Адсорбция катионов на фосфолипидных мембранах из анионных липидов

1. Аннотация

Живая клетка состоит из многих компонентов, покрытых мембраной, которая во многом обеспечивает их барьерные и структурные функции. Поверхность мембран живой клетки практически всегда заряжена отрицательно, что отражается на свойствах мембраны омывающего ее раствора. Изменение заряда мембраны возможно двумя способами: при помощи изменения состава заряженных липидов и нелипидных компонент мембраны и при помощи адсорбции заряженных частиц на ее поверхности. Например, известно, что только в присутствии катионов Ca^{2+} становится возможным слияние мембран, поскольку эти катионы эффективно нейтрализуют мембранную поверхность. Поэтому изучение изменения зарядового состояния поверхности в присутствии катионов представляет большой интерес. Электрическое поле в толще липидного бислоя распределено неравномерно: гидрофобная область всегда имеет сильно положительный потенциал (сотни милливольт!) по отношению к раствору. Трансмембранные белки всегда испытывают на себе присутствии этого внутримембранного поля, поэтому их функционирование и созревание может изменяться при изменении величины этого поля. Ряд катионов способен изменять не только поверхностный заряд мембраны, но и величину внутримембранного поля, влияя на структуру мембраны и гидратной воды. Экспериментальные техники, направленные на изучение поверхностных и внутренних компонент электрического потенциала мембраны достаточно трудоемки и не позволяют исследовать связывание катионов с мембраной на молекулярном уровне. Поэтому использование методов молекулярного моделирования помогает в интерпретации экспериментальных феноменов и может позволить сделать предсказания о воздействии различных катионов на мембрану.

Настоящая задача посвящена измерению параметров адсорбции на поверхности мембраны низкомолекулярных катионов в рамках модели изотермы Ленгмюра при помощи метода полноатомной молекулярной динамики. Анализ подобных поверхностных явлений не возможен без привлечения аппарата коллоидной химии, теории Гуи-Чепмена-Штерна. Кроме решения основной задачи, на модельной системе предлагается наблюдать за строением электрического поля внутри мембраны и за строением двойного электрического слоя.

2. Теоретическое введение

2.1. Двойной электрический слой (модель)

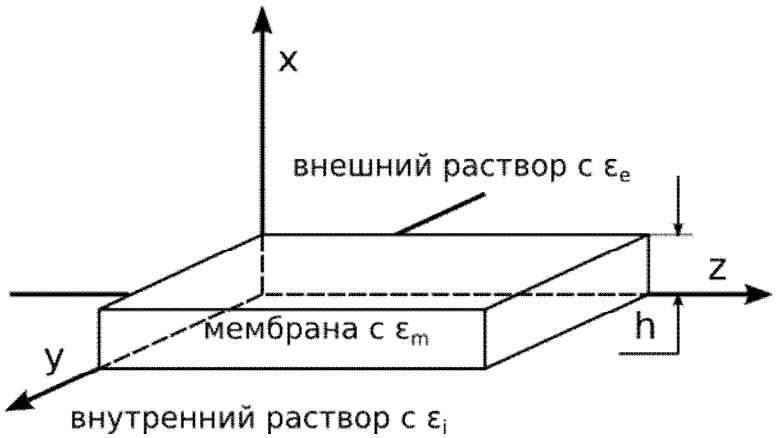

Рисунок 1. Схематическое изображение плоского фрагмента бислойной мембраны (описание см. в тексте).

Рассмотрим плоский элемент мембраны (бислоя) толщиной h. На внутренней и внешней поверхности мембраны распределен электрический заряд с поверхностной плотностью $\sigma_i(z,y)$ и $\sigma_e(z,y)$, соответственно. При этом мы полагаем, что в объеме бислоя (т.е. в толще мембраны) зарядов нет. Поверхностные заряды будем полагать жестко связанными с мембраной, т.е. они являются неподвижными. Именно поверхностный заряд мембраны индуцирует в окружающем пространстве электрическое поле, т.е. поверхностный заряд является **потенциалобразующим** зарядом. Диэлектрическая проницаемость мембраны равна ε_m, а обе ее поверхности граничат с водным раствором электролита (для простоты будем полагать, что это симметричный раствор). Равновесные концентрации растворов равны c_i и c_e для внутреннего и внешнего объемов, а диэлектрические проницаемости растворов равны ε_i и ε_e, соответственно.

Можно поставить вопрос, какова напряженность электрического поля (или каков потенциал), возбуждаемого заряженной мембраной в окружающем пространстве? Ниже дается приближенный ответ на этот вопрос.

2.2. Уравнение Пуассона

Пусть в среде существует некоторое распределение зарядов, возбуждающих в окружающем пространстве электрическое поле напряженностью $\vec{E}$. Это поле удовлетворяет **уравнению Максвелла**

$$\mathrm{div}(\varepsilon(\vec{r})\vec{E}(\vec{r})) = 4\pi\, F\, c(\vec{r}) \tag{1.1}$$

где F - заряд моля электронов, $c(\vec{r})$ - концентрация свободных зарядов в пространстве. Заметим, что в растворе **симметричного одновалентного электролита** (далее просто, «электролита») концентрация заряда равна разности концентраций положительных и отрицательных ионов: $c(\vec{r}) = c^+(\vec{r}) - c^-(\vec{r})$, где $c^+(\vec{r})$ и $c^-(\vec{r})$, соответственно, концентрации положительных и отрицательных ионов в данной области пространства. Используя известное соотношение между электростатическим полем и потенциалом

$$\vec{E}(\vec{r}) = -\mathrm{grad}\,\Psi(\vec{r}) \tag{1.2}$$

из уравнения (1.1) получим

$$\mathrm{div}(\varepsilon(\vec{r})\,\mathrm{grad}\,\Psi(\vec{r})) = -4\pi F\, c(\vec{r}) \tag{1.3}$$

Если принять, что диэлектрическая проницаемость для данной среды является величиной постоянной, то из уравнения (1.3) получим хорошо известное **уравнение Пуассона:**

$$\Delta\Psi(\vec{r}) = -\frac{4\pi F}{\varepsilon} c(\vec{r}), \tag{1.4}$$

где Δ - это оператор Лапласа.

2.3. Уравнение Пуассона-Больцмана

Вернемся к нашей модели. Полагая, что ионы раствора вблизи заряженной поверхности распределяются по закону Больцмана, то для концентрации заряда получим

$$c(\vec{r}) = c^{+}(\vec{r}) - c^{-}(\vec{r}) = c\left(\exp\left(-\frac{e\Psi}{kT}\right) - \exp\left(+\frac{e\Psi}{kT}\right)\right) = -2c\sinh\left(\frac{e\Psi}{kT}\right), \tag{1.5}$$

где $\pm e\Psi$ - энергия однозарядного иона в электростатическом поле с учетом его знака, k - постоянная Больцмана, T - температура, c - равновесная концентрация ионов каждого знака (например, для раствора электролита эти равновесные концентрации одинаковы).

