

**ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

P14-86-395

В.Ю.Беззаботнов, Ш.Борбей, С.Брюкнер*, Г.Клозе*,
Ю.М.Останевич

**ГИДРАТАЦИЯ И НАБУХАНИЕ
ЛИПИДНОЙ ФРАКЦИИ ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА
И ВЛИЯНИЕ
МОДИФИЦИРУЮЩИХ АМФИФИЛЬНЫХ ДОБАВОК**

(Исследования с помощью малоуглового рассеяния
нейтронов)

Направлено в "Chemistry and Physics of Lipids"

* Университет им. Карла Маркса, Лейпциг, ГДР

- 1986

I. Введение

Гидратация и набухание являются фундаментальными свойствами систем липид - вода /1/. Например, экспериментально показано, что гидратация сильно влияет на упаковку и динамику липидов, на их фазовые состояния и фазовые переходы, на толщину мембран, на взаимодействие мембран с другими веществами, в т.ч. лекарствами, на слияние мембран, на морфологию системы липид - вода и т.д. С другой стороны, набухание зависит от сил, действующих между мембранами, упругих свойств мембран и напряженности мембран в ламеллярной фазе и в мультиламеллярных липосомах (везикулах).

За последние два десятилетия в этой области выполнен ряд исследований на лецитинах яичного желтка /2,3,4,5,6/ и на нескольких синтетических липидах /4,7,8,9,10;11/. В общих чертах понятно, что гидратация зависит, в основном, от структуры головной группы липида и ее электрического заряда /5/. Однако значения гидратационной способности, найденные для разных липидов, разбросаны в очень широком диапазоне (см., напр., /12,13/). Общепринято считать, что незаряженные (изоэлектрические) липиды либо не обнаруживают набухания, либо набухают в ограниченной мере, тогда как заряженные липиды набухают без ограничений /14/. Тем не менее, в этом отношении результаты различных экспериментов противоречивы, и остается много открытых вопросов. Например, в /15/ для лецитина яичного желтка найдено неограниченное набухание, что противоречит данным других авторов.

В литературе имеется очень мало данных по максимальному набуханию /3,4,7,14/, что связано с использованием сравнительно узкого диапазона концентраций воды. Кроме того, не проводилось исследований полной липидной фракции, которая больше соответствует реальным биологическим мембранам. Первое исследование этого объекта опубликовано совсем недавно /12/.

Исследования, посвященные влиянию включенных в мембрану добавок на гидратацию и набухание, находятся в начальной стадии. Вместе с тем, можно надеяться, что именно с помощью систематического и контролируемого изменения свойств мембран с помощью специальных добавок удастся получить экспериментальную информацию о различных силах, действующих между мембранами. В частности, в мембрану можно включать молекулы, изменяющие плотность электрических зарядов (или диполей) на поверхности мембраны, или молекулы, которые, помимо модификации поверхности мембраны, позволяют контролировать свойства воды вблизи поверхности. Данная работа является попыткой изучения этих возможностей. Для этой цели в мембраны включались добавки: диэтиловый

эфир гексилфосфоновой кислоты (PAE₆) и неионный ρ -нонил-фенол-(этиленоксид)₉ (EO-9). Ранее эти системы изучались с помощью ЯМР /12,16/.

Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей или нейтронов является наиболее прямым методом исследования структуры липидных систем в процессе набухания. При этих исследованиях некоторые сведения получаются и о процессах гидратации, приводящих к изменению толщины липидного слоя и других характеристик. Кроме того, применение дейтерированных добавок и нейтронного излучения позволяет локализовать положение этих добавок в мультислойной структуре, что делает весь последующий анализ существенно более обоснованным. Данная работа является первым шагом в этом направлении, и в некоторой мере ее следует рассматривать как отправную точку для дальнейших исследований.

