

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. М. В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

И-871

19-2003-135

На правах рукописи
УДК 577.352.333

ИСЛАМОВ
Ахмед Хусаинович

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ
И СВОЙСТВ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН
С ПОМОЩЬЮ РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ
И РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

Специальность: 03.00.02 — биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2003

[Дубна]

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка
Объединенного института ядерных исследований

Научные руководители кандидат физико-математических наук
В.И. Горделий
доктор биологических наук
Л.С. Ягужинский

Официальные оппоненты доктор химических наук
И.А. Василенко
доктор физико-математических наук
Г.Т. Гурия

Ведущая организация Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН, г. Пущино

Защита состоится “___” _____ 2003 года в ___ часов на
заседании специализированного совета Д 053.05.53 по защите
диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук по
специальности “биофизика” в Московском государственном
университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119899 Москва,
Ленинские горы, МГУ, биофак

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического
факультета МГУ

Автореферат разослан “___” _____ 2003 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
кандидат биологических наук Е.Э. Граевская

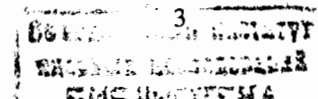
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Необходимость изучения структуры фосфолипидного бислоя обуславливается прежде всего тем, что причина сложности химического состава реальных биологических мембран до сих пор остается не установленной. Биологические мембраны включают четыре основных типа фосфолипидов: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, кардиолипин и фосфатидилсерин; каждый из которых имеет 10-15 близких структурных аналогов. Существование большого числа близких по химическому строению природных аналогов показывает, что даже небольшие изменения структуры фосфолипидных молекул имеют существенное биологическое значение. Поэтому, вопрос о том, каким образом химическая структура липидных молекул связана с физическими свойствами мембран является ключевым для правильного понимания роли липидов в функционировании мембранных систем клетки.

Общими параметрами строения практически всех фосфолипидов являются наличие двух остатков жирных кислот, с длинными углеводородными радикалами $C_{12}-C_{18}$, соединенных сложноэфирной связью с остатками глицерина, и наличие, по крайней мере, одной двойной связи в углеводородной цепи, находящейся в положении *sn-2*, тогда как в положении *sn-1* находится насыщенная углеводородная цепь. Именно указанные параметры, в силу своей универсальности, представляют наибольший интерес с точки зрения выяснения их влияния на свойства бислоя.

В настоящее время много внимания уделяется изучению липид/сурфактантных систем в водной среде. Неионные сурфактанты интересны не только потому, что они широко применяются в промышленности и биологии (для солюбилизации и выделения белков), но также и с теоретической точки зрения. Их поведение весьма сложно; небольшие изменения в головной гидрофильной группе или углеводородных цепях, изменение температуры, добавление соли или гидрофобных молекул приводят к драматическим изменениям в фазовых диаграммах. Кроме этого, неионные сурфактанты и алканы могут обладать и биологическими свойствами: антимицробной, антифотосинтезирующей, иммуномодулирующей активностями и анестетическими свойствами, которые, как предполагается, появляются от их специфического взаимодействия с компонентами биологических мембран (в виде уменьшения/увеличения гидрофобной толщины бислоя, изменения гидратации поверхности мембран и специфического связывания сурфактантов с фрагментами мембранных белков).

При решении ряда ключевых проблем, таких как локализация воды в мембране, структурные параметры мембран, используются модельные липидные системы (мультислойные липосомы и однослойные везикулы). При



этом для их изучения применяются методы рассеяния излучения на веществе и прежде всего рассеяние нейтронов и рентгеновских лучей. Эти методы позволяют определять структурные параметры липидного бислоя: его толщину, количество молекул воды, находящейся между бислоями, площадь и др. Следует подчеркнуть, однако, что существующие методы определения параметров бислоя недостаточно совершенны. И это прежде всего относится к мембранам в избытке воды, наиболее физиологически адекватным условиям для биомембран. Обусловлено это тем, что, во-первых, в ряде моделей используется предположение, что вода не проникает в полярную (гидрофильную) область бислоя и, во-вторых, не учитывается тот факт, что в мультислойных липидных системах не вся вода находится между бислоями, а часть ее скапливается во вне липосомного пространства - в дефектах (рис.1). В результате литературные данные оказываются достаточно противоречивыми. Например, число молекул воды на одну липидную молекулу дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) в жидкой фазе варьируется от 23 до 38 [1] по данным, приведенными разными авторами.

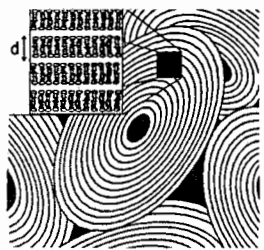


Рисунок 1. Дефекты в водной мультислойной липидной дисперсии [2].

Поэтому, крайне актуальным является развитие новых подходов, связанных как с приготовлением образцов, так и с усовершенствованием экспериментальных и теоретических методов исследования липидных бислоев, которые позволили бы надежно определить структурные параметры мембран в избытке воды и систематически установить их зависимость от химической структуры липидных молекул.

Цель работы. Работа направлена на изучение влияния химического строения липидов на структуру и свойства бислоя. Большое внимание в работе уделено связыванию воды с бислоем и ее влиянию на структуру мембран. Кроме исследования структур бислоя, состоящих из химически различных фосфолипидов, изучались изменения свойств липидного бислоя, индуцированные добавлением к фосфолипидной системе неионных сурфактантов и углеводов (декана).

Выполнение поставленных задач потребовало разработки и усовершенствования методов исследования. В частности, применения новых подходов к обработке экспериментальных данных и новые способы приготовления липидных образцов: мультислойных липосом и одиночных везикул.

Научная новизна работы.

1) Разработаны новые методики приготовления высоко ориентированных липидных мультислойных образцов для исследований с помощью дифракции

нейтронов и рентгеновских лучей, а также одиночных липидных бислоевых везикул для исследований с помощью малоуглового рассеяния нейтронов.

2) Были применены новые подходы к определению параметров липидного бислоя с учетом проникновения воды в гидрофильную область мембран с помощью малоуглового рассеяния нейтронов на одиночных липидных везикулах с использованием метода вариации контраста и дейтерий-меченных меток в липидном бислое: а) метод расчета плотности рассеяния бислоя с помощью сферических оболочек; б) метод ступенчатых функций для описания плотности рассеяния двухкомпонентного липид/сурфактантного бислоя.