Если выполнено условие[1]

$$\frac{e\Psi}{kT} << 1, \tag{1.6}$$

то выражение (1.5) можно линеаризовать, раскладывая функцию гиперболического синуса в ряд Тейлора и ограничиваясь первым членом разложения. Тогда уравнение (1.4) примет вид

$$\Delta\Psi(\vec{r}) = \lambda^{-2}\Psi, \tag{1.7}$$

где

$$\lambda = \left(\frac{8\pi e^2 N_a c}{\varepsilon kT}\right)^{-\frac{1}{2}}, \tag{1.8}$$

- это параметр, характеризующий уменьшение потенциала с удалением от заряда-источника поля и представляющий собой **дебаевскую длину**, т.е. расстояние на котором потенциал уменьшается в «е» раз (это будет видно из дальнейшего). Уравнение (1.4) с $c(\vec{r})$ в виде (1.5) (а также линеаризованное уравнение (1.7)) называется **уравнением Пуассона-Больцмана**. Заметим, что условие (1.6) очень часто выполняется для реальных биологических и химических систем.

2.4. Постановка и решение модельной задачи

Для ответа на вопрос, поставленный в пункте 1.1, необходимо формализовать нашу задачу. Разобьем все пространство на три области – внутреннюю область (величины, относящиеся к этой области, будем отмечать индексом «i»), область мембраны (область бислоя, индексируемая «m») и внешняя область, индекскируемая «e» (см. рис.1). Далее, будем считать, что заряд по поверхностям мембраны распределен равномерно, т.е. $\sigma_i(z, y) = \sigma_i = const$ и $\sigma_e(z, y) = \sigma_e = const$. Таким образом, в среде будет существовать только нормальная компонента поля и наша задача сведется к рассмотрению одномерного случая, когда потенциал меняется только в направлении оси x (см. рис.1).

[1] Обычно считается, что это условие выполняется, когда абсолютное значение поверхностного потенциала не превышает 25 мВ

Воспользуемся уравнением (1.7), которое необходимо дополнить граничными условиями: (1) непрерывностью потенциала на границе раздела двух сред и (2) скачком нормальной компоненты вектора электрической индукции $\vec{D}_n = \varepsilon \vec{E}_n$ на этой границе. В результате получим следующую краевую задачу для трех областей: дифференциальное уравнение

$$\frac{\partial^2 \Psi_a(x)}{\partial x^2} - \lambda_a^{-2} \Psi_a(x) = 0, \tag{1.9}$$

где индекс $a = i, m, e$, $\lambda_i = \left(\frac{8\pi e^2 N_a c_i}{\varepsilon_i kT} \right)^{-\frac{1}{2}}$, $\lambda_m^{-1} = 0$, $\lambda_e = \left(\frac{8\pi e^2 N_a c_e}{\varepsilon_e kT} \right)^{-\frac{1}{2}}$,

и граничные условия

$$\begin{cases} \Psi_i(0) = \Psi_m(0) \\ \Psi_m(h) = \Psi_e(h) \\ \varepsilon_i \left. \frac{\partial \Psi_i}{\partial x} \right|_{x=0} - \varepsilon_m \left. \frac{\partial \Psi_m}{\partial x} \right|_{x=0} = 4\pi\sigma_i \\ \varepsilon_m \left. \frac{\partial \Psi_m}{\partial x} \right|_{x=h} - \varepsilon_e \left. \frac{\partial \Psi_e}{\partial x} \right|_{x=h} = 4\pi\sigma_e \end{cases}, \tag{1.10}$$

Нахождение общего решения уравнения (1.9) для каждой области не вызывает затруднений, в результате находим

$$\Psi(x) = \begin{cases} \Psi_i(x) = A \exp\left(\lambda_m^{-1} x\right), \ x < 0, \\ \Psi_m(x) = C_1 x + C_2, \quad 0 < x < h, \\ \Psi_e(x) = B \exp\left(-\lambda_e^{-1}(x-h)\right), \ x > h. \end{cases}, \tag{1.11}$$

Коэффициенты A, C_1, C_2, B должны быть найдены из граничных условий (1.10). Подставляя (1.11) в эти условия, получим

$$A = C_2 = \frac{\Delta_A}{\Delta}, \ B = \frac{\Delta_B}{\Delta}, \ C_1 = \frac{1}{h}(B - A), \tag{1.12}$$

Где

$$\begin{aligned} \Delta &= (\varepsilon_i \lambda_i^{-1} h + \varepsilon_m)(\varepsilon_e \lambda_e^{-1} h + \varepsilon_m) - \varepsilon_m^2 \\ \Delta_A &= 4\pi h \left(\sigma_i (\varepsilon_e \lambda_e^{-1} h + \varepsilon_m) + \sigma_e \varepsilon_m \right) \\ \Delta_B &= 4\pi h \left(\sigma_e (\varepsilon_i \lambda_i^{-1} h + \varepsilon_m) + \sigma_i \varepsilon_m \right) \end{aligned}, \tag{1.13}$$

Выражения (1.11)–(1.13) решают поставленную задачу.

2.5. Количественное решение задачи

Рассмотрим качественный характер изменения потенциала $\Psi(x)$ при выполнении следующих условий: $\varepsilon_i = \varepsilon_e = \varepsilon$, $\lambda_i = \lambda_e = \lambda$, $\sigma_i = \sigma$, $\sigma_e = -\sigma$, которые соответствуют случаю плоского конденсатора, заполненного однородным диэлектриком с проницаемостью ε_m и погруженного в раствор электролита. Согласно выражениям (1.11) – (1.13), получим

$$\Psi(x)=\begin{cases}\Psi_i(x)=\Psi_0\exp\left(x/\lambda\right),\ x<0,\\ \Psi_m(x)=\Psi_0\left(-\dfrac{2x}{h}+1\right),\ 0<x<h,\ ,\\ \Psi_e(x)=-\Psi_0\exp\left(-\dfrac{x-h}{\lambda}\right),\ x>h,\end{cases}\tag{1.15}$$

где введено обозначение

$$\Psi_0=\frac{4\pi\sigma h}{\varepsilon\lambda^{-1}h+2\varepsilon_m},\tag{1.16}$$

Из (1.15) следует, что потенциал обращается в ноль не только при условии $x\to\pm\infty$, но также и при $x=h/2$. Разность потенциалов между поверхностями мембраны (между обкладками конденсатора) равна $\Delta=2\Psi_0$. Эта величина отличается от разности потенциалов Δ_0 между пластинами такого конденсатора, находящегося в чистом растворителе, когда $\chi=0$ (при $\lambda\to\infty,\ \Delta\to\Delta_0=4\pi\sigma h/\varepsilon_m$). На рисунке 2, согласно (38), представлен вид потенциала $\Psi(x)$ при $\Psi_0=1,\ \lambda=1,\ h=2$.

