

Объединенный
институт
ядерных
исследований
Дубна

P14-84-862

А.М.Балагуров, В.И.Горделий, Л.С.Ягужинский*

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ СОРБЦИИ
И ДЕСОРБЦИИ H_2O И D_2O
МУЛЬТИЛАМЕЛЛЯРНЫМИ
ЛИПИДНЫМИ СТРУКТУРАМИ
НА НЕЙТРОННОМ ДИФРАКТОМЕТРЕ

Направлено в журнал "Биологические мембраны"
и на Всесоюзный семинар "Физико-химические
свойства микромолекул и методы их исследования"
/Пушино, 1985 г./

* Московский государственный университет

1984

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время возможности нейтронографии как метода исследования атомной структуры вещества широко используются в молекулярной биологии^{/1/}. Одним из главных направлений в этой области является изучение структуры воды и процессов водного и изотопного обмена в биологических объектах. Эксперименты такого типа на глобулярных и фибриллярных белках, биологических мембранах и других объектах уже выполнены на высокопоточных стационарных нейтронных реакторах^{/2/}. В наших предыдущих работах^{/3,4/} показано, что весьма перспективным является проведение подобных исследований и на мощных импульсных источниках нейтронов, таких, например, как уже действующий в ОИЯИ импульсный реактор ИБР-2^{/5/}. Более того, зачастую именно дифрактометры, работающие по методу времени пролета на импульсных источниках нейтронов, оказываются наиболее подходящими для проведения тех или иных экспериментов.

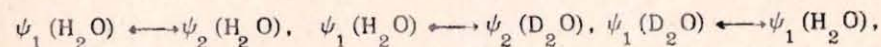
В работе^{/4/}, выполненной на ИБР-2, представлены результаты дифракционных экспериментов на мультислойной структуре из дипальмитоиллецитина (DPL) и продемонстрирована сильная зависимость интенсивности и положения дифракционных пиков от содержания и изотопного состава воды в структуре. Время накопления экспериментальных данных, необходимых для построения фурье-синтеза структуры с разрешением $\sim 10 \text{ \AA}$, не превышало двух часов при массе образца 15 мг, что примерно в 10 раз меньше, чем в аналогичных экспериментах на стационарном реакторе. Достигнутая большая скорость накопления данных позволила поставить вопрос о наблюдении кинетики процессов водного и изотопного обмена в липидных мембранах. Исследование кинетики этих процессов с помощью дифракции нейтронов представляет интерес по крайней мере с двух точек зрения. Во-первых, в дифракционном эксперименте могут быть одновременно получены данные как о скорости процесса, так и о фактических изменениях структуры объекта во времени. Во-вторых, для регистрации процессов водного обмена с характерным временем 1 мин из существующих методов наблюдения только дифракционный может оказаться достаточно быстрым^{/6/}. Уже в первых нейтронографических экспериментах по наблюдению замещения $\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{D}_2\text{O}$ в коллагене^{/8/} и миелине^{/7/}, несмотря на предварительный их характер, были получены интересные данные о скорости этих процессов. Однако дальнейшего развития исследования не получили, по-видимому, из-за недостатков, присущих традиционной схеме их постановки на стационарном ис-

точнике нейтронов. Метод времени пролета позволяет регистрировать сечение рассеяния нейтронов образцом в существенно большем интервале переданных импульсов, чем традиционный метод. Именно это обстоятельство оказывается принципиально важным при изучении кинетических и переходных процессов, особенно если восстановление исходного состояния исследуемого объекта по каким-либо причинам затруднено или невозможно. Дальнейшее развитие предложенной нами в^{/4/} методики позволило нам провести серию экспериментов по наблюдению кинетики процессов сорбции и десорбции воды, а также процессов замещения H_2O на D_2O в мультислойных структурах из DPL и яичного лецитина.