2. Материалы и методы

Полная липидная фракция яичного желтка (далее PL) извлекалась по методу /17/, ее состав проверялся с помощью ³¹P ЯМР и тонкослойной жидкостной хроматографии (пластины HPTLC, Мерк). Молярное отношение фосфатидилхолин:фосфатидилэтанолламин составляло 3,2:1. Содержание сфингомиелина, фосфатидилинозитола, лизофосфатидилхолина, лизофосфатидилэтанолламина и нейтральных липидов в сумме составляло около 5 мол.%. Имеющийся экспериментальный опыт указывает на предпочтительность полной липидной фракции по сравнению с фракцией лецитинов, так как первая обладает лучшей долговременной стабильностью и повторяемостью.

ρ -Нонилфенол (этиленоксид)₉ со средней длиной полиэтиленоксидной цепи 9 звеньев (далее EO-9) был синтезирован из очищенного промышленного ρ -нонилфенола (др. В.Герхард, ЦИОХ, Берлин).

ρ -Нонилфенол является смесью сильно разветвленных изомеров. Диэтиловый эфир гексилфосфоновой кислоты (PAE₆) был синтезирован в Техническом университете (Дрезден, лаб. проф. Гросманна). ²H₂O получен от Изокомерц (Берлин) и содержал 99,8% ²H.

PL высушивался в эксикаторе над CaCl₂ при давлении 1 Pa и комнатной температуре в течение 12 часов. Требуемые количества PL и других компонентов отмерялись взвешиванием и помещались в стеклянные ампулы, которые затем заполнялись инертной атмосферой (азот) и отпаивались. Средний молекулярный вес PL принимался рав-

ным м.в. яичного лецитина (EYL) - 768 /3/. Ампулы после заполнения хранились в течение 2-х недель при 5°C. Непосредственно перед измерением рассеяния нейтронов ампулы вскрывались, и PL переносился в кюветы, состоящие из двух кварцевых пластинок и разделяющего их кольца толщиной 1 мм. Кювета, содержащая 10-20 мг исследуемого материала, уплотнялась нейтральной смазкой и парафином.

Измерения рассеяния нейтронов выполнялись с помощью время-пролетного спектрометра малоуглового рассеяния с аксиально-симметричной геометрией на реакторе ИБР-2 (Лаборатория нейтронной физики, ОИЯИ, Дубна) /18/. Пучок нейтронов на образце коллимировался до диаметра 15 мм. Средний поток тепловых нейтронов на образце составлял 3,2 · 10⁷ см⁻² · с⁻¹. Расстояние образец - детектор составляло 4,47 м, что позволяло наблюдать интервал векторов рассеяния

$q = 4\pi/\lambda \cdot \sin \vartheta/2$ (ϑ - угол рассеяния, λ - длина волны нейтронов) от 0,3 до 6,0 нм⁻¹. Некоторые измерения были выполнены при расстоянии до детектора 12,22 м, что позволило опустить нижнюю границу q примерно до 0,1 нм⁻¹. В качестве стандартного рассеивателя, используемого для нормировки измеренной интенсивности, использовался металлический ванадий.

3. Анализ экспериментальных данных

После внесения необходимых коррекций (поправка на мертвое время, вычитание фона, нормировка на стандартный рассеиватель) экспериментальные данные представлялись в виде зависимости $I(q)$. В общем случае эта зависимость состояла из трех компонентов - плавного диффузного рассеяния, дифракционного пика первого порядка и некогерентного рассеяния (рис.1). В некоторых образцах наблюдался и второй порядок дифракции. Диффузный компонент и дифракционный максимум в первом приближении можно описывать с помощью гауссовых распределений, центрованных при $q_1 = 0$ /19,20/ и $q_2 = q_1$ /18/ соответственно. Некогерентное рассеяние не зависит от q и аппроксимируется константой. В этом приближении $I(q)$ аппроксимируется выражением

$$I(q) = I_{d0} \cdot \exp(-q^2/2\sigma_0^2) + I_{10} \cdot \exp(-(q-q_1)^2/2\sigma_1^2) + I_{inc}, (1)$$

которое было использовано в качестве модельной функции при описании экспериментальных данных методом наименьших квадратов. При этом