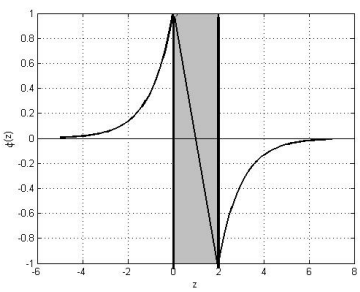

Рисунок 2. Изменение потенциала $\Psi(x)$ вдоль нормали к поверхности мембраны, согласно (1.15), при условии $\Psi_0=1,\ \lambda=1,\ h=2$. Поверхностям мембраны соответствуют прямые $x=0$ и $x=2$.

Рассмотрим теперь изменение потенциала при значениях параметров, характерных для реальных бислойных липидных мембран. Диэлектрические проницаемости внутреннего и внешнего растворов электролитов будем считать одинаковыми и равными диэлектрической проницаемости воды при комнатной температуре $\varepsilon_i=\varepsilon_e=80$. Диэлектрическую проницаемость мембраны примем равной $\varepsilon_m=2$, а ее толщину, соответственно, $h=70$ Å. Концентрацию внутреннего раствора электролита примем равной $c_i=100$ мМ, а внешнего, соответственно, $c_e=130$ мМ. Поверхностную плотность заряда внутренней и внешней поверхностей мембраны примем, соответственно, $\sigma_i=+18;\sigma_e=-18$ мкКл/см^2. Такая величина поверхностного заряда соответствует достаточно сильно заряженной мембране.

Для параметров затухания потенциала при удалении от поверхности мембраны в раствор получим значения $\lambda_i=10,\lambda_e=8.47$ Å. На Рисунке 3 приведена кривая изменения потенциала в этом случае. Качественно ход кривой на Рис. 3 соответствует ходу кривой на Рис. 2. Вместе с тем легко видеть из Рис. 3, что крутизна спада потенциала для внешней области (справа от мембраны) значительно превосходит таковую для внутренней области, хотя различия в концентрациях электролитов не очень большие. Во внутренней области потенциал «выходит на ноль» при удалении от поверхности примерно на 40 Å, в то время как для внешней области потенциал достигает нулевого уровня примерно на расстоянии 30 Å от внешней поверхности мембраны.

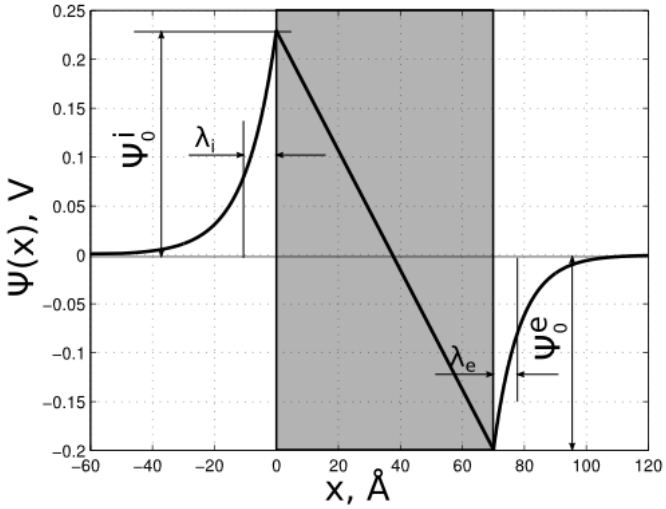

Рисунок 3. Изменение потенциала $\Psi(x)$ вдоль нормали к поверхности мембраны, согласно (1.11)–(1.13) (значения параметров указаны в тексте). Вдоль оси абсцисс значения указаны в ангстремах (Å), а вдоль оси ординат – в вольтах (В). Толщина бислоя составляет 70 Å.

2.6. Распределение электрического поля в реальной БЛМ. Дипольный потенциал.

- Известно, что биологические мембраны существуют в виде бислоя, в котором заряженные или цвиттерионные полярные группы направлены в водную фазу, а углеводородные хвосты - внутрь мембраны. Поверхность мембраны почти во всех случаях несет отрицательный заряд, поскольку катионные липиды во всех организмах в ее составе представлены крайне слабо. Отрицательный заряд этих молекул обеспечивается низким pK фосфатной группы остова молекулы липида ($pK_a < 1$), то есть более 90% фосфатных групп оказываются ионизированными при физиологических значениях pH. Плотность заряженных групп и их экранирование ионами электролита отражает величина поверхностного потенциала, Ψ_0 (Ψ_s на Рис.4), которую мы определили в предыдущем параграфе. Прямому измерению величина Ψ_0 не доступна, тогда как электрофоретическая подвижность определяется потенциалом, расположенным на некотором расстоянии от поверхности, и называемым электрокинетическим потенциалом, (Ψ_ζ на Рис.4). Плоскость, на которой падает этот потенциал называют границей скольжения, как правило она располагается на расстоянии 2 Å от поверхности [McLaughlin, 1989].

На Рис. 3 хорошо видно, что максимального абсолютного значения электрический потенциал достигает в точках $x=0$ и $x=70$. Потенциал в этих точках называется **«поверхностным потенциалом»** и представляет собой одну из характеристик, измеряемых в натурном эксперименте. Спад потенциала вдали от поверхности описывается простой экспоненциальной зависимостью, которая называется уравнением Гуи в линейном приближении (1.14); оно было введено выше. В случаях, когда условие малости потенциалов (1.6) не выполняется, решение нелинеаризованного уравнения Пуассона-Больцмана (1.4), тем не менее, выражается в элементарных функциях. Не приводя промежуточных выкладок, запишем это решение в неявной форме:

$$\tanh\frac{ez\Psi(x)}{4kT} = \exp\left(-\frac{x}{\lambda}\right)\tanh\frac{ez\Psi_0}{4kT}, \qquad (1.17)$$

где z – заряд иона. Выражение (1.17) называется **уравнением Гуи** или **тангенсоидой Гуи**. Легко видеть, что при малых потенциалах $\tanh(x) \simeq x$ и это уравнение вырождается в экспоненту (1.14).

Между гидрофобной областью мембраны и объемом всегда существует значительное падение электрического потенциала, которое различными методами оценивается величиной от 200 до 400 мВ [Brockman, 1994] для жидко-кристаллического фазового состояния и называется граничным потенциалом (Ψ_b на Рис. 4). Причем не зависимо от липидного состава гидрофобная область всегда оказывается положительной по отношению к объему. Потенциал между гидрофобной областью мембраны и поверхностью диффузной части двойного слоя называется дипольным потенциалом (Ψ_d на Рис. 4), поскольку его появление связано не с разделением зарядов, а с ориентацией дипольных моментов. Как было показано в различных вычислительных работах, а также косвенно в эксперименте, дипольный потенциал наблюдаемого знака возникает в результате ориентации гиперполяризованных молекул воды на границе раздела мембрана-вода [Нестеренко, 2012].