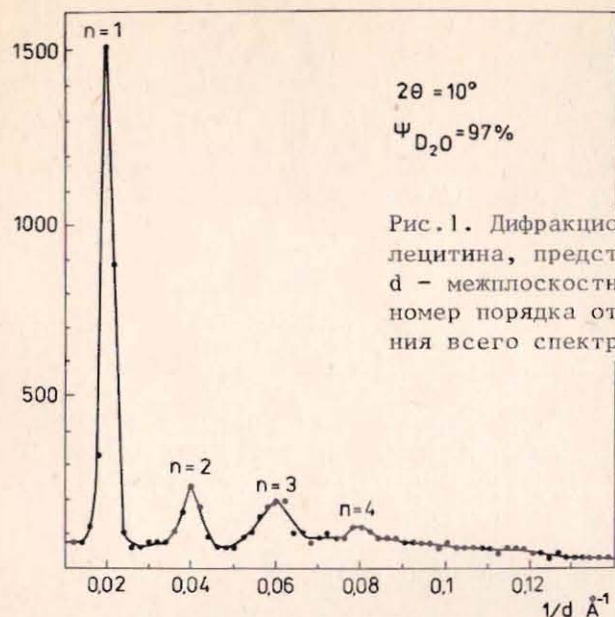
В настоящей работе приведены описание методики эксперимента и обработки данных, а также некоторые физические результаты.

1. ЭКСПЕРИМЕНТ

Способ приготовления образцов и схема проведения экспериментов были такими же, как в^{/4/}. Образцы представляли собой мультислойную структуру липида на стеклянной подложке, масса липида составляла от 5 до 15 мг, площадь $\sim 6 \text{ см}^2$. Число слоев, таким образом, было около $5 \cdot 10^3$. Эксперименты велись на дифрактометре ДН-2 с однокоординатным позиционно-чувствительным детектором^{/8/} в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ. По сравнению с предыдущими экспериментами^{/4/} в два раза увеличился полный поток нейтронов на образце /за счет увеличения мощности источника он поднялся до $1,3 \cdot 10^7 \text{ н/см}^2/\text{с}$ /, а средний угол рассеяния равнялся 10° вместо 20° . Оба эти фактора привели к увеличению интенсивности первого порядка отражения / $d = 50 \pm 60 \text{ \AA}$ / от образцов примерно в 30 раз, что позволило уменьшить время измерения всего дифракционного спектра до 80 с. Исследовалась кинетика шести процессов:



т.е. кинетика изменения состояния образца, находящегося при относительной влажности ψ_1 в парах H_2O при переходе к относительной влажности ψ_2 в парах H_2O , и кинетика обратного процесса и т.д. /последние два процесса - изотопическое замещение воды при постоянной влажности/. Состояние при $\psi_1(\text{H}_2\text{O})$ определялось относительной влажностью в помещении, составлявшей обычно $10 \pm 40\%$. Состояния при $\psi_2(\text{H}_2\text{O})$, $\psi_1(\text{D}_2\text{O})$ и $\psi_2(\text{D}_2\text{O})$ достигались при помещении образца в алюминиевый контейнер объемом $\sim 1000 \text{ см}^3$, внутри которого влажность задавалась насыщенным раствором соли соответственно в обычной или тяжелой воде. Во всех обсуждаемых ниже экспериментах влажность ψ_2 задавалась насыщенным раствором K_2SO_4 и составляла 97%. Время достижения заданной влажности не превышало 1 мин. Электроника дифрактомет-



ра позволяла в непрерывном режиме регистрировать до 16 дифракционных спектров. Затраты времени на их последующую архивизацию не превышали 2 мин. Стандартная последовательность регистрации была следующей: 16 спектров, каждый из которых измерен за 80 с; 16 спектров /160 с/ и 16 спектров /320 с/, всего 48 двумерных спектров за время 150 мин. Непрерывная регистрация начиналась через 4 мин после изменения условий на образце. Кинетика указанных выше процессов наблюдалась на двух образцах DPL: №1 с массой 10 мг, №2, полученным из №1 уменьшением площади и массы в 2 раза, и на двух образцах из яичного лецитина: №3 – массой 5 мг, и №4 – массой 10 мг. Наиболее сильными и легко наблюдаемыми в ходе всех шести процессов были изменения интенсивности первых двух порядков отражения и /в тех случаях, когда интенсивность была сравнительно большой/ их положений. Для получения массива данных, пригодных к последующей обработке, проводилось перекодирование двумерных спектров в одномерные путем сворачивания интенсивностей $I(\lambda, \theta)$ к $I(d)$ или $I(H)$, где λ , θ и d – длина волны, угол Брэгга и межплоскостное расстояние соответственно, $H = 1/d$ с учетом закона Брэгга. Один из таких спектров, измеренный за 80 с, представлен на рис. 1. Из одномерных спектров с помощью специальных программ для обработки пиков сложной формы^{/9/} определялись интенсивности, положения и ширины дифракционных пиков. Метод обработки основан на аппроксимации профилей пика и фона модельными функциями, в качестве которых берутся экспериментально измеренные гистограммы. В применении к спект-