3) Впервые применен метод анализа нарушений первого и второго рода в липидных мультислоях с использованием дейтерий-меченных фрагментов липидного бислоя и данных адсорбции воды липидными мультислоями.

4) Применен новый подход к получению адсорбционных изотерм воды липидными мультислоями в зависимости от заданного осмотического давления водяных паров, с использованием в качестве образца стопки стекол, с нанесенными на них ориентированными мультислоями. Новый подход к приготовлению образцов позволяет существенно снизить количество дефектов в системе липид/вода и избежать конденсации паров воды при высоких влажностях.

Использование этих методов в работе позволило получить ряд принципиально новых результатов, касающихся структуры липидного бислоя.

5) Было показано, что наличие ненасыщенной жирной кислоты в положении *sn-2* и насыщенной кислоты в положении *sn-1* фосфатидилхолина увеличивает степень гидратации полярного фрагмента липидов в составе бислоя и угол наклона полярной головы к плоскости бислоя по сравнению с фосфатидилхолинами, у которых в положениях *sn-1* и *sn-2* находятся обе насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты. При этом гидрофобные толщины всех перечисленных липидов в жидкой фазе совпадают.

6) Установлено, что карбонильные группы в структуре фосфолипидов вносят значительный вклад в величину дипольного потенциала мембраны (34%). Наибольший вклад вносит карбонильная группа ацильного остатка, находящегося в положении *sn-1*.

7) Было продемонстрировано, что добавление к липидному бислою неионных сурфактантов и углеводов (декана) приводит к эффектам изменения гидратации поверхности мембран и толщины гидрофобной области липидного бислоя в зависимости от размеров полярной головы сурфактанта.

Проведенная диссертационная работа продемонстрировала новые возможности направленного регулирования толщины бислоя, степени его гидратации и величины дипольного потенциала мембран.

Практическая ценность работы. Получены данные по дипольным потенциалам и уточненным параметрам липидного бислоя (с учетом проникновения воды в гидрофильную область бислоя), состоящего из

биологически важных фосфатидилхолинов C_{16} . Изучено влияние различных неионных сурфактантов и углеводов (декана) на структуру фосфолипидного бислоя. Полученные данные могут представлять интерес при моделировании свойств природных мембран и могут быть использованы для анализа межмембранных взаимодействий. Разработанные методики представляют интерес для исследования проблем, связанных с ролью воды в искусственных и биологических мембранах.

Апробация работы. Основные положения работы и ее отдельные результаты докладывались на международном семинаре по исследованию биологических и липидных мембран (Дубна, май 1991, 1992); международном симпозиуме по мембранам (Сакле, 23-26 апреля 1993); 11 симпозиуме "Surfactants in Solutions" (Иерусалим, июнь 1996); сессия пользователей реактора в НИИ институте (Берлин, май 1994); семинар в университете г. Лейпцига (октябрь 1994); семинар в институте Лауэ Ланжевена (Гренобль, октябрь 1996); совещание пользователей реактора ИБР-2 (июнь 2002); 12 международная конференция по избранным вопросам современной физики (Дубна, июнь 2003).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, 5 глав, заключения и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 130 машинописного текста, включая 46 рисунков, 11 таблиц и 128 библиографических ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Все главы диссертации объединены общей целью понять как химические модификации липидных молекул влияют на структуру и свойства мембран.

Во введении показана актуальность исследуемой темы, перечислены основные проблемы, стоящие в данной области, сформулированы цели и главные идеи работы, а также кратко описана структура диссертации.

В первой главе приведен литературный обзор, посвященный структуре и основным свойствам биологических и липидных мембран. Кроме того, приведен анализ литературных данных относящихся к задачам, являющимся предметом диссертации: влиянию сложноэфирных и двойных связей, находящихся в углеводородных цепях липида, на структуру и свойства бислоя; изменению свойств мембран при добавлении неионных сурфактантов и углеводов (декана).

Вторая глава состоит из описания материалов и методов, использованных в настоящей работе. Рассмотрены теоретические основы методов рассеяния

нейтронов и рентгеновских лучей, включающих дифракцию и малоугловое рассеяние.

Приведены способы приготовления образцов (высоко ориентированные липидные мультислои и одиночные бислои липидные везикулы в растворе).

Специальное внимание уделено развитию методике приготовления ориентированных образцов для дифракции нейтронов и рентгеновских лучей, а также для проведения экспериментов по адсорбции воды в водяных парах с контролируемым осмотическим давлением. Использование ориентированных образцов позволяет существенно уменьшить количество молекул воды, находящихся вне липосомного пространства, в дефектах, и, следовательно, более точно определить гидратацию самих мембран.

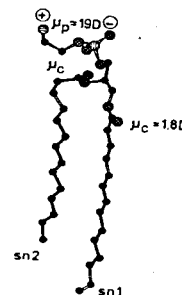
Приведены новые теоретические модели для определения структурных параметров липидного бислоя мембран в избытке воды с учетом проникновения воды в бислой с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов с использованием вариации контраста: а) трехлобчатая сферическая модель для плотности рассеяния везикул; б) ступенчатая функция распределения плотности рассеяния бислоя для анализа данных в приближении Кратки-Порода для рассеяния от плоских частиц.

Представлены краткие характеристики и схемы установок, на которых были проведены основные эксперименты.

Третья глава посвящена сравнительному исследованию структуры и свойств липидных мембран, состоящих из фосфатидилхолинов C_{16} , которые отличаются между собой наличием или отсутствием карбонильных групп в углеводородных цепях (рис.2.): (I) дипальмитоил-фосфатидилхолин (ДПФХ, две $C=O$ группы), (II) 1-пальмитоил-2-гексадецил-фосфатидилхолин (ПГФХ, $C=O$ группа в sn-1 цепи), (III) 1-гексадецил-2-пальмитоил-фосфатидилхолин (ГПФХ, $C=O$ группа в sn-2 цепи) и (IV) дигексадецил-фосфатидилхолин (ДФФХ, отсутствуют обе карбонильные группы), а также, исследованию липидных бислоев из фосфолипидов C_{16} , содержащих одну ненасыщенную цепь в положении sn-2: (V) 1-гексадецил-2-олеил-фосфатидилхолин (ГОФХ, $C=O$ группа в sn-2 цепи) и (VI) 1-пальмитоил-2-олеил-фосфатидилхолин (ПОФХ, две $C=O$ группы). Цель -

определение относительного вклада карбонильных групп в полный электрический дипольный потенциал липидного бислоя, ориентацию дипольных моментов относительно плоскости мембраны, основных параметров структуры бислоя и распределения воды в гидрофильной области мембраны.

