

УДК 541(183.12+49+64):536.7

АДСОРБЦИЯ ПОЛИКАТИОНА НА ПОВЕРХНОСТИ ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ЛИПОСОМ. ВЛИЯНИЕ ФАЗОВОГО СОСТОЯНИЯ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ НА СТРОЕНИЕ КОМПЛЕКСА ПОЛИКАТИОН-ЛИПОСОМА¹

© 1994 г. А. А. Ярославов, А. А. Ефимова, В. Е. Кульков, В. А. Кабанов

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

119899 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 16.07.93 г.

Изучены состав и строение полиэлектролит-коллоидных комплексов, образующихся при адсорбции синтетического поликатиона – поли-N-этил-4-винилпиридинийбромида на поверхности бислойных липидных везикул (липосом), мембрана которых построена из смеси дипальмитоилфосфатидилхолина : кардиолипин (дифосфатидилглицерин) = 9 : 1. Показано, что в исходных липосомах отрицательно заряженный кардиолипин распределен равномерно между внутренней и внешней сторонами мембранны. Ниже температуры фазового перехода липидного бислоя только молекулы кардиолипина, расположенные на внешней стороне мембранны, участвуют в образовании комплекса. Этот процесс необратим, по-видимому, из-за частичного слияния липосом, индуцированного поликатионом. Выше температуры фазового перехода в образовании комплекса принимают участие молекулы кардиолипина, расположенные на обеих сторонах мембранны. Поскольку целостность липосом при этом сохраняется и адсорбция поликатиона оказывается полностью обратимой, сделан вывод о том, что адсорбированный поликатион индуцирует в жидкокристаллической мемbrane переход молекул кардиолипина с внутренней стороны липидного бислоя на внешний.

ВВЕДЕНИЕ

Адсорбция полимеров на различных поверхностях изучается уже давно [1 - 3]. Однако в большинстве работ речь идет об адсорбции полимеров на поверхностях фиксированного строения – неорганических кристаллах, угле, кремнеземе, латексах и т.д. Широкое использование полимеров в биологии и медицине [4 - 9] требует понимания закономерностей адсорбции полимеров на объектах другого рода – клетках. Поверхность клетки принципиально отличается от поверхности перечисленных адсорбентов. Ее основу составляет бислойная липидная мембрана, в которой липидные молекулы обладают высокой подвижностью. Такая поверхность оказывается фиксированной лишь частично: компоненты мембранны способны передвигаться в пределах каждого монослоя и переходить из одного монослоя в другой [10]. Очевидно, что адсорбция полимеров на такой поверхности должна происходить иначе. Удобной моделью клеточной мембранны являются липидные везикулы (липосомы) – сферические частицы, поверхность которых представляет собой бислойную липидную мембрану.

До настоящего времени взаимодействие липосом с полимерами исследовали в основном в связи

с проблемой слияния мембран. Показано, что различные полимеры – полиэтиленгликоль [11, 12], полисахариды [13], синтетические полипептиды [14, 15], полиэтиленимин [16], поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид [17] вызывают агрегацию и (или) слияние липосом. Однако подробные сведения о составе и строении образующихся полимер-липосомных комплексов в этих работах не приводятся. Настоящее исследование предпринято с целью получения именно такой информации на примере взаимодействия синтетического поликатиона – поли-N-этил-4-винилпиридиний бромида (ПЭВП) с липосомами, мембрана которых построена из смеси липидов: нейтрального дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и отрицательно заряженного дифосфатидилглицерина – кардиолипина (КЛ). Изменением температуры задавали различное фазовое состояние липидного бислоя: он мог быть твердым (состояние “геля”) или жидкокристаллическим. Это позволяло проследить за тем, как фазовое состояние бислоя оказывается на составе и структуре образующихся поликатион-липидных комплексов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез поли-4-винилпиридинина и его кватернизацию бромистым этилом (получение поли-N-этил-4-винилпиридиний бромида) проводили как

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 93-03-5940).