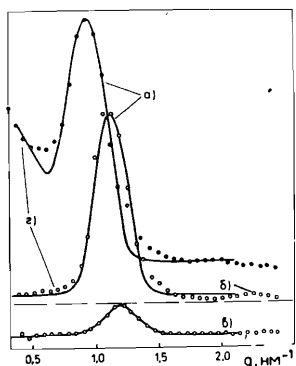


Рис. I. Зависимость интенсивности рассеяния нейтронов (произвольные единицы) от длины вектора рассеяния q в системе $(PL + {}^2H_2O)$ при разных содержаниях воды. Сплошные линии - результат описания с помощью аппроксимирующих формул (см. текст). Буквами обозначены: а) - первый дифракционный пик, б) - второй дифракционный пик, в) - некогерентное рассеяние, г) диффузное рассеяние. По оси абсцисс цифрами обозначено содержание воды (молей воды/моль липида).

величины I_{d_0} , I_{i_0} , Γ_0 , Γ_1 , q_1 и I_{inc} рассматривались как свободные параметры.

Ширина первого дифракционного пика Γ_1 оказалась зависящей от содержания воды в образце. Если представить исследуемую систему в виде стопки, состоящей из N плоских равноудаленных липидных бислоев, то оказывается, что при не слишком малых N конечное число слоев связано с наблюдаемой шириной пика:

$$N = q_1 \cdot \frac{0,37}{\sqrt{\Gamma_1^2 - \Gamma_0^2}}, \quad (2)$$

где Γ_0 - аппаратная ширина пика. Соотношение (2) следует из формулы Шеррера (см., напр., /21/).

Относительное распределение интенсивностей между диффузным и дифракционным компонентами дается соотношением

$$\frac{I_0}{I_0 + I_1} = \frac{I_{d_0} \cdot \Gamma_0}{2 I_{i_0} \Gamma_1 + I_{d_0} \cdot \Gamma_0} \cdot 100 \quad (\text{в } \%), \quad (3)$$

где I_0 и I_1 - интегральные интенсивности диффузного и первого дифракционного пиков.

Период повторения d получается из положения первого дифракционного пика q_1 согласно соотношению $d = 2\pi/q_1$. В предположении, что вода и липид образуют чередующиеся слои с постоянной плот-

ностью и толщиной, их толщины можно найти (см. /3,6,7,22/) с помощью соотношений:

$$d_L = \Phi \cdot d \quad \text{и} \quad d_w = d - d_L, \quad (4)$$

где Φ - объемная доля липида в образце, которую мы представляем в виде

$$\Phi = [1 + h (M_w \cdot \rho_L) / (M_L \cdot \rho_w)]^{-1} \quad (5)$$

где $h = n_w/n_L$ - отношение числа молей (вода-липид), M_w и M_L - молекулярные веса, ρ_w и ρ_L - массовые плотности воды (w) и липида (L) соответственно.

При наличии в липидном бислое n_A молей модифицирующих добавок (напр. PAE_L) с молекулярным весом M_A и плотностью ρ_A

$$\Phi = [1 + h \cdot \frac{M_w}{M_L} \cdot \frac{\rho_L}{\rho_w} (1 + \frac{n_A}{n_L} \cdot \frac{M_A}{M_L} \cdot \frac{\rho_L}{\rho_A})^{-1}]^{-1} \quad (6)$$

Наконец, молекула неионного сурфактанта (EO-9) одновременно обладает гидрофобной группой, которая утоплена в бислое, и гидрофильной частью, которая занимает некоторый объем в водяной прослойке. Если их молекулярные веса и плотности соответственно обозначить через M_{AL} , ρ_{AL} и M_{Aw} , ρ_{Aw} , то получаем

$$\Phi = [1 + (h \cdot \frac{M_w}{M_L} \cdot \frac{\rho_L}{\rho_w} + \frac{n_A}{n_L} \cdot \frac{M_{Aw}}{M_L} \cdot \frac{\rho_L}{\rho_{Aw}}) (1 + \frac{n_A}{n_L} \cdot \frac{M_{AL}}{M_L} \cdot \frac{\rho_L}{\rho_{AL}})^{-1}]^{-1} \quad (7)$$