Рисунок 2. Молекула дипальмитоилфосфатидилхолина, μ_c - дипольный момент карбонильной группы, μ_p - дипольный момент полярной головы липида.



Для определения дипольных потенциалов и структуры бислоев выше перечисленных липидов, проводились эксперименты на

монослоях с использованием Ленгмюр-Блоджетт весов по измерению изотерм давление-площадь (π - A) и электрический дипольный потенциал – площадь (ΔV - A), и эксперименты с помощью дифракции нейтронов и рентгеновских лучей, малоуглового рассеяния нейтронов на мультислойных липосомах и одиночных везикулах, соответственно.

Из экспериментов на липидных монослоях в гель фазе (рис.3.) было получено, что наличие $C=O$ в $sn-1$ углеводородной цепи существенно влияет на латеральные взаимодействия в бислое: появляется дополнительное отталкивание между липидными молекулами в плоскости мембраны, так при наличии $C=O$ в $sn-1$ (I и II) минимальная площадь, приходящаяся на липид равна $A=43\text{Å}^2$, при ее отсутствии (III и IV) площадь составляет $A=38\text{Å}^2$.

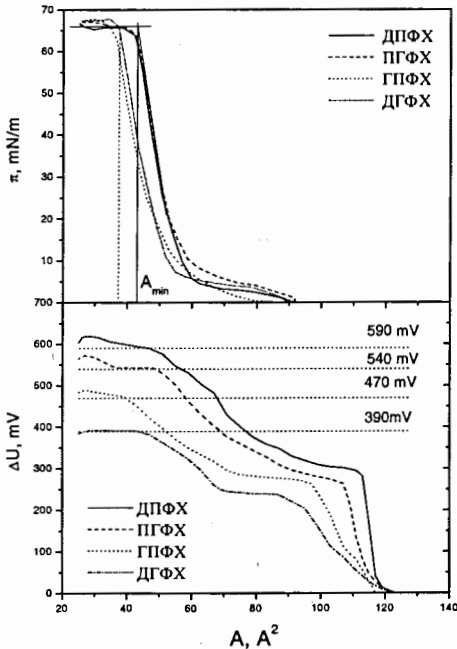
Вклад обеих карбонильных групп составляет величину около 34% от полного дипольного потенциала липида, среднее значение дипольного потенциала $C=O$ группы в положении $sn-1$ дает 135 ± 15 mV и для позиции $sn-2$ - 65 ± 15 mV.

Углы наклона обеих карбонильных групп к плоскости бислоя составляют $\sim 14^\circ$ - 20° .

Рисунок 3. (π - A) и (ΔV - A) изотермы и для липидных монослоев из ДПФХ (—), ПФФХ (---), ГПФХ (---) и ДГФХ (-·-·).

Эксперименты, с помощью дифракции нейтронов и рентгеновских лучей, а также малоуглового рассеяния нейтронов, показали, что структурные параметры бислоев относительно мало различаются при наличии или отсутствии $C=O$ групп в углеводородных цепях фосфолипидов. Были найдены следующие различия в параметрах липидных слоев: гидрофобная толщина монослоя при отсутствии карбонильной группы в $sn-1$ цепи увеличивается на $1.5\text{-}2\text{Å}$; фазовый переход из гель в жидкую фазу увеличивается на 3°C при отсутствии карбонильной группы в $sn-1$ цепи.

Было показано, что различия параметров бислоев в гель фазе определяются за счет более плотной упаковки $sn-1$ алкильных липидов (III и IV) в плоскости мембраны. В жидкой фазе эти различия для насыщенных и ненасыщенных



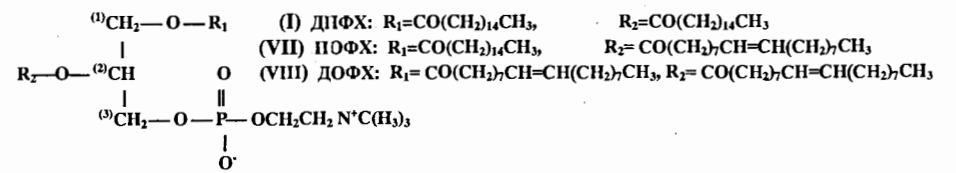
липидов не обнаружены. Эти данные находятся в хорошем согласии с результатами ЯМР исследований [3].

Основные результаты третьей главы:

1) Показано значительное увеличение дипольного потенциала в ацильных липидах по сравнению с алкильными. При этом химические различия липидов относительно мало влияют на такие структурные параметры липидного бислоя как площадь и гидратацию липидных молекул, толщину бислоя и водную прослойку между мембранами.

2) Вклад карбонильной группы в $sn-1$ цепи (135mV) заметно превосходит вклад карбонильной группы в положении $sn-2$ (65mV). Это обусловлено тем, что карбонильная группа в составе углеводородной цепи в положении $sn-1$ более глубоко погружена в углеводородную область бислоя (диэлектрическая константа $\epsilon \sim 2$ -3), ее окружение менее полярно по сравнению с окружением карбонильной группой в положении $sn-2$ ($\epsilon \sim 8$) цепи и областью полярных голов ($\epsilon \sim 30$). Из этого можно заключить, что остаток жирной кислоты в положении $sn-1$ является основным элементом гидрофобной структуры фосфолипидов, который контролирует величину дипольного потенциала мембраны.

В четвертой главе проведено изучение параметров липидных бислоев сформированных из фосфатидилхолинов с разной степенью ненасыщенности углеводородных цепей. Изучены бислои из следующих соединений: (VII) 1-пальмитоил-2-олеил-фосфатидилхолин (двойная $CH=CH$ связь в $sn-2$ положении), (VIII) диолеил-фосфатидилхолин (двойные связи в $sn-1$ и $sn-2$ цепях), (I) дипальмитоил-фосфатидилхолин (двойные связи отсутствуют, полностью насыщенные углеводородные цепи). Были использованы методы малоуглового рассеяния нейтронов, дифракции рентгеновских лучей и адсорбции воды липидными мультислоями в водяных парах.



Адсорбционные изотермы воды для ПОФХ (VII) и ДОФХ (VIII) ориентированных мультислоев в зависимости от давления водяных паров показали, что максимальная гидратация для бислоев из ПОФХ составляет 16 и для ДОФХ – 11 молекул связанной воды (рис.4.).