описано ранее в работе [18]. Доля кватернизованных звеньев α , определенная методом ИК-спектроскопии [19], составила 0.9. В работе использовали фракцию полимера со степенью полимеризации 1100. Полиакриловую кислоту (ПАК) со степенью полимеризации 70 (фирма "Aldrich", США); ДПФХ, КЛ и флуоресценцеинизо-тиоцианил-дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ФИТЦ-ДПФЭ; фирма "Sigma", США), а также 5(6)-карбоксифлуоресцеин (КФ; фирма "Serva", Германия) использовали без дополнительной очистки.

Для приготовления липосом из ДПФХ и КЛ смешивали соответствующие количества метанольных растворов липидов, тщательно удаляли растворитель под вакуумом, образующуюся тонкую пленку липидов диспергировали в 2 мл боратного буфера. На препарат воздействовали ультразвуком частоты 22 кГц в течение 400 с (2×200 с) при 55°C. Использовали генератор ультразвука 4710 (фирма "Cole-Parmer Instrument", США). Полученные липосомы отделяли от титановой пыли на центрифуге в течение 5 мин при 12 об/мин и использовали в течение 1 сут. Размер получаемых липосом 40 - 60 нм. Липосомы со встроенной в бислой флуоресцентной меткой получали добавлением к смеси растворов фосфолипидов 0.2 мг ФИТЦ-ДПФЭ (1% от общего количества липидов). Для получения липосом с заключенным во внутренний объем флуоресцентным красителем использовали раствор КФ 1.0 мг/мл в боратном буфере. После озвучивания и отделения титановой пыли липосомы пропускали через колонку с Сефадексом G-50 для отделения красителя, не включенного во внутренний объем липосом. Концентрация липосом в рабочем растворе составляла 1 мг/мл.

Фазовые переходы в липосомах исследовали методом микрокалориметрии на дифференциальному адиабатном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (Экспериментальное конструкторское бюро РАН, Пущино, Россия). Образцы прогревали со скоростью 1 град/мин в температурном интервале 20 - 55°C. Размер частиц определяли методом квазиупругого рассеяния лазерного света на приборе "Autosizer IIc" (фирма "Malvern", Англия). Данным методом определяли и концентрацию липосом после их пропускания через хроматографическую колонку. При этом часть неразбавленной дисперсии липосом использовали для построения калибровочной зависимости интенсивности рассеяния света от концентрации липосом. Измерение электрофоретической подвижности липосом проводили на приборе "Zetasizer IIc" (фирма "Malvern", Англия) в ячейке PC-4. Для определения флуоресценции растворов использовали спектрофлуориметр F-4000 (фирма "Hitachi", Япония). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре S-3000 (фирма "Hitachi", Япония). Измерение pH растворов и

концентрации бромид-ионов проводили на потенциометре РНМ-83 (фирма "Radiometer", Дания), бромоселективный электрод F1022Br. Эксперименты проводили в боратном буфере, pH 9.18, тетраборат натрия квалификации х. ч., концентрация 10^{-2} моль/л. Все растворы готовили на бидистиллированной воде, пропущенной дополнительно через систему "Milli-Q" (фирма "Millipore", США) с колонкой для глубокой очистки от органических примесей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные микрокалориметрии для смешанной ДПФХ-КЛ мембранны приведены на рис. 1. Как следует из рисунка, мембрана, содержащая 10% молекул КЛ, характеризуется широким фазовым переходом с двумя максимумами при $T_1 = 34.6^\circ\text{C}$ и $T_2 = 38.8^\circ\text{C}$. Эти максимумы, по-видимому, отвечают плавлению двух областей мембраны, содержащих соответственно большее и меньшее количество КЛ. Ниже температуры T_1 бислой находится в твердом состоянии, в котором подвижность липидов резко ограничена. При температуре выше T_2 мембрана становится жидкой, и подвижность липидов в ней значительно возрастает.