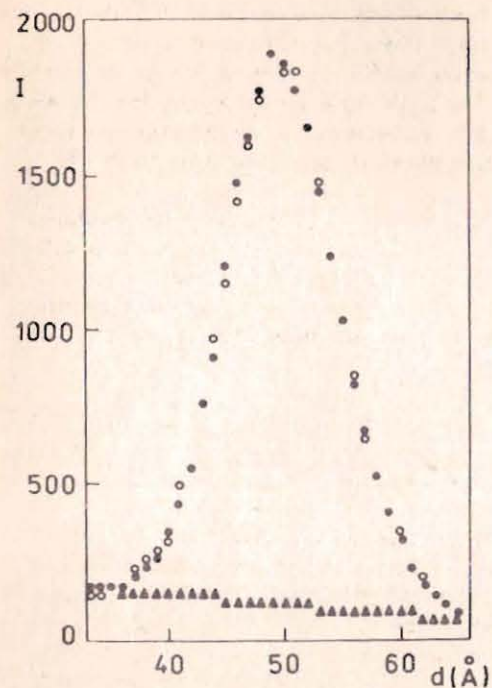
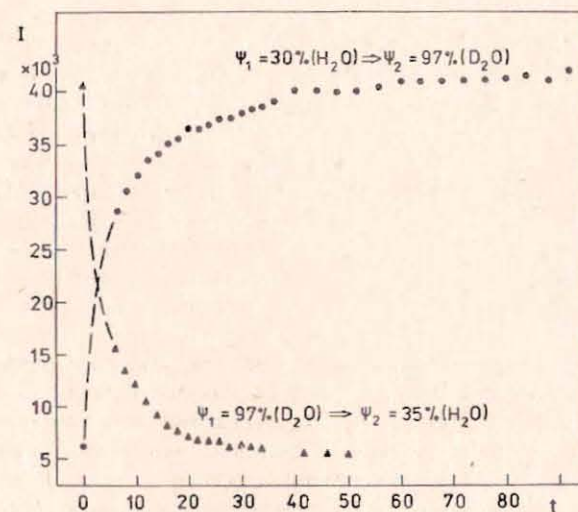


Рис. 2. Участок дифракционного спектра, содержащий экспериментальные точки (o), значения аппроксимирующей функции (●) и фон (▲).

Рис. 3. Зависимость модуля структурного фактора 1-го порядка отражения образца №4 от времени для процессов сорбции и десорбции D_2O /время в минутах/.



рам, измеренным на дифрактометре по времени пролета, этот метод дает существенно более высокую точность определения основных параметров дифракционных пиков, чем обычно применяемые ме-

тоды описания профиля пика параметрической функцией^{/10/}. На рис.2 в качестве примера обработки пика представлен участок спектра от образца №4, измеренного за 80 с, через 5 мин после начала изотопного обмена H₂O на D₂O при относительной влажности $\psi_1 = 33\%$. На рис.3 показана зависимость интегральной интенсивности первого порядка отражения от времени для того же образца.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полный структурный фактор бислоя можно представить в виде суммы

$$F_T = F_L + F_w, \quad /1/$$

где F_L и F_w - структурные факторы липидной и водной частей бислоя.

Можно ожидать, что по крайней мере в первом приближении изменение количества воды в бислое происходит только в пространстве между неполярными частями липида^{/11/}. В этом случае F_L практически не меняется на протяжении всего процесса сорбции /десорбции/, а $F_w = a \cdot m_w$, где a - константа, m_w - количество воды в бислое.