В настоящее время уже установлено, что распределение воды между бислоями более напоминает гауссиан, а часть молекул воды проникает в полярную область бислоя /23/. Поэтому описанный выше подход - не более как приближение, которое, однако, позволяет в широком диапазоне концентраций воды получать оценки d_L и d_w , несущие основную информацию о зависимости исследуемой структуры от содержания воды и, соответственно, о процессах гидратации и набухания. В этом же приближении (и в предположении однородного распределения добавок в липидном бислое) площадь, приходящаяся на молекулу липида в бислое,

имеет вид

$$A_L = 2(\nu_i + n \nu_w) / d \quad (8)$$

и, при наличии добавок,

$$A_{L+a} = 2(\nu_i + n \nu_w + \frac{n_a}{n_L} \nu_a) / d_a, \quad (9)$$

где n_a/n_L - число молекул-добавок на молекулу липида, ν_i - объем i -того сорта молекул, $\nu_i = M_i \cdot N_A / \rho_i$, d_a и d - период повторения в присутствии добавок и без них, соответственно. Разность площадей (8) и (9), отнесенная к отношению числа молей добавок на моль липида,

$$A_a = (A_{L+a} - A_L) \cdot n_L / n_a \quad (10)$$

есть инкремент поверхности мембраны, приходящийся на одну модифицирующую молекулу.

4. Результаты

На рис.2 приведены экспериментальные зависимости периода повторения от содержания воды в материале $d(n_t)$ (n_t - полное число молей воды на моль липида в системе). На них наблюдаются два характерных излома, при n_1 и n_2 , делящие диапазон исследованных n_t на 3 области, далее обозначаемые как I, II, III. В области II ($n_1 < n_t < n_2$) d возрастает быстро, тогда как в областях I ($0 < n_t < n_1$) и III ($n_t > n_2$) скорость роста d с увеличением n_t заметно меньше. Фазовый состав исследованных материалов проверялся с помощью ^{32}P и 2H ЯМР [12,16]. Было найдено, что в большинстве образцов липид находится в L_d фазе. Исключение составил PL/PAE_6 при низком содержании воды (см. рис.2в).

Зависимость $d(n_t)$ допускает линейную экстраполяцию d к $n_t = 0$ из областей I и II. Если принять, что в области I преобладающим процессом является гидратация полярных голов липидов, а в области II - набухание мультислоевого материала, то экстраполированным к $n_t = 0$ значениям d можно придать наглядный смысл, а именно: значение $d_d = \lim_{n_t \rightarrow 0} d(n_t) |_{n_t \in I}$ есть толщина сухого бислоя, и $d_h = \lim_{n_t \rightarrow 0} d(n_t) |_{n_t \in II}$ - толщина бислоя в полностью

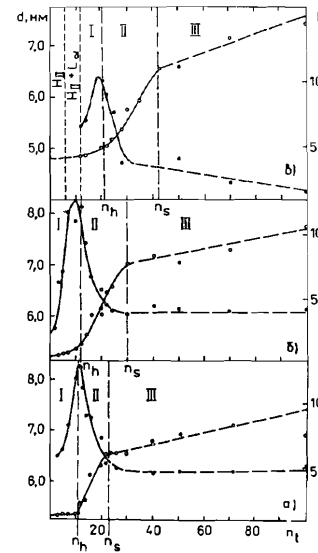


Рис.2. Зависимости периода повторения d (○, левая шкала) и параметра N (●, правая шкала) от содержания воды n_t для: а) фосфолипидов, б) $PL/EO-9$ (молярное отношение 47:1), в) PL/PAE_6 (молярное отношение 2:1) при 25°C. Статистическая погрешность определения $d \pm 0,001$ нм, ошибка определения $n_t \pm 10\%$.