Для регистрации взаимодействия ПЭВП с липосомами использован метод микроэлектрофореза. Подход основан на том, что адсорбция поликатиона на поверхности отрицательно заряженных частиц сопровождается нейтрализацией их поверхностного заряда и, следовательно, изменением их электрофоретической подвижности (ЭФП). На рис. 2а приведена зависимость ЭФП твердых ДПФХ-КЛ липосом ($T = 20^\circ\text{C}$) от концентрации ПЭВП (кривая 1). Добавление поликатиона вначале приводит к уменьшению ЭФП липосом до нуля, затем происходит перезарядка поверхности и, наконец, ЭФП достигает своего предельного положительного значения. Параллельные измерения размеров частиц, присутствующих в системе, свидетельствуют о том, что адсорбция ПЭВП на поверхности липосом сопровождается их агрегацией

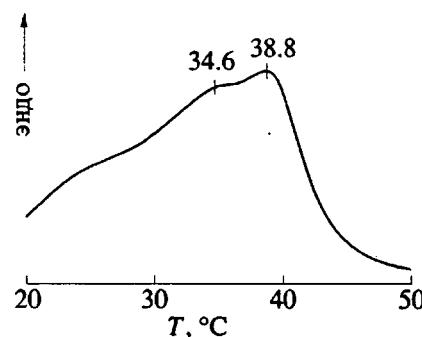


Рис. 1. Калориметрическая кривая фазового перехода ДПФХ-КЛ липосом, содержащих 10% КЛ.

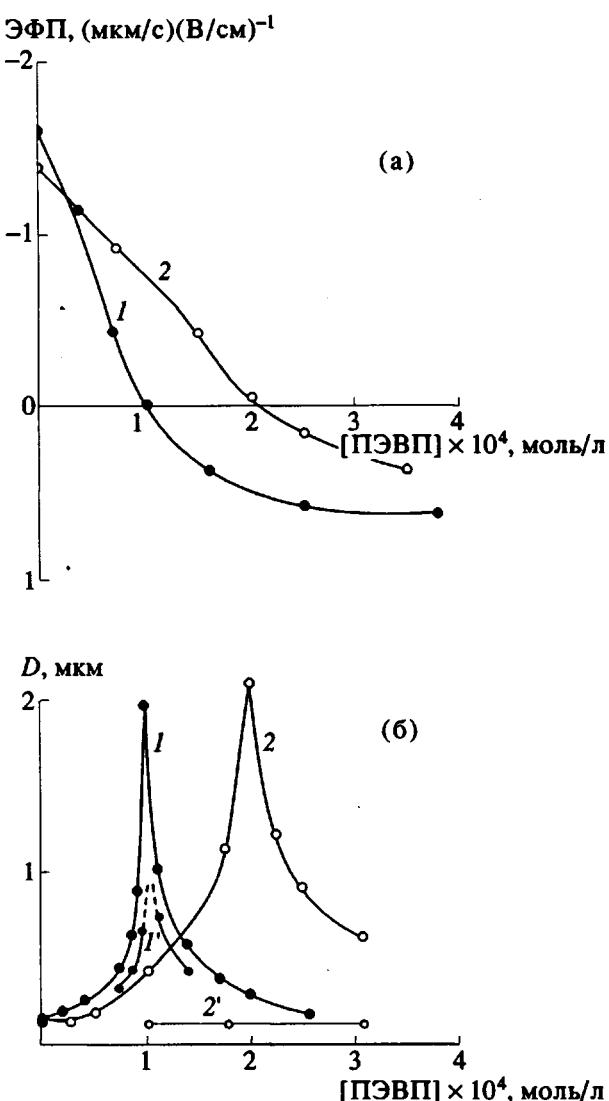


Рис. 2. Зависимость ЭФП частиц от концентрации ПЭВП в системе ПЭВП–липосомы при 20 (1) и 55°C (2) (а) и зависимость среднего гидродинамического диаметра частиц в системе ПЭВП–липосомы от концентрации ПЭВП до и после добавления ПАК при 20 (1 и 1') и 55°C (2 и 2') (б).

(рис. 2б, кривая 1). Агрегаты максимального размера образуются при полной нейтрализации поверхностного заряда липосом, т.е. когда ЭФП частиц становится равной нулю. Дальнейшее увеличение концентрации ПЭВП вызывает уменьшение размера агрегатов до размера исходных липосом. В этой области концентраций ПЭВП стабилизация липосом связана с появлением на их поверхности избыточного положительного заряда, привнесенного адсорбированным ПЭВП.

