003. Кинетическая теория водных растворов электролитов. Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2, 81–85.