гидратированном состоянии. Таким образом были найдены значения:

$$\begin{aligned} d_d &= 5,3 \pm 0,1 \text{ нм}, & d_h &= 4,35 \pm 0,05 \text{ нм} & \text{в } PL \\ d_d &= 5,2 \pm 0,1 \text{ нм}, & d_h &= 4,42 \pm 0,05 \text{ нм} & \text{в } PL/EO-9 \\ d_d &= 4,8 \pm 0,5 \text{ нм}, & d_h &= 3,3 \pm 0,1 \text{ нм} & \text{в } PL/PAE_6. \end{aligned}$$

Потеря точности для d_d в PL/PAE_6 вызвана тем, что область L_d фазы в этой системе ограничена снизу значением $n_t = II$.

Зависимость $N(n_t)$ (см. ф-лу 2 и рис.2) во всех трех сериях обнаруживает хорошо выявляющийся максимум вблизи n_1 .

Толщина липидного бислоя d_L находилась из (4) с помощью формул (5), (7) и (6) для PL , $PL/EO-9$ и PL/PAE_6 соответственно. Для соответствующих плотностей принимались следующие значения: $\rho_L = \rho_{AL}(EO-9) = \rho_{AW}(EO-9) = 1,0 \text{ г/см}^3$; $\rho_{AL}(PAE_6)$ было найдено равным $0,962 \text{ г/см}^3$; $\rho_w(^2H_2O) = 1,1 \text{ г/см}^3$. Молекулярные веса соответственно принимались: для $EO-9$ $M_{AL} = 205$ ($H_{13}C_9 - C_6H_6 -$) и $M_{AW} = 429$ ($-(O-CH_2-CH_2)_9-O_2H$); для PAE_6 $M_{AL} = 222$; $M_L = 768$ и $M_w = 20$. Другими словами, предполагается, что PAE_6 полностью погружается в мембрану, а в случае $EO-9$ в мембрану включается только участок ($H_{13}C_9 - C_6H_6 -$), тогда как этиленоксидные звенья остаются в водной прослойке. На рис.3 представлены зависимости $d_L(n_t)$ и $d_w(n_t)$. Видно, что d_L уменьшается с ростом n_t во всей области I, вплоть до n_1 ,

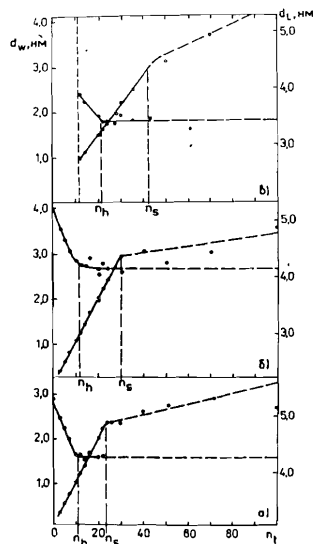


Рис.3. Толщины липидного бислоя d_L (●, правая шкала) и слоя воды d_w (○, левая шкала) в зависимости от содержания воды n_t ; а) PL, б) PL/EO-9, в) PL/PAE₆.

и сохраняет постоянное значение в области II. Следует отметить хорошее согласие d_L и d_h , найденных выше линейной экстраполяцией, со значениями, следующими из рис.3.

В области III применение ф-лы (4), однако, приводит к невероятно малым значениям d_L (не показаны на рис.3). Это связано с тем, что, начиная с некоторого n_t , часть воды, содержащейся в материале, не встраивается между бислоями. Дополнительным обстоятельством, указывающим на такое строение системы липид - вода при больших n_t , является интенсивность диффузного рассеяния (будет обсуждаться ниже). Поэтому мы принимаем, что в области III $d_L = \text{const} = d_h$. Тогда с помощью тех же соотношений (4-7) мы можем найти число молекул воды n , включаемых между бислоями. Результат этого подхода, представленный на рис.4 в виде зависимости n от полного содержания воды в системе n_t , показывает, что характерное n_t , после

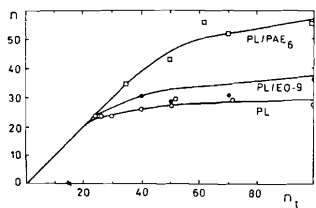


Рис.4. Количество воды, включенной между липидными слоями n (молей воды/моль липида) в зависимости от полного содержания воды n_t в образце (молей воды/моль липида).