Чтобы определить, какая доля ПЭВП адсорбируется на липидной мемbrane, был поставлен следующий эксперимент. Агрегаты, сформировавшиеся при добавлении различных количеств

ПЭВП к супензии липосом, отделяли от раствора пропусканием супензии через микропористый фильтр; затем раствор анализировали на содержание поликатиона методом УФ-спектроскопии. Результаты эксперимента приведены на рис. 3. Видно, что добавляемый поликатион полностью связывается с поверхностью липосом, если его общая концентрация в системе не превышает 2.5×10^{-4} моль/л. При больших концентрациях ПЭВП перестает связываться с липосомами и начинает накапливаться в растворе. Сравнение результатов, приведенных на рис. 2а и 3, показывает, что адсорбция поликатиона прекращается, когда ЭФП липосом достигает своего предельного положительного значения. Таким образом, адсорбция ПЭВП на поверхности ДПФХ-КЛ липосом является чрезвычайно сильной: весь вводимый в систему поликатион связывается с липидной мембраной. При этом на границе раздела вода–липидная мембрана образуется полиэлектролит-коллоидный комплекс (ПЭКК), стабилизированный множественными ионными контактами между положительно заряженными звеньями ПЭВП и отрицательно заряженными полярными группами КЛ. Ранее было показано, что взаимодействие полиэлектролитов с противоположно заряженными линейными макромолекулами [20], мицеллами ПАВ [21], коллоидными частицами [22], плоскими поверхностями [23] характеризуется чрезвычайно высоким сродством компонентов друг к другу и приводит к формированию стабильных комплексов. Поведение исследованной нами системы поликатион–липосомы подчиняется тем же закономерностям.

Для определения доли звеньев поликатиона, образующих солевые связи с фосфатными группами КЛ, использовали следующий прием. ПЭВП добавляли к супензии липосом, затем полимерлипосомные агрегаты отделяли центрифугированием и в надосадочной жидкости определяли концентрацию бромид-ионов – низкомолекулярных противоионов ПЭВП $[Br^-]_p$ (рис. 4). В описанном случае липосомы и их комплекс с поликатионом готовили в бессолевом водном растворе. Очевидно, что концентрация $[Br^-]_p$ равна концентрации кватернизованных звеньев поликатиона, образовавших солевые связи с молекулами КЛ, $[PEVP^+]_{компл}$. Соотношение

$$\beta = [PEVP^+]_{компл} / [PEVP^+]_o = [Br^-]_p / [Br^-]_o,$$

где $[PEVP^+]_o = [Br^-]_o$ – общая концентрация кватернизованных звеньев ПЭВП позволяет оценить их долю, участвующую в образовании ПЭКК ПЭВП–липосома. Расчет по данным рис. 4 дает $\beta = 0.85$.

Теперь мы располагаем всеми данными для того, чтобы определить состав ПЭКК, образующегося при адсорбции ПЭВП на твердой липидной мембране. Поскольку добавленный к супензии липосом ПЭВП полностью связывается с липид-

ной мембраной, в точке, соответствующей полной компенсации заряда липосом адсорбированным поликатионом, т.е. при ЭФП = 0, привносимый поликатионом заряд численно равен поверхностному заряду липосомы. Другими словами, концентрация положительно заряженных звеньев адсорбированного поликатиона $[\text{ПЭВП}^+]_{\text{ЭФП}=0}$ равна концентрации отрицательно заряженных молекул КЛ, сосредоточенных во внешнем слое липидной мембраны $[\text{КЛ}]_{\text{внеш.}}$. Доля молекул КЛ, образующих ПЭКК с поликатионом, может быть определена из соотношения

$$\gamma = [\text{КЛ}]_{\text{внеш.}} / [\text{КЛ}]_o = [\text{ПЭВП}^+]_{\text{ЭФП}=0} / [\text{КЛ}]_o,$$

где $[\text{КЛ}]_o$ – общая концентрация КЛ в растворе. Поскольку $[\text{ПЭВП}^+]_{\text{ЭФП}=0} = [\text{ПЭВП}]_{\text{ЭФП}=0} \cdot \alpha \cdot \beta$, где $[\text{ПЭВП}]_{\text{ЭФП}=0}$ – общая концентрация мономерных звеньев ПЭВП в растворе при ЭФП = 0, расчет, проведенный на основании рис. 2а, дает $\gamma = 10^{-4}M \times 0.9 \times 0.85 / 1.5 \times 10^{-4}M = 0.5$.