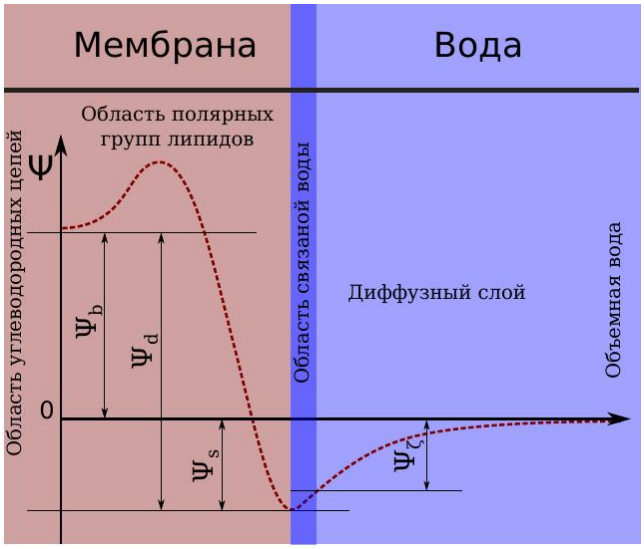

Рисунок 4. Типичное распределение электрического поля на границе мембрана-вода. Стоит обратить внимание на отличие от упрощенной мембраны на Рис. 3.

2.7. Распределение ионов в ДЭС. Адсорбция ионов. Модель Гуи-Чапмена-Штерна.

Стандартная модель предполагает, что ионы в электрическом поле поверхности распределяются согласно уравнению Больцмана, и это учитывалось выше в уравнении для электронной плотности (1.5). Подставив уравнение для потенциала (1.17) или (1.14) в уравнение Больцмана, мы можем легко найти зависимость концентрации иона от расстояния. Для малых потенциалов это будет выглядеть:

$$C(x) = C(\infty)\exp\left\{\frac{ez\Psi_0 \exp\left(-x/\lambda\right)}{kT}\right\}, \tag{1.18}$$

Это уравнение в приближении малых потенциалов представляет собой двойную экспоненту и называется **уравнением Гуи-Чепмена**. Пример профилей концентрации в реальных БЛМ изображен на Рис. 3: в логарифмических координатах профили ко- и противоионов представляют собой экспоненты, затухающие снизу и сверху,

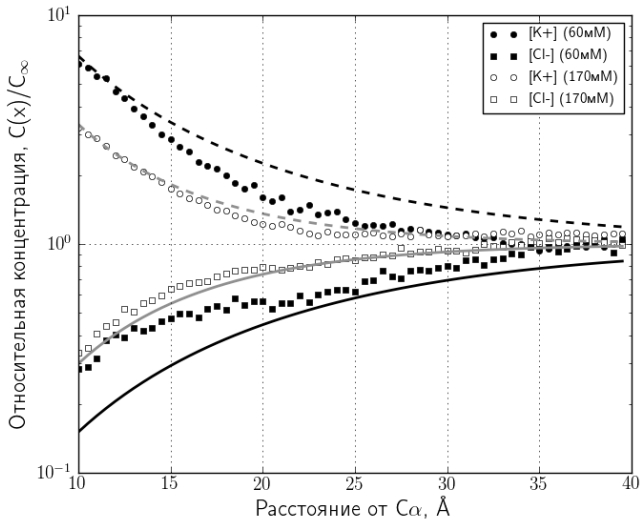

Рисунок 5. Профиль концентрации ионов вблизи поверхности бислоя, состоящего на 25% из анионных липидов. Из расчета молекулярной динамики (точки) и предсказанные по уравнению Гуи (кривые). Видно, что при относительно высоких ионных силах теория хорошо согласуется с вычислительным экспериментом (из [Нестеренко, 2012]).

соответственно.

Непосредственно контактирующие с заряженной поверхностью ионы раствора могут быть настолько тесно связаны, что проникают в область, ответственную за образование поверхностного потенциала. В этом случае говорят об образовании так называемого **слоя Штерна** – малоподвижного слоя ионов, специфически адсорбированных на поверхности. В модели Штерна для характеристики этого эффекта вводят так называемую степень w заполнения слоя Штерна, определяющую долю поверхностных зарядов, скомпенсированных противоионами. Величина w может быть определена из следующего выражения (см., например, [4]):

$$w = \frac{Kc(0)\exp\left(ze\Psi_0/kT\right)}{1 + Kc(0)\exp\left(ze\Psi_0/kT\right)}, \tag{1.19}$$

где K - константа ассоциации ионов с центрами связывания на поверхности, а $c(0)\exp\left(ze\Psi_0/kT\right)$ - уравнение Больцмана для концентрации иона в непосредственной близости от поверхности. Таким образом, поверхностный потенциал влияет на распределение адсорбирующихся катионов, которые, в свою очередь, изменяют поверхностный заряд. Не учитывая размер слоя Штерна, мы можем записать последнее предложение, как систему из двух уравнений. Первое уравнение, которое мы приводим без вывода, связывает поверхностный заряд σ и поверхностный потенциал Ψ_0 в рамках теории Гуи-Чапмена без учета экранирования поверхности слоем Штерна:

$$\sigma = (2\pi^{-1} n_0 N_a \epsilon kT)^{1/2} \sinh\left\{ze\Psi_0 / 2kT\right\}, \qquad (1.20)$$

Предположим, в нашей системе каждый потенциалопределяющий ион адсорбируются только на поверхностных носителях заряда (липидах) и имеет такой же по абсолютному значению заряд. Тогда если все центры связывания заняты противоионами, заряд поверхности равен нулю, а если ни один ион – заряд равен некоторой постоянной величине σ_0, то есть $\sigma = w\sigma_0$. Подставив (1.19) в это линейное выражение и перегруппировав члены, получим:

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = \frac{1}{Kc(0)\exp\left(ze\Psi_0 / 2kT\right)} + 1, \qquad (1.21)$$

Система (1.20)+(1.21) совмещает в себе описанную выше модель Гуи-Чапмена и учитывает экранирование поверхности противоионами слоя Штерна, поэтому данное приближение называется моделью Гуи-Чапмена-Штерна (ГЧШ). Решение этой системы уже не выражается в элементарных функциях. σ_0 и K - являются двумя константами, характеризующими связывание противоиона с поверхностью. Первая имеет смысл **плотности центров связывания** для данного иона, вторая - **константой связывания данного иона**.

Итак, настоящая задача посвящена нахождению этих констант для катионов, адсорбирующихся на отрицательно заряженных бислойных липидных мембранах (БЛМ) в вычислительном эксперименте. Решение этой задачи невозможно без исследования структуры ДЭС и электрического поля на поверхности БЛМ в присутствии катионов.