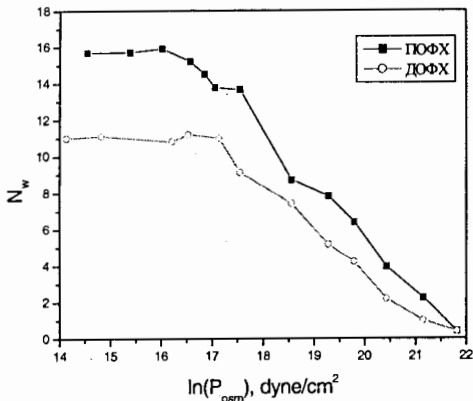


Рисунок 4. Адсорбционные изотермы воды для ПОФХ и ДОФХ ориентированных мультислоев в зависимости от осмотического давления водяных паров, задаваемых насыщенными растворами солей и полиэтиленгликоля.

Несмотря на то, что полярные головы указанных липидов имеют одинаковую химическую структуру, а как раз отличаются только структуры углеводородных цепей формирующих гидрофобную область бислоя (состоящие из углеводородных хвостов с одной и двумя ненасыщенными связями, соответственно) в эксперименте наблюдается разная гидратация именно полярных фрагментов липида.

в эксперименте наблюдается разная гидратация именно полярных фрагментов липида.

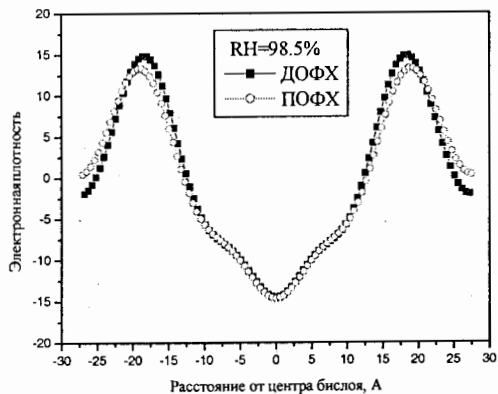


Рисунок 5. Электронные плотности ДОФХ и ПОФХ бислоев при влажности $RH=98.5\%$. Максимумы на кривой электронной плотности соответствуют фосфатной группе PO_4 , минимум – центру бислоя.

С другой стороны, сравнение электронных плотностей рассеяния для ПОФХ и ДОФХ ориентированных бислоев (рис.5), полученных при влажностях близких к 100% с

помощью дифракции рентгеновских лучей, показало, что структуры гидрофобных углеводородных областей этих липидов близки, тогда как электронные плотности рассеяния гидрофильных областей бислоя существенно отличаются за счет изменения конформации полярных голов и их различной гидратации. При этом предельные площади ПОФХ и ДОФХ липидных молекул в бислое достигают 61.6Å^2 и 60Å^2 на одну молекулу липида при 100% влажности, соответственно.

Для определения параметров бислоев в избытке воды таких как предельное значение площади, толщины бислоя, размеров гидрофильной и гидрофобной областей и количество воды в гидрофильной области липидов были проведены эксперименты на липидных везикулах с помощью малоуглового рассеяния нейтронов. Модель для расчета теоретической интенсивности рассеяния от

одиночных бислоевых везикул базировалась на схеме рассеяния от трехслойной сферической оболочки. Первый слой в этой модели включает в себя гидрофильную область внешнего липидного монослоя, второй состоит из гидрофобной области двух монослоев, третий – из полярной области внутреннего монослоя. Проникновение воды в гидрофильную область бислоя

учитывалось с помощью линейной функции. Результаты моделирования приведены на рис.6.

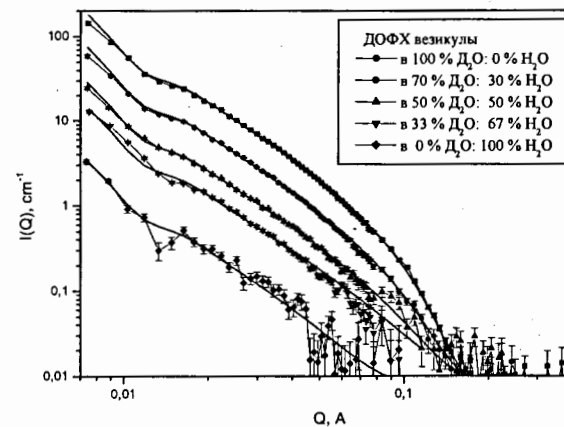


Рисунок 6. Кривые малоуглового рассеяния нейтронов от везикул из ДОФХ в пяти контрастах D_2O/H_2O с их модельными представлениями.

Было получено, что гидрофобные толщины для мембран всех трех липидов одинаковы и составляют порядка 23Å . Тогда как толщины гидрофильных

областей монослоев различны и составляют: для ДПФХ и ДОФХ 11Å и для ПОФХ- 13Å . Соответственно, количество молекул воды, находящейся внутри полярной области липида, составляют: для ДПФХ-5, для ДОФХ-7 и для ПОФХ-11. Площадь, приходящаяся на одну липидную молекулу в липидном бислое, равна 62Å^2 , 63Å^2 и 66Å^2 для ДПФХ, ПОФХ и ДОФХ липидов, соответственно. Более подробно структурные данные представлены в табл.1.

Таблица 1. Структурные параметры одиночных мембран из ДОФХ, ПОФХ (измерены при 25°C) и ДПФХ (измерены при 50°C) липидов. T_h и T_c - толщины гидрофильной и гидрофобной областей бислоя, T - толщина бислоя, соответственно. A и N_w - площадь и число молекул воды приходящихся на одну липидную молекулу.

Липид	$T_h, \text{Å}$	$T_c, \text{Å}$	$T, \text{Å}$	$A, \text{Å}^2$	N_w	χ^2
ДОФХ	11.1 ± 0.2	23.6 ± 0.4	45.8 ± 0.5	66.0 ± 2	7 ± 0.5	3.5
ПОФХ	13.3 ± 0.2	23.3 ± 0.4	50.0 ± 0.5	63.0 ± 2	11 ± 0.5	2.3
ДПФХ	10.7 ± 0.2	22.8 ± 0.4	44.2 ± 0.5	62.0 ± 1	5 ± 0.5	6

Таким образом, выявлена зависимость структурных параметров бислоя, сформированных из липидов, имеющих одну и ту же полярную голову, но отличающихся в гидрофобной области по наличию или отсутствию двойных связей ($CH=CH$) в углеводородных цепях. Показано, что конформации полярных голов для ДОФХ и ДПФХ бислоев одинаковы, тогда как для ПОФХ

бислоя полярная область больше на 2Å , по-видимому, за счет изменения конформации полярной головы, что и влияет на увеличение количества воды в мембране. Это соответствует увеличению угла наклона полярного фрагмента к плоскости бислоя. Различие в содержании воды в бислоях из ДПФХ (5 молекул) и ДОФХ (7 молекул) при одинаковой конформации голов объясняется разной площадью, приходящей на одну липидную молекулу, для ДПФХ (62Å^2) и ДОФХ (66Å^2).