которого вода перестает включаться между бислоями, зависит от присутствия модифицирующих добавок.

Толщина слоя воды d_w , входящей в состав мультиламеллярной структуры, также найдена с помощью (4). $d_w(n_t)$ линейно растет с содержанием воды, однако обнаруживает заметный излом при $n_t = n_s$. В области III рост d_w с увеличением n_t заметно замедляется.

На рис.5 показаны зависимость поверхности, приходящейся на молекулу липида A_L (ф.8), и инкремент поверхности A_a (ф.10)

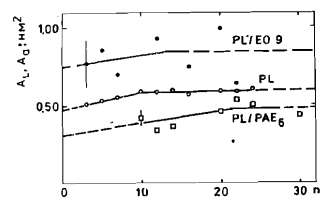


Рис.5. Поверхность мембраны, приходящаяся на одну молекулу липида A_L , и инкремент поверхности на молекулу амфифильной добавки A_a , в зависимости от полного содержания воды в образце n_t (молей воды/моль липида).

в зависимости от n_t . Ошибки определения A_a сравнительно велики, т.к. это - результат вычитания двух близких величин.

На рис.6 показано относительное распределение интенсивностей между диффузным и дифракционным компонентами в зависимости от содержания воды в системе.

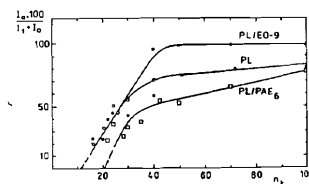


Рис.6. Доля диффузного рассеяния (%) в зависимости от полного содержания воды n_t (молей воды/моль липида) в образце.

Ниже некоторого содержания воды, близкого к n_h , диффузный компонент отсутствует. При $n_t > n_h$ он становится заметным, а при $n_t > n_s$ его роль становится преобладающей. При максимальной концентрации воды ($n_t = 100$) доля диффузного компонента приближается к 100% для PL/EO-9, но остается заметно меньшей для PL и PL/PAE₆.

В заключение следует отметить, что повторяемость экспериментальных результатов была хорошей при $n_t < n_s$ и несколько хуже в области III.

5. Обсуждение результатов

5.1. Фосфолипид без добавок

Зависимости $d(n_t)$, очень похожие на полученную нами для PL (рис.2а), в более узком диапазоне концентрации воды были получены в EYL /3/ и ДРРС /11/ с помощью дифракции рентгеновских лучей. В области I преобладающим процессом является гидратация полярных голов, сопровождающаяся уменьшением толщины бислоя (рис.3) и возрастанием площади на молекулу липида (рис.5). Изломы при $n_h = 11 \pm 2$ на кривых $d(n_t)$ и $d_L(n_t)$ хорошо согласуются с аналогичными изломами на зависимости от n_t дейтериевого квадрупольного расщепления для тяжелой воды /12/. Поэтому представляется оправданным рассматривать n_h как величину, характеризующую гидратационную емкость липидов. При гидратации происходит уменьшение толщины липидного бислоя от $d_d = 5,3$ нм (сухой) до 4,35 нм (гидратированный липид), сопровождаемое увеличением площади на молекулу липида от 0,48 нм² до 0,61 нм² (рис.5). Эти явления, наблюдавшиеся и для других липидов (см. /4,8,25/), соответственно коррелируют с увеличением степени разупорядочения углеводородных цепей /26,27/. Интересно сопоставить максимум на зависимости $N(n_t)$ (рис.2а), находящийся вблизи n_h , с другими наблюдениями. Согласно исследованиям реплик со скелов замороженного материала /12/, морфология PL зависит от содержания воды. Для EYL было найдено /26/, что сильное изменение морфологии происходит вблизи $n_t = 13$, что близко к гидратационной емкости для PL, полученной в /12/. В работах /28,29/ было установлено, что тип и концентрация дефектов в мультислабеллярной структуре зависят от содержания воды в системе. По-видимому, зависимость морфологии липидных систем от содержания воды является довольно общим явлением. Можно также утверждать, что морфология зависит не только от сил, действующих между бислоями, их упругих свойств и внешних условий, но и от приготовления, в особенности при концентрациях воды выше n_s .