3. Цель и задачи

Практикум ориентирован на обучение работе с реальными «тяжелыми» молекулярными моделями, особенностям постановки и планирования вычислительного эксперимента, обработке траекторий молекулярной динамики. В ходе выполнения этого практикума, студенты научатся решать следующие задачи:

- Создание молекулярных моделей систем вида мембрана-вода
- Уравновешивание двойного электрического слоя
- Наблюдение за распределением ко- и противоионов вблизи заряженной поверхности
- Вычисление поверхностного и граничного потенциала мембраны из молекулярной динамики
- Вычисление параметров адсорбции (константы и плотности центров связывания) катионов на анионных фосфолипидах

4. Объект и методы

Целью задачи является определение особенностей связывания изучаемого низкомолекулярного катиона с поверхностью отрицательной фосфолипидной мембраны, поверхностный заряд которой создается присутствием в липидном составе заряженных молекул, таких как фосфатидилсерин, фосфатидилглицерол или фосфатидилинозитол. Известно, что катионы одновалентных металлов и небольшие органические катионы (например тетраметиламмоний, лизин) адсорбируются на поверхности мембран с относительно невысокими константами сродства (порядка единиц M^{-1}) [Cevc, 1990]. В то же время катионы дивалентных металлов имеют большие константы (порядка десятков M^{-1}), а для некоторых особенно высокоаффинных катионов (Be^{2+}, Gd^{3+}, La^{3+}) константа может достигать 10^4-10^5 M^{-1}

[Ermakov, 2007]. Вычисление константы становится возможным только в том случае, когда мы наблюдаем за равновесием адсорбировавшихся и свободных катионов. Поэтому, как очень большие константы, так и очень малые не могут быть измерены, поскольку мы будем наблюдать ситуации «все катионы адсорбированы» или «все катионы свободны», которые не поддаются количественному анализу. Однако средние значения констант можно измерять, наблюдая за **частичной** адсорбцией катионов.

Некоторые катионы способны не только связываться с липидными головками, изменяя поверхностный заряд, но и оказываются способными влиять на состояние гидратации полярных групп липидов и на упаковку липидов. Эту ситуацию можно наблюдать, измеряя геометрические характеристики мембран и дипольный потенциал в ходе адсорбции.

Идея вычислительного эксперимента

Наиболее простым методом измерения термодинамических характеристик в вычислительном эксперименте является наблюдение за установившимся термодинамическим равновесием. В случае реакции адсорбции катиона на анионных липидах, это равновесие:

$$I^+_{free} + PL^- \leftrightarrow I^+PL^- \ ,$$

где I^+_{free} — катионы вблизи поверхности, PL^- — незанятые катионом центры связывания (липиды), а I^+PL^- — занятые катионом центры связывания. Тогда константа адсорбции будет определяться как

$$K = \frac{[I^+PL^-]}{[I^+_{free}][PL^-]}, \tag{1.22}$$

Эта формула будет применима, если центры связывания в действительности являются анионными липидами. В работе [Ermakov, 1990] было продемонстрировано, что поверхностная плотность центров связывания может отличаться от поверхностной плотности анионных липидов в мембранах с заранее известным составом, поэтому формула (1.22) в общем случае не применима. Для измерения параметров связывания обратимся к формуле (1.21) и предположим, что связывание происходит только с анионными липидами, то есть

$$\sigma_0 = Q\alpha \ , \tag{1.23}$$

где α — доля анионных липидов в смеси. Перепишем уравнение (1.21), подставив поверхностный заряд:

$$\frac{\sigma_0}{\alpha} Q^{-1} = K^{-1} C_0^{-1} + 1, \tag{1.24}$$

Варьируя долю анионных липидов, α, и измеряя поверхностный заряд, $\sigma_0^{(\alpha)}$, и концентрацию $[I^+_{free}] = C_0^{(\alpha)}$ возле поверхности в вычислительном эксперименте, мы можем построить прямую в координатах $\left\{\frac{\sigma^{(\alpha)}}{\alpha}; \frac{1}{C_0^{(\alpha)}}\right\}$, тогда по ее наклону и смещению мы сможем найти параметры адсорбции катиона на анионных липидах[2]. Критерием качества равновесия может служить соответствие профилей концентрации

[2] Здесь и далее верхний индекс $^{(\alpha)}$ означает, что величина измерена в вычислительном эксперименте для заданного значения параметра α

$$C^{(M.D.)}(x) = C^{(G.C.)}(x)$$

или же соответствие потенциала, определенного из уравнения Больцмана и потенциала, определенного из поверхностного заряда:

$$\Psi_0^{(M.D.)}(x) = \Psi_0^{(G.C.)}(\sigma^{(M.D.)})$$

Молекулярная динамика как основной метод решения задачи

Расчет молекулярной динамики (МД) по сути представляет из себя химический эксперимент в очень маленьком объеме с ограничениями на протекания химических реакций. Все атомы замещаются точечными частицами, обладающими массой, парциальным зарядом. Потенциал системы включает двухцентровые члены, описывающие «невалентные» взаимодействия: кулоновские и ван-дер-ваальсовые. Валентные взаимодействия описываются 2-х, 3-х и 4-х центровыми членами (валентные связи, валентные углы и торсионные углы, соответственно). В силовых полях 2-го поколения потенциал может включать более многоцентровые члены, однако в данной задаче их использование не предполагается. Работа предполагает использование классических силовых полей, в частности силового поля OPLS с исправленными двугранными углами для углеводородных цепей липидов [Berger, 1997; Нестеренко, 2011]. OPLS – одно из полей хорошо подходящее для построения молекулярно-динамических моделей (**топологий**) низкомолекулярных органических соединений.

Молекулярная динамика растворов производится с **периодическими граничными условиями,** то есть кубическая вычислительная сцена (**бокс**) окружается своими репликами по всем шести граням куба. Модельная мембрана, находящаяся параллельно плоскости OXY, замыкается вдоль четырех боковых граней куба и имитирует бесконечную мембрану. Замыкая водное окружение над и под плоскостью мембраны, мы имитируем ламеллярную жидкокристаллическую фазу, обозначающуюся L_α, в системе липид-вода. Таким образом, **моделирование мембраны на самом деле представляет собой моделирование стопки бесконечных плоских мембран**, между которыми создается прослойка растворителя высотой, равной высоте вычислительного бокса минус высоте бислоя. Для контроля объемной концентрации и во избежание расклинивающего давления через периодические образы, нам важно, чтобы прослойка воды была заметно больше удвоенного радиуса Дебая.

Из-за достаточно крупного размера наших систем, мы пользуемся большим шагом интегрирования (2 фс). Поскольку валентные связи с легкими атомами имеют период колебаний близкий к величине шага, нам приходится использовать так называемые **констрейны**. Констрейны – это специальный алгоритм поддержания некоторых геометрических параметров (в нашем случае – длин связей), работающий параллельно уравнениям движения. Связи под управлением констрейнов исключаются из суммарного потенциала системы и поддерживают свою длину нефизичными (чисто-математическими) способами.

5. Ход работы

5.1. Приготовление вычислительных сцен

(3.1.а) Сборка мембраны. Сначала мы выбираем из предложенного преподавателем набора катион (назовем его X^+) и два липида: анионный (AL^-) и цвиттерионный (ZL^0). Основная задача будет – измерить параметры адсорбции катиона X^+ на липидах AL^-. Для измерения константы связывания нам потребуется «собрать» набор мембран, различающихся содержанием AL^-. Сначала рассмотрим процесс сборки одной мембраны. Стартовые конфигурации липидов (PDB-файл с одним липидом,

Стартовые конфигурации липидов и их топологии в OPLS + дополнение к файлам силового поля GROMACS.	erg.biophys.msu.ru/wordpress/archives/94

«распрямленным» вдоль длинной оси) вместе с топологиями мы загружаем с сайта лаборатории. Для создания начальных конфигураций липидных бислоев мы воспользуемся утилитой, разработанной в группе ERG [Нестеренко, 2011], которая помещает липиды на достаточно плотную гексагональную сетку, варьируя конформацию и угол поворота липида вокруг длинной оси.