Основные результаты четвертой главы.

1) Использование ориентированных липидных мультислоев, зажатых между стеклами, в качестве образцов для снятия адсорбционных изотерм в водяных парах, позволило существенно уменьшить количество воды, находящееся вне липосомного пространства (в дефектах), избежать конденсации паров воды, и как следствие, достоверно измерить количество молекул воды, связанной с полярной головой липидной молекулы. Это 16 молекул воды для ПОФХ и 11 молекул воды для ДОФХ липидов. Полученные результаты находятся в прекрасном соответствии с данными ЯМР исследований по изменению конформации головы липида в зависимости от количества воды, добавляемой к липидным мультислоям [4, 5].

2) Использование дифракции рентгеновских лучей на ориентированных мультислоях в парах воды позволило определить структурные параметры ПОФХ и ДОФХ бислоев с высоким разрешением. Показано, что гидрофобные области бислоев этих липидов совпадают, тогда как конформации полярных голов существенно различаются.

3) Структурные параметры мембран, сформированных из липидов, имеющих разную степень ненасыщенности углеводородных цепей (ДПФХ -0, ПОФХ -1 и ДОФХ -2) в избытке воды были определены с помощью малоуглового рассеяния нейтронов. Показано, что толщины гидрофобных областей бислоев указанных липидов одинаковы и составляют 23Å , тогда как гидрофильные области сильно отличаются и составляют 11Å для ДОФХ и ДПФХ и 13Å для ПОФХ бислоев. Установлено, что предельные значения площадей липидов в избытке воды (62Å^2 , 63Å^2 и 66Å^2) и количество молекул воды (5, 11 и 7), находящейся в гидрофильной области ДПФХ, ПОФХ и ДОФХ липидов, соответственно.

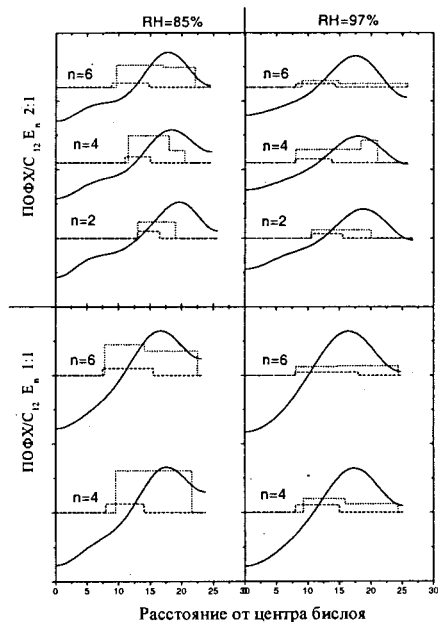
В результате исследования влияния зависимости параметров липидных бислоев, сформированных из фосфолипидов с разной степенью ненасыщенности углеводородных цепей, было также установлено, что существует немонотонная зависимость гидратации от числа двойных связей: минимальной гидратированностью обладают мембраны, состоящие из липидов с насыщенными углеводородными остатками, более гидратированы бислои, сформированные из липидов, обладающих по одной двойной связи в каждой углеводородной цепи и, наконец, наибольшей степенью гидратации обладают бислои, состоящие из липидов, включающих в себя одну жирную кислоту с

двойной связью в положении *sn*-2. Именно, липиды с таким строением составляют основу природных мембран. Таким образом, можно заключить, строение гидрофобного фрагмента природных фосфолипидов таково, что оно обеспечивает максимальную гидратацию поверхности бислоев.

Пятая глава включает в себя сравнительное изучение влияния на структуру липидного бислоя неионных сурфактантов: (IX) додециловых эфиров полиэтиленгликоля $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$ ($C_{12}E_n$, $n=2,4$ и 6) и (X) N-додецил-N,N-диметиламина $C_{12}H_{25}N(CH_3)_2O$ (ДДАО), а также, неполярного соединения (углеводорода) (XI) декана $C_{10}H_{22}$. В первую очередь было обращено внимание на влияние добавок на степень гидратации бислоя и изменение толщины бислоя.

Наиболее полно (с помощью дифракции нейтронов и рентгеновских лучей, малоуглового рассеяния нейтронов и адсорбционных изотерм) были изучены смеси ПОФХ/ $C_{12}E_n$ ($n=2,4$ и 6). Эксперименты по адсорбции воды модифицированными смесями показали, что для смешанных липид/сурфактант систем при молярных отношениях 2:1 общая гидратация равна аддитивной сумме собственных гидратаций липида (16 молекул воды) и сурфактанта (1 молекула воды на OCH_2CH_2 группу), при соотношении же 1:1 аддитивность сохраняется лишь до $n=4$ гидрофильных звеньев сурфактанта. При $n=6$ и 8 гидратация системы увеличивается нелинейным образом, так для $n=6$ гидратация становится равной 27 молекул воды вместо аддитивной суммы равной 22 молекул воды и для $n=8$ равна 33 молекулам H_2O вместо 24.

Для понимания механизма гидратации модифицированных липидных мультислоев, а также для определения структурных параметров бислоя и расположения в нем сурфактантов, были проведены эксперименты с помощью дифракции нейтронов и рентгеновских лучей, для ориентированных образцов в парах воды при 85% и 97% влажностях, и малоугловое рассеяние нейтронов на одиночных униламеллярных везикулах в избытке воды. В случае рассеяния нейтронов использовались дополнительно сурфактанты с частично дейтерированными сегментами (OCD_2CD_2)_n и CD_2 (группа, соединяющая полярную голову с углеводородным хвостом). При последующей обработке результатов измерений рассеяния от дейтерированной метки нами было предложено использовать модельные ступенчатые функции. Для метки CD_2 использовалась одноступенчатая функция, тогда как для (CD_2CD_2O)_n – двухступенчатая. Это позволило учесть все возможные конформации подвижной полярной головы сурфактанта. Нейтронные модельные распределения дейтерированных сегментов в виде ступенчатых функций представлены на рис. 7. совместно с электронными плотностями модифицированного монослоя, полученными с помощью рентгеновской дифракции. Было показано, что при малой влажности (RH=85%) полярная область сурфактанта (дейтерированный сегмент) находится внутри бислоя и



при повышении гидратации (RH=97%) вытягивается в гидрофильную область бислоя.