В этой связи интересным представлялся бы эксперимент, в котором содержание воды в образце удавалось бы контролировать без других непосредственных воздействий на структуру.

Второй излом на зависимости $d(n_t)$ для PL (рис.2а) соответствует емкости набухания $n_s = 23 \pm 2$. Это значение также хорошо соответствует наблюдениям, полученным с помощью ЯМР /12/. Период повторения при $n_t = n_s$ для PL $d_s = 6,5$ нм.

Указания на диффузное рассеяние обнаруживаются между n_s и n_h , и с ростом n_t его интенсивность увеличивается (рис.6). Диффузное

рассеяние указывает на присутствие статических и (или) динамических крупномасштабных неоднородностей в изучаемом объекте. В рамках нашей упрощенной модели можно предположить два типа неоднородностей. Первый из них связан с конечными размерами упорядоченных областей в мультислабеллярной структуре и с тем, что в упорядоченной области следует ожидать несколько другого соотношения вода/липид, чем в среднем по образцу. Конечный размер вдоль нормали к латеральной плоскости проявляется независимо, в виде упирения дифракционной линии. Конечность размеров ориентированных областей в латеральной плоскости хорошо известна из электронно-микроскопических наблюдений. Меньшее содержание воды в упорядоченных областях по сравнению со средним по образцу особенно ярко проявляется в области III и уже обсуждалось выше (раздел III).

Другой тип неоднородностей можно связать с присутствием в образце зародышей везикулярных форм, реализующихся в системе липид-вода при больших разбавлениях (см., напр., /15/). При этом, безотносительно к форме везикул (сферические, цилиндрические), равномерно ожидать, что центральная область везикулы содержит больше воды, чем плоская мультислабеллярная система, а зародыш везикулы содержит больше воды, чем образец в среднем. Необходимы дальнейшие исследования для оценки правдоподобия этих моделей. В любом случае, из имеющихся наблюдений можно сделать вывод о том, что характерный размер неоднородностей в несколько раз превышает период повторения в упорядоченных областях. Следует заметить, что наблюдение неоднородностей, приводящих к диффузному рассеянию, коррелирует также и с наличием "захваченной воды", проявляющейся в ЯМР исследованиях /12,30,31,32/.

В области высоких концентраций воды (область III) для липидов характерно образование более или менее деформированных мультислабеллярных везикул, средний размер которых уменьшается с увеличением содержания воды /12/. Уменьшение этого размера сопряжено с уменьшением среднего числа бислоев в одной везикуле и увеличением периода повторения d (рис.2а). Результаты вычислений, сделанных для рентгеновских исследований /2/, показывают, что наблюдаемые изменения не объясняются учетом кривизны мембран или размеров везикул. В рамках справедливости предположения о постоянной толщине липидного бислоя в области III, мы вправе констатировать, что толщина водяной прослойки увеличивается с ростом концентрации воды. Это может означать, что среднее расстояние между бислоями оказывается больше для малых везикул (с малым числом слоев), чем для больших. Не исключено также, что расстояние между слоями вблизи центра везикулы оказывается больше, чем на периферии. В любом случае наблюдаемая зависимость $d_w(n_t)$

в III области является указанием на то, что силы, действующие между бислоями, коррелируют с кривизной слоев.

Сравнение найденных толщин липидного бислоя для PL (23°C) ($d_d = 5,3$ нм, $d_s = 6,5$ нм) с аналогичными размерами для EYL ($d_d = 5,2$ нм при 25°C /31/, $d_d = 5,5$ нм /33/, $d_d = 5,1$ нм /34/ и $d_s = 6,5$ нм /27/, $d_s = 6,2$ нм ($n_s = 33,5$) /35/) и для DPPC в L_α состоянии ($d_d = 5,5$ нм (45°C) /17/) показывает, что больших отличий в них не наблюдается, несмотря на то, что PL содержит сравнительно большое количество фосфатидилэтаноламина.