Скрипты мембранного генератора и документация к ним	erg.biophys.msu.ru/wordpress/archives/272

В данном скрипте мы должны установить номер любого атома головы липида, который будет считаться его геометрической вершиной (heads). Нам нужно задать процентные соотношения липидов (frac), шаг гексагональной сетки (gstep) и расстояние между геометрическими центрами монослоев в бислое (zdist). Полученная в результате работы скрипта мембрана должна быть визуально проверена в VMD или PyMOL на предмет того, нормально ли были подобраны параметры геометрии. Слишком маленькие значения могут привести к структуре мембраны со слишком тесно переплетенными группами атомов, которые не смогут разойтись в результате процедуры минимизации энергии. Установка слишком больших параметров также нежелательна, поскольку тогда растворитель может успеть попасть в промежутки между липидами до того, как мембрана «затянется» в расчете МД.

Итого необходимо сделать не менее трех мембран с различными процентными содержаниями анионных липидов. Рекомендуемые значения соотношений анионного (AL^-) и нейтрального (ZL^0) липидов в смеси: 100% AL; 20:80 ZL:AL; 40:60 ZL:AL; 80:20 ZL:AL; 100% ZL. **Все дальнейшие манипуляции, описанные для одной системы, необходимо производить для каждой мембраны!**

➔*На этом шаге вы должны получить серию структур мембран в формате PDB.*

(3.1.b) Составление начального файла топологии. Устройство файла топологии описано в приложении. Нам нужно подключить файлы силового поля OPLS, файл с моделью воды (например, TIP3P), файлы с топологиями используемых липидов и топологии ионов. Если в нашей мембране 100 одинаковых липидов, то мы просто добавляем в секцию [molecules]:

```
DOG 100
```

Если липиды расположены в PDB-файлах случайным образом, в файле топологии они должны быть указаны в правильном чередовании:

```
DOP 1
DOG 1
DOG 1
…
```

Сделать это можно, если, воспользовавшись командой grep, вывести по одной строке на липид из *PDB*-файла. Например, если в обоих липидах есть атом H11, то при помощи команды

```
grep ‘ H11 ‘ membrane.pdb
```

мы получим вывод, содержащий колонку липидов в том порядке, в котором они попали в структурный файл.

➔*На этом шаге вы должны получить серию топологий мембран в формате TOP.*

(3.1.d) Установка бокса и добавление растворителя. Центрирование мембраны на вычислительной сцене производится командой editconf (см. приложение команды GROMACS). Размеры бокса должны быть подобраны таким образом, чтобы мембрана

замыкалась через периодические граничные условия и чтобы межмембранная прослойка воды была существенно выше удвоенного радиуса Дебая (см. выше). При этом необходимо учитывать, что после уравновешивания прослойка воды слегка «подожмется». Получите все ваши мембраны в формате GRO и визуально проверьте их периодичность в программе VMD.

@ Внимание! Если мы работаем с органическими катионами, то они добавляются перед растворителем! См. 3.1.e.

Добавление растворителя производится при помощи команды genbox (см. приложение команды GROMACS). Genbox должен получить на вход GRO-файл с установленным боксом и файл топологии (не обязательно[3]).

При помощи VMD вы можете увидеть, что при добавлении растворителя часть молекул воды попала в толщу бислоя. За время продуктивного расчета покинуть гидрофобную область они не успеют и могут образовывать «линзы». В данном случае это нежелательно, поэтому эти молекулы должны быть удалены при помощи программы wat_rem. Wat_rem работает с форматом G96, поэтому необходимо сконвертировать вашу финальную структуру в этот формат при помощи editconf. Wat_rem нашем сайте. Для правильной работы нужно установить границы отсечения

Инструмент удаления лишнего растворителя (wat_rem) и документация к нему	erg.biophys.msu.ru/wordpress/archives/401

воды по оси Z (нм), которые нужно измерить в программе VMD. А также название остатка растворителя (чаще всего это SOL). После отсечения растворителя исправьте (или вставьте, если ее там нет) информацию о его суммарном количестве в секцию [molecules] файла топологии.

➔*На этом шаге вы должны получить серию структур мембран в воде в формате G96 и топологии к ним в формате TOP.*

(3.1.e) Добавление ионов. Добавление неорганических ионов производится при помощи команды genion (см. приложения команды GROMACS), которая требует на вход TPR-файл расчета[4]. Мы должны приготовить этот файл, используя команду grompp (см. приложение), TOP и G96 файлы с предыдущего шага, а также любой из предоставленных вам MDP-файлов с параметрами расчета (сейчас не важно, какими). От вас требуется добавить такое количество ионов, чтобы (1) скомпенсировать заряд системы, (2) создать ионную силу примерно 50 мМ. Суммарное количество ионов необходимо оценить по уравнениям Гуи-Чепмена, зная примерный поверхностный потенциал, и количество молекул воды в вашей системе.

@ Добавление органических катионов производится при помощи той же утилиты, что и добавление растворителя (genbox) **перед** добавлением собственно растворителя (3.1.d). Genbox заполняет модельную сцену заранее приготовленными структурными файлами с растворителем (см. приложение), а потом удаляет те молекулы, которые «наложились» на исходные. Поэтому если мы подменим растворитель на бокс с катионом – мы можем заполнить сцену катионами. На практикуме вам предлагается катион в некотором боксе (GRO-файл). Вы можете заполнять этим катионом вашу модельную сцену в разной концентрации, регулируя размеры бокса катиона: чем больше бокс, тем меньше получаемая концентрация. Не стремитесь точно рассчитать эти размеры – лучше добавить некоторый избыток

[3] Genbox дописывает в секцию [molecules] файла топологии количество добавленных молекул растворителя, однако это число у нас изменится на следующем шаге.

[4] Структура в TPR-файле в данном случае выступает только лишь как информация о парциальных зарядах. Никакого расчета с этого файла ставить нельзя. Поэтому, переименуйте его таким образом, чтобы не перепутать с настоящими файлами расчетов и не поставить с него расчет!

катионов «на глаз», а потом удалить последние несколько остатков из G96-файла вручную. После удаления из структурного файла не забывайте исправить секцию [molecules] в TOP-файле.

➔*На этом шаге вы должны получить серию структур мембран в воде с ионами в формате G96 и топологии к ним в формате TOP.*

5.2. Установка уравновешивающих и продуктивных расчетов молекулярной динамики

Прежде чем приступить к оптимизации геометрии, мы должны определиться с параметрами расчета. Вам предоставлен файл с параметрами, содержащими радиусы обрезания различных типов взаимодействий, типом алгоритма констрейн (см. выше) и прочими параметрами. Обсуждение конкретных значений параметров не входит в нашу задачу. Нам потребуется изменять лишь немногие из них.

(3.2.a) Оптимизация геометрии.