Рисунок 7. Ступенчатые функции нейтронной плотности рассеяния для дейтерированных меток сурфактанта CD_2 (---) и $(CD_2CD_2O)_n$ (....) и экспериментально полученная электронная плотность липидного бислоя, модифицированного сурфактантом (—), максимумы на кривой соответствуют PO_4 группе липида, минимум – центру бислоя.

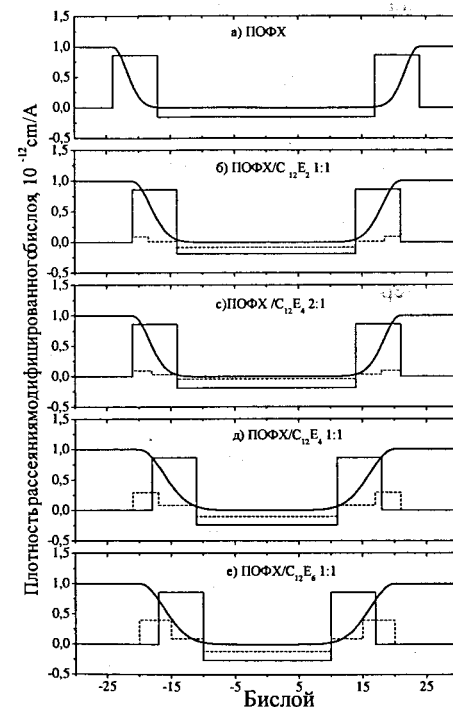
На рис.7. показаны плотности рассеяния для двух влажностей (RH=85 и 97%) и молярных отношений липид/сурфактант, равным: 2:1 и 1:1. Площадь под ступенчатой функцией соответствует интенсивности рассеяния от дейтерированной метки, границы ступенчатой функции показывают

пределы в которых находится дейтерированный сегмент. В работе мы столкнулись с неожиданным эффектом - исчезновением интенсивности дейтерированной метки. Теоретически, площадь под ступенчатой функцией должна быть пропорциональна количеству атомов дейтерия в дейтерированном сегменте, однако, проведенные эксперименты показали, что как при повышении гидратации так и при увеличении числа гидрофильных звеньев сурфактанта часть интегральной интенсивности от дейтерированной метки теряется. Потерю интенсивности удалось объяснить в терминах нарушений структуры мультислоев 1-го (дальний порядок) и 2-го рода (ближний порядок). Нарушения первого рода означают, что дальний порядок между бислоями сохраняется, слои можно уложить в идеальную бесконечную одномерную структуру, толщины водной прослойки между бислоями и толщины бислоев флуктуируют возле их средних значений. При нарушениях второго рода средние значения периода повторяемости липидных мультислоев также сохраняются, однако корреляции между бислоями существенно падают с увеличением флуктуаций. Поэтому, толщины водной прослойки между бислоями и толщины бислоев могут существенно отличаться от слоя к слою с увеличением содержания воды. Такое нарушение порядка в упаковке мультислоев приводит к потерям интенсивности в брэгговских пиках (часть интенсивности уходит в диффузную подложку) и, как результат, не позволяет определить детали структуры липидного бислоя.

При обычном подходе к анализу нейтронных данных это приводит к потерям интенсивности от дейтерированных меток.

Для того, чтобы избежать таких нежелательных эффектов, возникающих при нарушениях в упаковке бислоев в мультислоюную структуру, были изучены структуры одиночных липидных везикул с помощью малоуглового рассеяния нейтронов. Целью малоугловых экспериментов было определение удельных объемов смесей, положение сурфактантных молекул в липидном бислое и степень гидрофильности мембран в избытке воды. Для получения детальной структуры бислоя была проведена вариация контраста путем измерения везикул в различных растворах H_2O/D_2O и с использованием частично дейтерированных сурфактантов $C_{12}H_{25}(OCD_2CD_2)_nOH$ ($n=2,4$ и 6). Анализ кривых рассеяния проводился с использованием приближения Кратки-Порода и моделирования нейтронной плотности мембран с помощью ступенчатых функций.

Общей для липида и сурфактанта бралась граница гидрофобной области. Проникновение воды в бислою учитывалось гауссовским распределением в гидрофильной области бислоя (рис.8.). Были получены структурные параметры $ПОФХ/C_{12}E_n$ систем: толщина бислоя, размеры гидрофильных и гидрофобных участков мембран; площадь на одну структурную единицу, парциальный удельный объем и количество воды в гидрофильной области мембраны. Из рис.

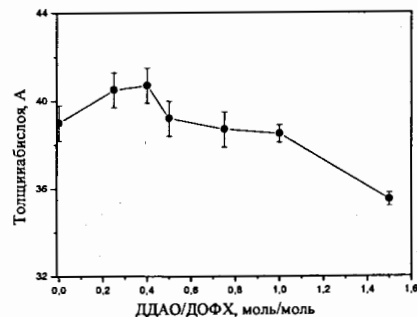


8. можно увидеть, что толщина гидрофобной области бислоя уменьшается по мере увеличения концентрации сурфактанта и длины его гидрофильной головы. Для $ПОФХ/C_{12}E_2$ 1:1 и $ПОФХ/C_{12}E_4$ 2:1 головы сурфактанта находятся в полярной области липида, при увеличении концентрации сурфактанта $ПОФХ/C_{12}E_4$ 1:1 и увеличении длины гидрофильной области $ПОФХ/C_{12}E_6$ 1:1 часть его подвижных гидрофильных групп ($O-CH_2CH_2$) выходит из бислоя и находится в воде, при этом увеличивается проникновение воды в мембрану, и уменьшается ее гидрофобная область.

Рисунок 8. Модели нейтронных плотностей модифицированного бислоя $ПОФХ/C_{12}E_n$: $ПОФХ$ (—), $C_{12}E_n$ (----) и распределение воды в бислое (—).