Предполагая экспоненциальную зависимость изменения m_w от времени, получаем

$$m_w(t) = m_{w2} + (m_{w1} - m_{w2}) e^{-k_c t}, \quad /2/$$

где m_{w1} и m_{w2} соответствуют $t = 0$ /началу процесса/ и $t = \infty$ /насыщение/, k_c - константа скорости процесса. Для структурного фактора при этих предположениях получаем аналогичную /2/ зависимость

$$F_T(t) = F_\infty + F_1 e^{-k_{c1} t}, \quad /3/$$

где F_1 и F_∞ - некоторые константы, причем F_∞ соответствует значению структурного фактора дифракционного пика после завершения кинетического процесса. Из /3/ следует, что величина $\ln|F_T(t) - F_\infty|$ является линейной функцией времени с наклоном, определяемым константой k_{c1} . При отсутствии эффектов экстинкции, что для наших образцов хорошо выполняется, справедливо $F_T \sim \int I$, где I - интегральная интенсивность дифракционного пика. Толщина бислоя, также как F_w , является линейной функцией количества адсорбированной воды^{/11/}, поэтому для зависимости d от времени справедлива формула типа /3/.

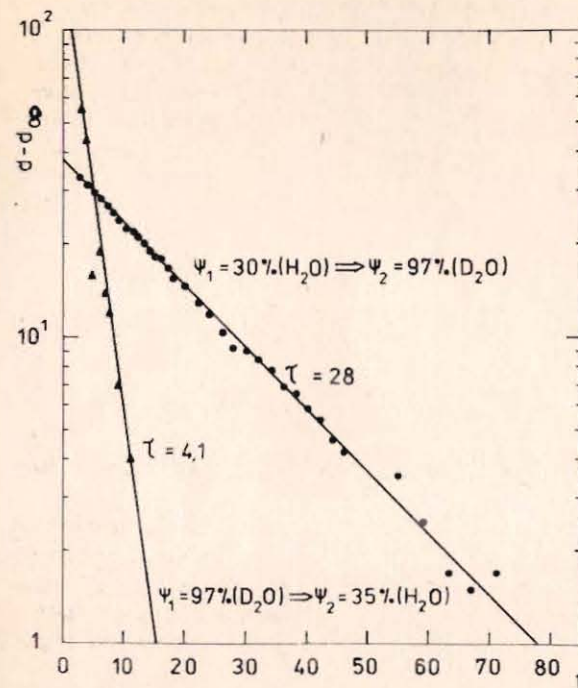


Рис.4. Зависимость $\ln|F_T(t) - F_\infty|$ от времени. Шкала времени и константы процессов в мин.

На рис.4,5 и 6 представлены экспериментальные точки и аппроксимирующие их кривые для яичного лецитина /образец №4/ при проведении процессов 30% (H₂O) + 97% (D₂O) и 97% (D₂O) + 35% (H₂O).

Из зависимости $\ln|d(t) - d_\infty|$ от времени /рис.4/ видно, что изменение толщины бислоя действительно хорошо описывается уравнением типа /3/ с $\tau_c = 1/k_c = 28$ мин для процесса сорбции D₂O и $\tau_c = 4,1$ мин для процесса десорбции. Однако в зависимостях $\ln|F_T(t) - F_\infty|$ от времени /рис.5,6/ четко выявляется наличие по крайней мере двух временных постоянных для обоих процессов: $\tau_1 = 3,3$ мин и $\tau_1 = 21$ мин для сорбции, и $\tau_1 = 3,5$ мин и $\tau_1 = 9$ мин для десорбции D₂O соответственно. Эти времена получаются, если в уравнение /3/ добавить еще один экспоненциальный член, т.е. описывать зависимость от времени полного структурного фактора выражением

$$F_T(t) = F_\infty + F_1 e^{-k_{c1} t} + F_2 e^{-k_{c2} t}. \quad /4/$$

Если $k_{c1} \gg k_{c2}$, то при $t \gg 1/k_{c1}$ функция $\ln|F_T(t) - F_\infty|$ будет линейной с наклоном, определяемым величиной k_{c2} , а при $t \approx 1/k_{c1}$ линейной будет функция $\ln|F_T(t) - F_\infty - F_2 e^{-k_{c2} t}|$, наклон которой определяется величиной k_{c1} . Прямые, проведенные на рис.5 и 6,