Из полученного результата следуют два важных вывода. Во-первых, в мемbrane исходных (твердых) липосом отрицательно заряженные молекулы КЛ равномерно распределены между обеими сторонами бислоя. Во-вторых, только те молекулы КЛ, которые расположены на внешней стороне мембраны, участвуют в образовании межфазного ПЭКК с адсорбированным поликатионом.

Выше температуры фазового перехода липиды в мембране приобретают значительную подвижность. Они могут перемещаться вдоль каждого из монослоев, формирующих мембрану (латеральная подвижность), и переходить из одного монослоя в другой (трансмембранный миграция или так называемый флип-флоп). Оба процесса могут влиять на структуру и свойства ПЭКК, образующихся при взаимодействии полионов с жидкими мембранами.

На первый взгляд взаимодействие ПЭВП с жидкими ДПФХ-КЛ липосомами подчиняется тем же закономерностям, что и поведение системы ПЭВП–твердые липосомы. Такое взаимодействие сопровождается нейтрализацией поверхностного заряда липосом (рис. 2а, кривая 2) и образованием крупных агрегатов (рис. 2б, кривая 2). Однако при этом количество ПЭВП, необходимое для полной нейтрализации заряда липосом и формирования агрегатов максимального размера, оказывается вдвое большим, чем количество ПЭВП, вызывающее аналогичные эффекты при добавлении к твердым липосомам.

Одной из причин этого может быть разрушение поликатионом мембраны жидких липосом. При этом все отрицательно заряженные липиды, расположенные как с внешней, так и с внутренней стороны мембраны, могут участвовать в образовании ионных связей с ПЭВП. Разрушение мембраны должно сопровождаться образованием небислойных структур и их последующей

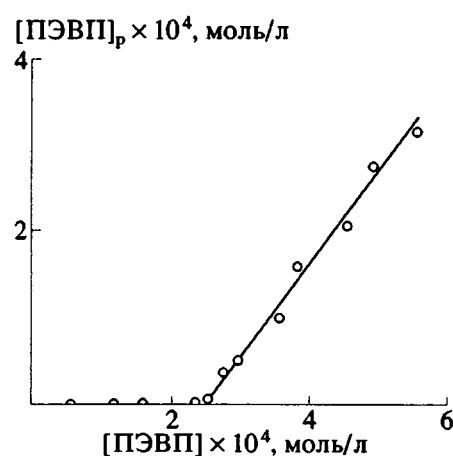


Рис. 3. Зависимость концентрации не связанных с липосомами ПЭВП от его общей концентрации в растворе.

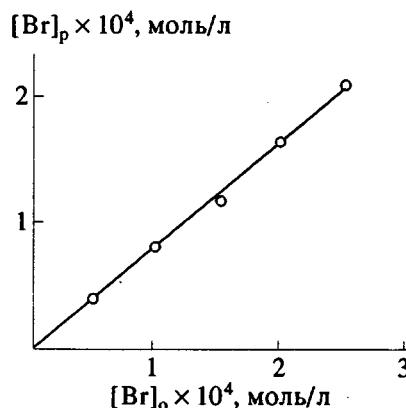


Рис. 4. Зависимость концентрации бромид-ионов в надосадочной жидкости после отделения липосом с адсорбированным ПЭВП от общей концентрации бромид-ионов в растворе.