Другими объектами исследований, проведенных с помощью малоуглового рассеяния нейтронов на одиночных бислоиных везикулах, были липидные бислои из ДОФХ, модифицированные неионным сурфактантом с гидрофильным фрагментом небольшого размера (X) $C_{12}H_{23}N(CH_3)_2O$ (ДДАО) и полностью гидрофобной молекулой (XI) $C_{10}H_{22}$ (декан). Действие этого класса веществ подробно изучалось на активность $Ca^{++}/ATФазы$, встроенной в бислой. Наблюдаемые изменения активности можно связать с прямым действием ДДАО и декана на фермент или как следствие изменения структуры бислоя. Мы изучили влияние этих добавок на структуру бислоя и показали, что толщина бислоя остается практически неизменной при тех концентрациях сурфактантов (1:1), когда уже изменяется активность фермента.

Анализ кривых рассеяния был проведен с помощью Кратки-Порода приближения без учета проникновения воды в гидрофильную область мембран. Исследовалось изменение толщины липидного бислоя в зависимости от концентрации детергентов в мембране. Было показано (рис.9), что бислоиная структура двухкомпонентной смеси ДДАО/ДОФХ сохраняется до молярных концентраций равных 1.5:1. При концентрациях от 1.5:1 до 2.5:1 наблюдается переходное состояние (сосуществование двух фаз) и при концентрациях от 2.5:1 до 3.5:1 анализ кривых рассеяния указывает на присутствие в растворе цилиндрических или трубчатых структур. Для концентраций выше чем 4:1



наблюдается переход в сферические мицеллы (глобулы). Результаты вычислений толщины бислоя из малоуглового приближения Кратки-Порода приведены на рис. 9.

Рисунок 9. Изменение толщины бислоя ДОФХ в зависимости от концентрации ДДАО.

При малых концентрациях ДДАО толщина бислоя незначительно увеличивается, при дальнейшем

увеличении концентрации толщина бислоя начинает уменьшаться по сравнению с чистым липидным бислоем. Наибольшие изменения толщины бислоя (уменьшение на 4Å) наблюдаются на границе перехода в неламинарную фазу. Эти изменения толщины бислоя ДОФХ под влиянием ДДАО и переход в смешанные мицеллы хорошо коррелируют с изменениями активности $Ca^{++}/ATФазы$ в саркоплазматическом ретикулуме [Karlovská, Devinsky, Lasco, Hammel, Bavgay, готовится к печати].

Поведение декан/ДОФХ смесей (рис.10) показывает прямо противоположную тенденцию – увеличение толщины бислоя при возрастании концентрации декана. Показано, что до концентраций декан/ДОФХ 0.5:1

(моль/моль) толщина бислоя не меняется, при дальнейшем увеличении концентрации декана толщина начинает медленно расти, достигая увеличения толщины бислоя $2.4\pm 1.3\text{Å}$ при молярном отношении декан/ДОФХ 1.2:1 и $9.6\pm 1.3\text{Å}$ при молярном отношении декан/ДОФХ 5:1 по сравнению с чистым ДОФХ бислоем. Увеличение толщины бислоя могут быть объяснены следующим образом. При малых концентрациях декан расположен вдоль ацильных цепей липида, подобно длинноцепочечным алканам, при более высоких концентрациях декан переходит в центр бислоя между противоположными монослоями.

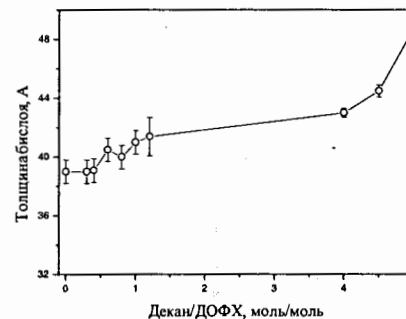


Рисунок 10. Изменение толщины бислоя ДОФХ в зависимости от концентрации декана.

Проведенные эксперименты позволяют сделать вывод о том, что изменение толщины бислоя до концентраций декан/ДОФХ 1.2:1 относительно мало, чтобы являться основной причиной изменения активности $Ca-Mg-ATФазы$ как было предположено [6]. Однако,

это не означает, что присутствие декана в липидном бислое при этих концентрациях не изменяет свойств мембран, таких как, например, латеральная диффузия или другие динамические параметры бислоя.

В заключение было проведено сравнение изменения толщины липидного бислоя в зависимости от вида добавок: неионные сурфактанты с одинаковыми гидрофобными фрагментами $C_{12}E_n$ (большая полярная голова) и ДДАО (малый гидрофильный фрагмент) и полностью гидрофобная молекула декана. Данные по толщине бислоя при молярном соотношении 1:1 для различных добавок приведены в табл.2.

Таблица 2. Толщина бислоя из ДОФХ и, ПОФХ липидов, модифицированных детергентами $C_{12}E_n$, ДДАО и деканом при соотношении 1:1 (моль/моль).

Липид/ Детергент	ПОФХ	ПОФХ/ $C_{12}E_2$	ПОФХ/ $C_{12}E_4$	ПОФХ/ $C_{12}E_6$	ДОФХ	ДОФХ/ ДДАО	ДОФХ/ Декан
Толщина бислоя, Å	42.7	37.1	31.2	31.6	39	38.3	41

Из сравнения табличных данных можно сделать вывод, что при наличии одинаковых гидрофобных фрагментов сурфактант с большим полярным фрагментом значительно уменьшает толщину бислоя, с малой полярной головой практически не меняет ее, тогда как полностью гидрофобный декан даже увеличивает толщину бислоя.

Основные результаты пятой главы.

1) Проведено детальное исследование ПОФХ/ $C_{12}E_n$ ($n=2,4$ и 6) смесей в избытке и парах воды:

а) установлено, что гидратация модифицированного бислоя нелинейно повышается с увеличением числа $(OCH_2CH_2)_n$ гидрофильных звеньев сурфактанта, причиной этого поведения является появление нарушений второго рода в одномерной периодической структуре мультислоев;

б) определены параметры модифицированного бислоя в избытке воды. Показано, что при увеличении числа $(OCH_2CH_2)_n$ гидрофильных звеньев сурфактанта повышается гидратация и возрастает толщина полярной области бислоя при одновременном уменьшении гидрофобного слоя. При этом не существует латерального разделения компонентов ПОФХ и $C_{12}E_n$. При малом числе $(OCH_2CH_2)_n$ звеньев $n=2$ мембрана является более рыхлой чем чистый липидный бислой, при увеличении n упаковка молекул в бислое становится плотнее и при $n=6$ достигает плотности чистого липидного бислоя.

2) Проанализировано изменение толщины липидного бислоя в присутствии детергентов с разными полярными фрагментами. Показано, что толщина бислоя уменьшается в присутствии более гидрофильных сурфактантов, тогда как для полностью гидрофобного декана она увеличивается за счет его встраивания в область между противоположными монослоями бислоя.