Скопируйте к себе предоставленный преподавателем MDP-файл (его содержимое приведено в приложении I, гл. 3.4). Для оптимизации геометрии необходимо выставить следующие параметры:

1. *integrator = steep* или *l-bfgs*. Этот параметр переключает вид расчета между динамикой, минимизацией, расчетом нормальных мод и пр. *steep* и *l-bfgs* - разные методы минимизации - подходят для оптимизации геометрии при наличии констрейнов;
2. *lincs_order = 8* – порядок точности расчета констрейнов. Рекомендуется устанавливать больше 4 для расчетов минимизации.
3. *nstxout = 500*, все остальные параметры записи в выходные файлы, можно установить в 0. Таким образом, координаты будут записываться каждые 500 шагов, все остальные параметры записываться не будут.

Приготовьте бинарный файл расчета при помощи команды *grompp*:

```
$ grompp –c system.g96 –f em.mdp –p topol.top –o em0.tpr
```

После этого вы можете поставить расчет минимизации на локальной машине или кластере. Не обязательно дожидаться окончания расчета, достаточно запустить *mdrun* с ключом *«–v»* и следить за размером градиентов. Остановить расчет можно, когда градиенты станут меньше 10^2 Дж/моль/нм. Финальная траектория *EM.trr* будет использована для формирования уравновешивающего расчета.

➔*На этом шаге вы должны получить оптимизированную геометрию системы, сохраненную в последнем фрейме файла TRR.*

(3.2.b) Уравновешивающий расчет.

Для того чтобы собирать с траектории МД статистику, необходимо, чтобы система как можно быстрее достигла «термодинамического» равновесия. Для этого, после оптимизации геометрии мы устанавливаем специальный расчет со следующими параметрами (приводятся параметры, отличающиеся от стандартных, данных в приложении):

1. Здесь и далее мы будем производить термостатирование отдельно для двух фаз, чтобы уравновешивание происходило быстрее. Для этого в mdp-файле мы должны указать директиву *tc_grps = lipids water_and_ions*, а значения директив *tau_t* и *ref_t* должны быть продублированы (например, *tau_t* = 300 300).

2. Для того чтобы определить отдельно группы *lipids* и *water_and_ions* необходимо создать индекс-файл, где будут перечислены все атомы, относящиеся к каждой из этих групп. Полуавтоматическое создание индекс-файла осуществляется в

консольной среде *make_ndx* (см. Приложение I, гл. 2). По умолчанию *make_ndx* создает группу water_and_ions и включает туда «классические» ионы (добавленные при помощи genion). Если в вашей системе есть и другие ионы, их нужно присоединять к этой группу. Для того чтобы объединить две группы, нужно набрать: “2 | 3” и программа создаст группу, состоящую из всех атомов второй и третьей групп.

3. Здесь и далее баростатирование будет производиться в полу-изотропном режиме для того, чтобы расширение мембраны вдоль поверхности и по нормали к поверхности происходило независимо. Для этого необходимо установить pcoupltype = semi-isothropic, а значения директив ref_p, tau_p и compressibility продублировать.

@ Давление баростата, сжимаемость и характерное время срабатывания могут быть выставлены независимо для сжатия вычислительной сцены в направлении XY и в направлении Z. При моделировании некоторых липидов в жидком состоянии может потребоваться устанавливать XY-компоненты тензора давления отрицательными, имитируя таким образом ненулевое поверхностное натяжение в системе.

4. Для уравновешивающего расчета рекомендуется ставить вид баростата *pcoupl = berendsen*, поскольку баростат Нозе-Хувера вдали от равновесия может приводить к большим флуктуациям размера вычислительного бокса.

В отличие от минимизации энергии, этот расчет необходимо устанавливать *только* на кластере (см. Приложение I, гл. 5). *grompp* мы запускаем на локальной машине, а на кластер копируем только *TPR*-файл расчета. Уравновешивающий расчет необходимо производить до тех пор, пока значение площади на липид в системе не выйдет на плато. Поскольку количество липидов в ходе динамики не изменяется, достаточно следить за площадью мембраны. Для этого при помощи *g_energy* (см. Приложение I, гл. 2) необходимо вывести термы *Box-X* и *Box-Y* из *EDR*-файла расчета. После этого построить график площади *boxX*boxY(t)* при помощи *ipython*. Команду *g_energy* можно запускать на кластере, а результирующий *XVG*-файл копировать на локальную машину.

@ Основным критерием уравновешивания мембранных систем на самом деле является стабильность xx, yy и zz-компонент тензора давления. Они хранятся в EDR-файле под названиями Pres-XX, Pres-YY и Pres-ZZ, соответственно. В сложных случаях необходимо также строить среднее (Pxx+Pyy)/2 и Pzz от времени для уравновешивающего расчета.

После окончания расчета необходимо взять начальные условия из расчета при помощи команды *trjconv*:

```
$ trjconv –s s.tpr –f out.trr –dump 45000 –o mem0eq_dump45ns.g96 -noforce
```

Обратим внимание на два момента: (1) время (45000 пс) нужно выбрать в том месте, где график площади уже вышел на плато, (2) формат выходного файла должен быть *G96*, а не *GRO* для сохранения точности координат.

➔*На этом шаге вы должны получить уравновешенную геометрию системы, сохраненную в файле G96. Также вы должны сохранить графики, подтверждающие, что уравновешивание произведено успешно.*

@ (3.2.c) Продуктивный расчет.

Продуктивный расчет может ничем не отличаться от уравновешивающего, однако чаще всего рекомендуется включить баростат Парринелло-Рамана. Делать это можно только в том случае, когда давление в системе установилось. Используя дамп-файл в качестве исходного, необходимо сделать *TPR* для продуктивного расчета таким же образом, каким это делалось для уравновешивающего. Продуктивный расчет необходимо производить в течении 150-250 нс. Если времени на продуктивный расчет по каким-либо причинам нет, мы можем использовать последние 50 нс уравновешивающей траектории в качестве источника равновесных конфигураций для расчета потенциалов, профилей концентраций и пр.

Если вы используете уравновешивающий расчет в качестве продуктивного, удостоверьтесь, что после выхода на плато прошло как минимум 50 нс.