агрегацией. Процесс скорее всего должен быть необратимым: при удалении ПЭВП, который удерживает вместе фрагменты разрушенной липидной мембраны, размер агрегатов не может быть восстановлен до размера исходных липосом. Если же при адсорбции поликатиона целостность липосом не нарушается, то диссоциация комплекса поликатион–липосома должна приводить к появлению в системе исходных липосом.

Чтобы различить эти случаи, мы воспользовались свойством ПАК образовывать прочные интерполиэлектролитные комплексы (ИПЭК) с комплементарными поликатионами (в том числе и ПЭВП) [20] и, следовательно, выступать в качестве эффективного конкурента отрицательно заряженным молекулам КЛ при связывании ПЭВП. Подробно результаты исследования конкурентного взаимодействия в тройной системе ПЭВП–липосома–ПАК описаны ниже. Здесь мы

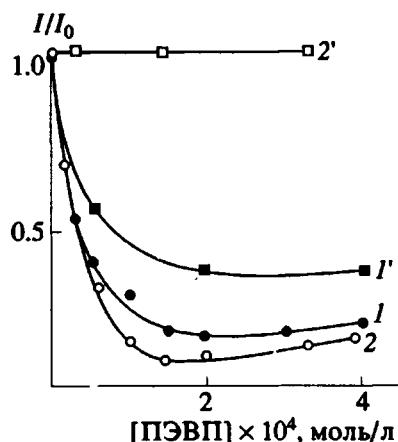


Рис. 5. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции в системе ПЭВП-меченные липосомы от концентрации ПЭВП до и после добавления ПАК при 20 (1 и 1') и 55°C (2 и 2').

остановимся только на результатах эксперимента, который связан с анализом целостности липосом при адсорбции ПЭВП. Оказалось, что добавление ПАК к предварительно сформированным крупным агрегатам жидким липосом с ПЭВП приводит к их полной диссоциации и появлению липосом исходного размера (рис. 2, кривая 2'). Полученный результат однозначно свидетельствует о том, что целостность мембранны липосом в комплексе с поликатионом не нарушается. Это в свою очередь позволяет утверждать, что наиболее вероятной причиной упомянутого ранее сдвига кривых на рис. 2а и 2б в сторону больших концентраций ПЭВП при нагревании липидной мембранны выше температуры фазового перехода является индуцированный адсорбированным поликатионом флип-флоп (переход) молекул КЛ с внутренней стороны липидного бислоя на внешний. В литературе описаны случаи значительного ускорения скорости флип-флопа при химической модификации липидной мембранны [24] и встраивании в нее белков [25]. Адсорбция линейного полизелектролита, вероятно, может оказывать на липидную мембранны аналогичное действие.

Как уже отмечалось выше, устойчивость межфазного поликатион-липидного комплекса связана с образованием множественных ионных контактов между противоположно заряженными звенями полимера и ионогенными группами молекул КЛ. Различные поликислоты – природные и синтетические, которые также могут образовывать прочные интерполизелектролитные комплексы с поликатионом, будут конкурировать с поверхностью липосом при связывании поликатиона. Таким образом можно исследовать обратимость адсорбции поликатиона на липидной мембранны. В качестве конкурента липосомам при связывании ПЭВП мы использовали ПАК, которую добавляли к комплексу ПЭВП-липосома в

трехкратном избытке по отношению к ПЭВП. За десорбцией поликатиона (сильного тушителя флуоресценции) следили по изменению интенсивности флуоресценции метки (ДПФЭ-ФИТЦ), встроенной в липидный бислон.

Как следует из рис. 5, адсорбция поликатиона на поверхности липосом сопровождается тушением флуоресценции метки (кривые 1 и 2). Последующее добавление ПАК приводит к восстановлению флуоресценции до исходного уровня в случае жидким липосом (кривая 2') и вызывает лишь незначительное увеличение флуоресценции в случае твердых (кривая 1'). Эти результаты означают, что ПАК количественно снимает ПЭВП с поверхности жидким липосом, образуя с ним водорастворимый ИПЭК, но не способна снять его с поверхности твердых липосом. Вытеснение ПЭВП с поверхности жидким липосом способствует устранению причины их агрегации. В результате агрегаты диссоциируют до размера исходных липосом (рис. 2, кривая 2'). В случае твердых липосом агрегаты сохраняются, поскольку ПЭВП не уходит с поверхности частиц и продолжает удерживать их рядом друг с другом (рис. 2, кривая 1').