3) Показано, что присутствие декана ($C_{10}H_{22}$) и N-додецил-N,N-диметиламина ($C_{12}H_{25}N(CH_3)_2O$) в липидных мембранах при концентрациях ниже 1:1 моль/моль незначительно меняет толщину бислоя. В этой связи предположение о том, что изменение активности Ca^{++} АТФазы является результатом изменения толщины бислоя [6] не имеет экспериментального основания.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ РАБОТЫ

1) Разработана новая методика приготовления ориентированных липидных мультислоев, позволившая точно измерить специфическое связывание воды с липидами в составе бислоя.

2) Предложены методы расчета (модели сферических оболочек и ступенчатых функций), позволяющие определять степень гидратации полярного, поверхностного слоя мембран и структурных параметров бислоя из данных малоуглового рассеяния нейтронов, полученных на образцах в избытке воды.

3) Использование новых методов позволило исследовать влияние двойных связей в ацильных остатках липидов на параметры липидного бислоя. Было установлено, что двойные связи гидрофобных фрагментов липидов специфически влияют на степень гидратации. Минимальной гидратацией обладают мембраны, состоящие из липидов с насыщенными углеводородными

остатками, большей гидратированностью отличаются бислои, сформированные из липидов, обладающих по одной двойной связи в каждой углеводородной цепи и наибольшей степенью гидратации обладают бислои, состоящие из природных липидов, включающих в себя жирную кислоту с одной двойной связью в положении *sn-2*, тогда как жирная кислота в положении *sn-1* является насыщенной. Таким образом, можно заключить, структура гидрофобных элементов природных мембран такова, что обеспечивает максимальную гидратацию поверхности бислоя.

4) Показано значительное увеличение дипольного потенциала в ацильных липидах по сравнению с алкильными. Вклад карбонильной группы *sn-1* углеводородной цепи (135mV) заметно превосходит вклад карбонильной группы в положении *sn-2* (65mV). Сделано заключение, что остаток жирной кислоты в положении *sn-1* является основным элементом гидрофобной структуры фосфолипидов, который контролирует величину дипольного потенциала мембраны. Сильное изменение дипольных потенциалов мембран (наличие или отсутствие карбонильных групп) не оказывает существенного влияния на параметры липидного бислоя и толщину водной прослойки между мультислоями.

5) Проанализировано изменение толщины липидного бислоя и гидратации поверхности мембран в присутствии малых молекул, обладающих разной гидрофильной способностью:

а) показано, что гидратация липидного бислоя, модифицированного неионным сурфактантом $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$, нелинейно повышается с увеличением гидрофильных звеньев сурфактанта, при этом возрастает толщина полярной области бислоя при одновременном уменьшении гидрофобной области мембраны и общей толщины модифицированного бислоя;

б) другие типы детергентов, как неионный сурфактант с небольшой полярной головой $C_{12}H_{25}N(CH_3)_2O$ и полностью гидрофобный декан $C_{10}H_{22}$ слабо влияют на изменение толщины бислоя при тех же концентрациях как и для $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$.

Таким образом, показано, что неионные сурфактанты типа $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$ позволяют целенаправленно повышать степень гидратации липидных бислоев до уровня гидратации природных мембран.

Материалы диссертации опубликованы в следующих работах:

1. *Anikin M.V., Gordeliy V.I., Islamov A. Kh., Chupin V.V.* 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-rac-glycero-3-phosphoholine and 1-O-hehadecyl-2-Oleoyl-rac-glycero-3-phosphoholine membranes. Structural studies using neutron diffraction. Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. 1992.. – E14-92-30
2. *G. Klose, A. Islamov, S. S. Funari, K. Bartels and T. Hauss.* Polymorphism of aqueous lipid-nonionic surfactant mixtures. BENS experimental reports 1994, p.255.
3. *G. Klose, St. Eisenblaetter, J. Galle, A. Islamov and U. Dietrich.* Hydration and Structural Properties of a Homologous Series of Nonionic Alkyl Oligo(ethylene oxide) Surfactants. (1995) *Langmuir*, 11, 2889-2892.
4. *G. Klose, A. Islamov, B. Koenig, V. Cherezov.* Structure of Mixed Multilayers of Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine and Oligo(oxyethylene glycol) Monododecyl Ether Determined by X-ray and Neutron Diffraction,(1996), *Langmuir*,12,pp.409-415
5. *D. Uhrikova, N. Kucerka, A. Islamov, V. Gordeliy and P. Balgavy.* Small-angle neutron scattering study of N-dodecyl-N, N-dimethylamine N-oxide Induced solubilization of dioleoylphosphatidylcholine bilayers in liposomes. *Gen. Physiol. Biophys.* (2001), 20, 183-189.
6. *D. Uhrikova, P. Balgavy, N. Kucerka, A. Islamov, V. Gordeliy and A. Kuklin.* Small-angle neutron scattering study of the n-decane effect on the bilayer thickness in extruded unilamellar dioleoylphosphatidylcholine liposomes. *Biophysical Chemistry* 88 (2000) 165-170.
7. *D. Uhrikova, N. Kucerka, A. Islamov, A. Kuklin, V. Gordeliy and P. Balgavy.* Small-angle neutron scattering study of the lipid bilayer thickness in unilamellar dioleoylphosphatidylcholine vesicles prepared by the cholate dilution method: n-decane effect. *Biochim. Biophys. Acta* 78411 (2003) 1-4

Цитируемая литература

1. *J. F. Nagle, S. Tristram-Nagle.* 2000. *Biochim. Biophys. Acta.* 1469, pp. 159-195.
2. *B.W. Koenig, H.H. Strey, K. Gawrish.* *Biophys. J.* 73 (1997) pp. 1954-1956.
3. *Гусев Д.Г., Аникин М.В., Аникин А.В., Василенко И.А., Серебрянникова Г.А., Евстигнеева Р.П.* Биологические мембраны. Том 3. №12. 1986. Стр.1260-1265.
4. *Bechinger, B. and Seelig, J.* (1991) *Chem. Phys. Lipids* 58, pp.1-5.
5. *A .S. Ulrich and A. Watts.* 1994. *Biophys. J.* 66, pp.1441-1449.
6. *A. Johannsson, C.A. Keightley, G.A. Smith, C.D. Richards, T.R. Hesketh, J.C. Metcalfe.* *J. Biol. Chem.* (1981) 256, pp. 1643-1650.