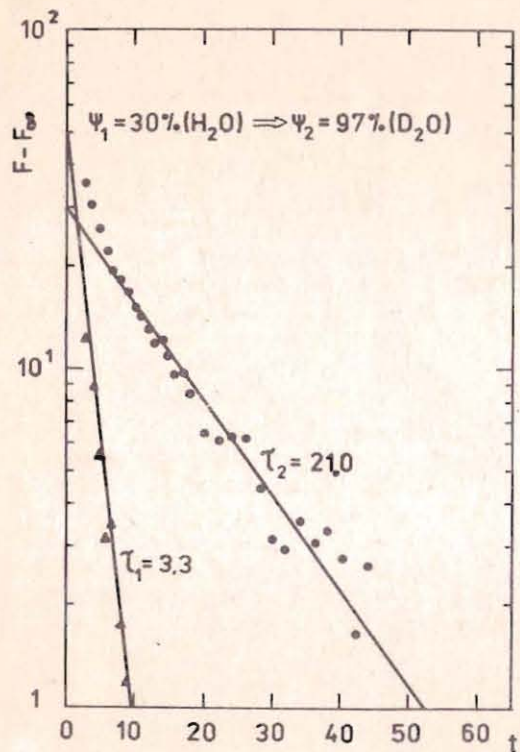


Рис.5. Зависимость $\ln|F_T(t) - F_\infty|$ / точки / и $\ln|F_T(t) - F_\infty - F_1 e^{-k_{c1}t}|$ /треугольники/ от времени для процесса сорбции D_2O . Шкала времени и константы процессов в мин.

и соответствуют этим двум вариантам описания экспериментальных точек. Результаты, аналогичные представленным на рис.5 и 6 зависимостям, получены и для остальных образцов с точностью до числа экспоненциальных членов и величины констант k_{c1} . Рассмотрение измеренных зависимостей $F_T(t)$ и $d(t)$ показывает следующее. Все процессы имеют очень быструю начальную фазу с характерным временем ≤ 1 мин, точное значение которого в наших экспериментах не определялось.

Процессы сорбции и десорбции H_2O , не считая начальной фазы, хорошо описываются уравнением /3/ с $\tau_c \approx 7 \div 15$ мин. Более сложные явления происходят при процессах $\psi_1(H_2O) \rightarrow \psi_2(D_2O)$, которые характеризуются еще одной /или даже двумя/ дополнительными постоянными времени: τ_1 составляет несколько минут, τ_2 меняется от 10 мин до нескольких десятков минут.

Если предположить, что постоянные времени в таком эксперименте определяются диффузией воды в мультислоях, то следует ожидать величину коэффициента диффузии D порядка $10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}^{1/2}$. Решение уравнения диффузии воды в мультислоях при заданных в эксперименте граничных условиях и в рамках сделанного выше предположения дает уравнение, аналогичное уравнению /2/ с

$$k_c = D(\pi/2L)^2, \quad /5/$$

где L - общая толщина мультислоев. Подставляя в /4/ экспериментальные значения k_c и L , находим $D \sim 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$. Следовательно, постоянные времена τ_1, τ_2 не определяются значением коэффициента самодиффузии воды в мультислоях. Этот вывод подтверждается также тем, что для образцов разной толщины /5 и 10 мг липида наносились на подложки одинаковой площади/ наблюдаются

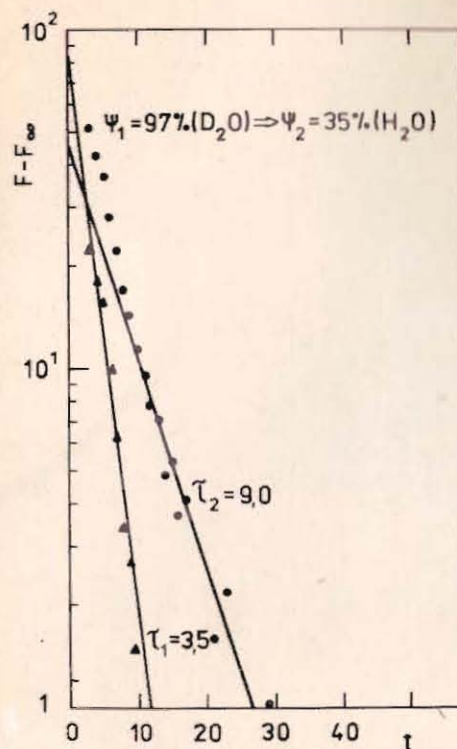


Рис.6. То же, что на рис.5, для процесса десорбции D_2O .