Такое поведение комплексов поликатион-липосома в присутствии ПАК вызывает удивление. Дело в том, что в литературе описана латеральная сегрегация липидов в жидкой мемbrane под действием адсорбированных полионов (в частности, полилизина), заключающаяся в концентрировании отрицательно заряженных молекул липида вблизи адсорбированных макромолекул [26, 27]. Естественно предполагать, что адсорбция ПЭВП на поверхности жидким липосом так же должна сопровождаться образованием максимального числа ионных контактов ПЭВП-КЛ. Такой комплекс должен быть прочнее, чем комплекс ПЭВП с твердыми липосомами, однако изложенные выше результаты свидетельствуют об обратном. Причина этого противоречия может заключаться в следующем. Известно, что ниже температуры фазового перехода возрастает вероятность объединения мембранны нескольких липосом и появления частиц большего размера – процесса, известного как слияние липосом [28, 29]. Исследованные в настоящей работе заряженные ДПФХ-КЛ липосомы в твердом состоянии сохранили свою устойчивость, однако адсорбция поликатиона, приводящая к нейтрализации поверхности заряда липосом и их агрегации, могла способствовать также и слиянию липидных мембранны. При этом поликатион мог частично захватыватьсь внутрь новой мембранны. Понятно, что такие слившиеся липосомы невозможно дезагрегировать до исходного размера добавлением ПАК.

Совокупность полученных результатов позволяет предложить следующий механизм взаимодействия синтетического поликатиона с липосомами,

мембрана которых состоит из смеси нейтрального и отрицательно заряженного липидов.

Исходная мембрана характеризуется симметричным распределением молекул КЛ между внешней и внутренней сторонами бислоя. В пределах каждого монослоя смесь липидов образует двухкомпонентную систему, в которой существуют области с большим и меньшим содержанием отрицательно заряженного липида. Адсорбция поликатиона сопровождается образованием ПЭКК, стабилизированного множественными ионными контактами между звеньями поликатиона и отрицательно заряженными группами КЛ. Нейтрализация заряда липосом приводит к утрате ими стабильности и последующей агрегации.

Если мембрана находится в состоянии "геля", то взаимодействие ПЭВП с липосомами развивается как адсорбция поликатиона на поверхности с фиксированным положением отрицательных зарядов. При этом только молекулы КЛ, расположенные на внешней стороне мембранны, участвуют в образовании комплекса с ПЭВП. Такое взаимодействие оказывается необратимым, по-видимому, из-за индуцированного поликатионом частичного слияния липосом.