➔*На этом шаге вы должны получить XTC-файл траектории и EDR-файл с различными показателями системы.*

5.3. Получение профилей концентрации и потенциала из траекторий

Продуктивный расчет создал два файла траектории – с высокой (*TRR*) и низкой (*XTC*) точностью. Нам будет достаточно использовать траекторию с низкой точностью. Скопируйте траекторию на локальную машину, сложите в ту же папку *TPR*-файл, с которого ставился данный расчет. Программы, собирающие статистику с траектории, работают с *PQR*-файлом; его нужно сделать из TPR:

```
$ editconf –f f.tpr –mead m.pqr
```

Также потребуется NDX-файл, который использовался для подготовки TPR. Для

Набор инструментов для анализа траекторий мембран, использующий python, numpy, MDAnalysis.	erg.biophys.msu.ru/wordpress/archives/401

построения профилей концентрации необходимо запустить (в одну строку):

```
$ gdens_mda.py –s 0mM.pqr –i EQ.xtc –o dens.xvg
–b 40000:9000:93000
–d 0.5:120:-20 –x 0mM.ndx:lipids:SOL:K –r DPC:C20
```

Диапазон времени необходимо устанавливать в той области, где достигнуто равновесие. «DPC:C20» - означает установку условного нуля в области среднего положение атома C20 остатка DPC. Название остатка и атома необходимо выбрать для своего липида: это обязательно должен быть C_α атом глицерина. Поверхность мембраны должна считаться в плоскости, на 10 А отстоящей от плоскости условного нуля. Для расчета поверхностного заряда необходимо вычислить суммарное количество заряженных частиц с внутренней стороны от плоскости «поверхности». Для этого профили локальных концентраций анионов и катионов должны быть суммированы «внутри» мембраны. Также необходимо вычислить среднее значение концентрации анионов и катионов вдали от поверхности, т.н. «объемная концентрация» и вблизи поверхности (в точке 10 А).

Для построения распределения электрического поля необходимо запустить аналогичную команду:

```
$ fistat_mda.py –s 0mM.pqr –i EQ.xtc –o dens.xvg
–b 40000:9000:93000
–d 0.5:120:-20 –x 0mM.ndx:lipids:SOL:K –r DPC:C20
```

Значение граничного потенциала из профиля потенциала, вычисленного программой *fistat*:

$$\Psi_b = \Psi(-20) - \Psi(+40)$$

Значение поверхностного потенциала из профиля концентрации рассчитывается как потенциал средней силы:

$$\Psi_s = -RT \ln \frac{C(10)}{C(40)}$$

Обратите внимание, что поверхностный потенциал рассчитывается из профиля концентрации **изучаемого катиона.**

➔*Должны быть приготовлены XVG-файлы с профилями концентраций и электрического потенциала. Отдельно необходимо вычислить концентрацию изучаемого катиона и всех прочих ионов вблизи и вдали от поверхности. Должен быть вычислен суммарный поверхностный заряд мембраны.*

5.4. Вычисление констант связывания из данных МД

Константа связывания из уравнения (1.24) может быть найдена, если построить график в координатах $\left\{\frac{\sigma^{(\alpha)}}{\alpha};\frac{1}{C_0^{(\alpha)}}\right\}$. α – процентное содержание анионного липида в смеси. $\sigma^{(\alpha)}$ - поверхностный заряд данной системы, $C_0^{(\alpha)}$ - концентрация изучаемого катиона в точке поверхности. Построение и спрямление графика может быть выполнено в любой офисной программе или среде *ipython*.

6. Требования к отчету

Отчет должен состоять из четырех частей: введения, методов, результатов и выводов. Во введении следует раскрыть вопрос о том, почему исследование адсорбции выбранного катиона на фосфолипидной мембране выбранного состава может представлять интерес и сформулировать локальную задачу практикума. После этого в разделе «Методы» необходимо описать технологию, которая использовались, привести значения параметров молекулярной динамики, липидные составы, с которыми производились расчеты и кратко описать ход конкретной работы. В главе «результаты» должны быть приведены все кривые, которые характеризуют строение двойного электрического слоя для одной из модельных мембран: профили концентраций, потенциала. Также необходимо привести графики, доказывающие, что системы пришли к термодинамическому равновесию. Если в ходе работы возникли отклонения и что-либо не удалось, необходимо сформулировать, почему. В «выводах» должны быть обозначены окончательные краткие результаты и их возможные следствия.

Копирование из методического пособия не допускается, отчет должен быть написан самостоятельно. Вместо копирования необходимо сослаться на то или иное место из пособия. Ход каждой отдельной задачи, методика могут различаться в зависимости от выбранного катиона и липидных компонент, и это необходимо подчеркнуть в отчете отдельно.

7. Контрольные вопросы

1. Чему равна дебаевская длина для 100 мМ раствора MgSO4? Какова должна быть концентрация раствора KCl, чтобы дебаевская длина в нем была такой же?
2. Во сколько раз падает концентрация катиона Na^+ на расстоянии дебаевской длины от отрицательно заряженной поверхности с поверхностным потенциалом -40 мВ в 150мМ растворе NaCl?
3. Строение ДЭС вокруг сферической заряженной частицы отличается от такого вокруг плоскости. Предположим, радиус сферической частицы равен 3 нм. При какой ионной силе строение ДЭС будет наиболее похожим на таковое для заряженной плоскости?
4. Предположим, бислойная мембрана помещена между двумя растворами. Левый раствор содержит 150 мМ KCl, правый – 10 мМ KCl. Поверхностный заряд мембраны с обеих сторон равен -20 мкКл/см^2. Дипольный потенциал равен 400 мВ. Изобразите распределение электрического поля в этой системе.
5. Мембрана омывается раствором 100 мМ XCl, катион X+ имеет константу связывания 1 М$^{-1}$, плотность центров связывания: -26 мкКл/см^2, а поверхностный

заряд в такой системе равен -10 мкКл/см^2. Как изменится поверхностный заряд и потенциал при увеличении константы связывания в 10 раз.

Литература

1. Сивухин Д.В. Общий курс физики. М.: Наука, 1979. Т.1. Механика.. 519 с. (Глава 10).
2. Лепендин А.Ф. Акустика. М.: Высшая Школа, 1976. 448 с. (Глава 4).
3. Тихонов А.Н., Самарский А.А. Уравнения математической физики. М.: Наука, 1972. 735 с. (Глава 2).
4. Духин С.С. Электропроводность и электрокинетические свойства дисперсных систем. Киев: Наукова Думка, - 1975. – 246 с.
5. Щукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия. М.: Изд-во МГУ, 1982. 348 с. (Глава 7).
6. Нестеренко А. М., Красильников П. М., Ермаков Ю. А. (2011). Молекулярно Динамическая Симуляция Бислоя DPPC В Разных Фазовых Состояниях: Гидратация и Распределение Электрического Поля в Присутствии Катионов Be^{2+}. *Биологические Мембраны*, *28*(5), 397–407.
7. Нестеренко А. М., Ермаков Ю. А. (2012). Молекулярная динамика фосфолипидных мембран: распределение ионов вблизи границы нейтрального и заряженного жидкокристаллического бислоя. 2012. *Биологические Мембраны*, *5*(29), 1–11.
8. McLaughlin S. (1989). The electrostatic properties of membranes. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, *18*, 113–36. doi:10.1146/annurev.bb.18.060189.000553
9. Cevc G. (1990). Membrane electrostatics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, *1031*(3), 311–382. doi:10.1016/0304-4157(90)90015-5
10. Ermakov Y. A., Kamaraju K., Sengupta K., Sukharev S. (2010). Gadolinium ions block mechanosensitive channels by altering the packing and lateral pressure of anionic lipids. *Biophysical Journal*, *98*(6), 1018–27. doi:10.1016/j.bpj.2009.11.044
11. Berger O., Edholm O., Jahnig F. (1997). Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophysical Journal*, *72*(5), 2002–2013. doi:10.1016/S0006-3495(97)78845-3