одинаковые постоянные времена. Не изменяются постоянные времена и при изменении размеров подложки /при одинаковой толщине мультислоев/.

Процесс гидратации мультислоев включает в себя по крайней мере две кинетические стадии: перенос воды через гидрофобные барьеры би-слоев и перестройку структуры в области полярных голов липидов. Проведенный выше анализ показывает, что первая стадия не ограничивает скорость процесса в целом. Это говорит в пользу того, что перестройки структуры в области полярных голов липидов определяют скорости процессов сорбции и десорбции воды на мультислоях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная в настоящей работе методика изучения процессов сорбции и десорбции воды и изотопного обмена в мультимеллярных липидных мембранах позволила определить их времена и выявить существование нескольких фаз, различающихся по скорости протекания, находящихся в интервале от нескольких минут до нескольких десятков минут. Показано, что эти процессы хорошо описываются уравнениями типа /3/.

Большой интерес представляет измерение характерного времени быстрой фазы, что в принципе осуществимо.

Представляет также интерес анализ вариации постоянных времени исследованных процессов и их зависимости от ψ_1 и ψ_2 .

Возможно, что, измеряя кинетические коэффициенты k_c в зависимости от времени, удастся определить энергию активации процессов сорбции и десорбции как для H_2O , так и для D_2O .

Авторы выражают свою признательность Ю.М.Останевичу за интерес к работе и полезные обсуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Останевич Ю.М., Сердюк И.Н. УФН, 1982, 137, с.85.
2. Schoenborn V.P. Brookhaven Symp.Biol., 1975, vol.27, p.1-10.
3. Balagurov A.M. et al. Acta Cryst., 1979, A35, p.131.
4. Балагуров А.М., Горделий В.И. В сб.: Краткие сообщения ОИЯИ, №1-84, Дубна, 1984, с.23.
5. Frank I.M., Pacher P. Physica, 1983, 120B, p.37.
6. Miller A. et al. Brookhaven Symp.Biol., 1975, vol.27, p.III-86.
7. Kirschner D.A. et al. Brookhaven Symp.Biol., 1975, p.III-68.
8. Балагуров А.М. и др. ОИЯИ, 3-84-291, Дубна, 1984.
9. Zlokazov V.B. Compt.Phys.Comm., 1978, 13, p.389.
10. Balagurov A.M. et al. Prace Fizyczne, 1981, 18, p.23.
11. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. "Наука", М., 1981, с.95.
12. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. "Наука", М., 1981, с.84.

Рукопись поступила в издательский отдел
28 декабря 1984 года.

Балагуров А.М., Горделий В.И., Ягузинский Л.С. P14-84-862
Исследование кинетики сорбции и десорбции H_2O и D_2O
мультиламеллярными липидными структурами
на нейтронном дифрактометре

На нейтронном дифрактометре проведены эксперименты по наблюдению кинетики сорбции и десорбции воды и процессов замещения H_2O на D_2O в липидных мультислоях из дипальмитоил-лецитина и яичного лецитина. Эксперименты заключались в измерении зависимости от времени интенсивностей дифракционных пиков и периода структуры после смены условий на образце. Минимальное время регистрации данных составляло 80 с. Обнаружено, что все исследованные процессы имеют быструю фазу с характерным временем $\tau_0 < 1$ мин и одну или две медленных фазы с τ_0 , равным нескольким минутам и нескольким десяткам минут.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Перевод Т.Ф.Дроздовой

Balagurov A.M., V.I.Gordelij, L.S.Yaguzhinsky P14-84-862
Study of Kinetics of Sorption and Desorption of H_2O
and D_2O by Multilamellar Lipid Structures
with Neutron Diffractometer

The kinetics of sorption and desorption of water and that of the exchange of H_2O and D_2O in lipid multilayers from dipalmitoyl lecithin and egg lecithin were observed with the neutron diffractometer. In the experiment one was to measure the dependence on sample conditions of diffraction peak intensity and of structural period. Minimal time of data acquisition was 80 s. It was found out that all the processes have a fast phase with the characteristic time $\tau_0 < 1$ min and one or two slow phases with τ_0 of several minutes or of several dozens minutes.

The investigation has been performed at the Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research, Dubna 1984