В мемbrane, находящейся в жидкокристаллическом состоянии, подвижность липидов приводит к резкому изменению состава и структуры межфазного ПЭКК. Адсорбированный поликатион индуцирует переход молекул КЛ из внутреннего монослоя во внешний. В результате в образовании комплекса с поликатионом принимают участие все отрицательно заряженные липиды мембранны. Очевидно, что при этом количество ионных связей, которые образует с поверхностью каждая адсорбированная макромолекула, оказывается большим, чем при ее адсорбции на твердую мембрану с фиксированным положением зарядов. Однако несмотря на это, взаимодействие ПЭВП с жидкой мембраной является обратимым и не сопровождается ни разрушением, ни слиянием мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тодосийчук Т.Т., Липатов Ю.С. // Физикохимия многокомпонентных полимерных систем. Киев: Наукова думка, 1986. Т. 1. С. 130.
2. Cohen Stuart M.A., Cosgrove T., Vincent B. // Adv. Coll. Int. Sci. 1986. V. 24. P. 143.
3. Флир Г., Ликлема Я. // Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел. М.: Мир, 1986. С. 182.
4. Targeting of Drugs / Ed. by Gregoriadis G., Senior J., Trout A. New York: Plenum Press, 1982.
5. Tirrell D.A. // J. Controll. Release. 1987. V. 6. P. 15.
6. Kabanov V.A. // Makromol. Chem., Macromol. Symp. 1990. V. 33. P. 279.
7. Петров Р.В., Хаштов Р.М. Искусственные антигены и вакцины. М.: Медицина, 1988.
8. Kataoka K., Okano T., Sukurai Y., Maruyama A., Tsuruta T. // Multiphase Biomedical Materials / Ed. by Tsuruta T., Nakajima A. Utrecht-Tokyo, 1989. P. 1.
9. Yamauchi K., Doi K., Kinoshita M., Kii F., Fukuda H. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1110. P. 127.
10. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. М.: Наука, 1986.
11. Burgess S.W., McIntosh T.J., Lentz B.L. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 2653.
12. Rand R.P., Parsegian V.A. // Molecular Mechanism in Membrane Fusion / Ed by Ohki S. New York: Plenum Press, 1988. P. 73.
13. Saez R., Alonso A., Villena A., Goni F.M. // FEBS Lett. 1982. V. 137. P. 323.
14. Walter A., Steer C., Blumenthal R. // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 861. P. 319.
15. Wang C.-Y., Huang L. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 4409.
16. Oku N., Shibamoto S., Ito F., Gondo H., Nango M. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 8145.
17. Сухишвили С.А., Обольский О.В., Астафьевича И.В., Кабанов А.В., Ярославов А.А. // Высокомолек. соед. А. 1993. Т. 35. № 11. С. 1895.
18. Fuoss R.M., Strauss U.P. // J. Polym. Sci. 1948. V. 3. P. 246.
19. Starodubtsev S.G., Kirsh Yu.E., Kabanov V.A. // Eur. Polym. J. 1977. V. 10. P. 739.
20. Kabanov V.A., Zezin A.B. // Pure and Appl. Chem. 1984. V. 56. P. 343.
21. Ибрагимова З.Х., Касаин В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1986. Т. 28. № 8. С. 1640.
22. Сухишвили С.А., Полинский А.С., Ярославов А.А., Чечик О.С., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. С. 381.
23. Ермаков Ю.А., Февралева И.С., Атаяллаханов Р.И. // Биол. мембранны. 1985. Т. 3. С. 1094.
24. Almgren M., Swarup S. // Chem. Phys. Lipids. 1982. V. 31. P. 13.
25. De Kruijff B., van Zoelen E.G.G., van Deenen L.L.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 509. P. 537.
26. Carrier D., Dufourcq J., Farcon J.-F., Pezolet M. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 820. P. 131.
27. Mittler-Neher S., Knoll W. // Biochim. Biophys. Res. Comm. 1989. V. 162. P. 124.
28. Larrabee A.L. // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 3321.
29. Lichtenberg D., Freire E., Schmidt C.F. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 3462.

Adsorption of Polycation on the Surface of Negatively Charged Liposomes. Effect of Phase State of the Lipid Bilayer on Composition of the Polycation–Liposome Complex

A. A. Yaroslavov, A. A. Efimova, V. Ye. Kul'kov, and V. A. Kabanov

*Moscow State University
Moscow, 119899 Russia*

Abstract – Adsorption of a synthetic polycation – poly-N-ethyl-4-vinylpyridinium bromide – on the surface of negatively charged liposomes composed of dipalmitoylphosphatidylcholine and cardiolipine (charge ratio 9 : 1) was studied, spacial attention being paid to composition and structure of the interface polycation–cardiolipine complex. In the initial liposomes, charged cardiolipine molecules were shown to be distributed half-and-half between both leaflets of the lipid membrane. Below gel to liquid-crystalline phase transition temperature, only cardiolipine molecules of the outer leaflet of the bilayer was found to form the complex with polycation. In this case, polycation adsorption is irreversible, probably due to partial polycation-induced liposome fusion. Above the phase transition temperature, all cardiolipine molecules, from both leaflets of the bilayer, are able to form complex with polycation. Because, under polycation adsorption, liposomes keep their integrity the conclusion was made of polycation-induced transmembrane migration of cardiolipine molecules from the inner to outer leaflet of the lipid membrane.