5.2. Влияние модифицирующих добавок

Согласно ЯМР-исследованиям /16/, добавление EO-9, гидрофобная часть которого встроена в мембрану, не изменяет L_α состояния липидов. Однако уже при концентрациях, много меньших концентрации насыщения мембраны, EO-9 вызывает наблюдаемые изменения ряда свойств системы. Например, d_s возрастает от 6,5 до 7,0 нм при одновременном увеличении n_s от 23 до 30 и неизменной толщине липидного бислоя (рис. 2б, 3б).

При использованной низкой концентрации EO-9 (1:47) степень покрытия поверхности липида этиленоксидными группами весьма невелика. Тем не менее, химический потенциал воды вблизи поверхности мембраны оказывается уменьшенным, что увеличивает содержание воды в межмембранной прослойке и, соответственно, гидратационную емкость системы. В этой связи интересно отметить, что добавление полиэтиленгликоля с $M > 400$, который не проникает ни в мембраны, ни в межмембранную прослойку, приводит к обратному эффекту - дегидратации мембран /37/. Стерические эффекты, возникающие из-за присутствия этиленоксидных групп в межмембранном промежутке, должны приводить к дополнительным силам отталкивания. Важность этих эффектов была показана в различных коллоидных системах /38/. В случае мембран сильному изменению подвергаются гидратационные силы, действующие между мембранами (см., напр., обзор /25/). Этот круг явлений мы намерены подробно исследовать в дальнейшем.

Инкремент поверхности, составляющий $0,75-0,85$ нм² для одной молекулы EO-9, представляется неожиданно большим по сравнению с эффективным сечением одиночной углеводородной цепи молекулы амфифила, даже если допустить сильное ветвление алкильного участка. Одно из возможных объяснений этого неожиданного наблюдения может быть связано с взаимодействием липид-(EO-9), приводящим к небольшому увеличению площади на липидную молекулу.

Перейдем к рассмотрению влияния сравнительно большого количества PAE₆ (молярное отношение PL:PAE₆ = 2:1), встроенного в мембраны. Согласно исследованиям с помощью ЯМР, при небольших количествах воды эта система образует инверсную гексагональную фазу (H_{II}). В некотором диапазоне концентраций воды гексагональная и ламеллярная фазы сосуществуют, ($H_{II} + L_\alpha$), после чего система полностью переходит в L_α (см. рис. 3в). При $n_s = 3$ постоянная решетки H_{II} фазы $a = 5,9$ нм, диаметр водяных цилиндров - 1,5 нм, а толщина липидного слоя вдоль линии, соединяющей оси цилиндров - 4,4 нм (соотв. формулы см. в /9/).

Экстраполяция периода повторения d из области II к $n_s = 0$ (рис. 2с) дает для толщины гидратированного липида $d_h = 3,3$ нм, что заметно меньше, чем в случае PL или PL/EO-9 (4,35 нм). Это уменьшение толщины качественно указывает на флюидизацию мембраны и/или на некоторое взаимопроникновение ацильных цепей. В L_α фазе PAE₆ почти не меняет период повторения, $d_s = 6,6$ нм (при максимальном набухании $n_s = 42$), что близко к значению для PL. Основной эффект состоит в уменьшении толщины липидного бислоя. Поверхностный инкремент составляет от 0,38 до 0,48 нм² на молекулу PAE₆ (рис. 5), что по порядку величины соответствует ожидаемому (см. /40/), и некоторое переплетение липидных цепей в этой ситуации представляется естественным. Насколько нам известно, это - первое наблюдение взаимопроникновения липидных молекул, индуцированное органическим соединением с короткой цепью. Взаимопроникновение липидов, обладающих цепями разной длины, хорошо известно (см. /41/).

Гидратационная емкость $n_h = 24 \pm 2$ и емкость набухания ($n_s = 42 \pm 3$) (рис. 2в) для PL/PAE₆ оказываются значительно выше, чем для PL и PL/EO-9. Фосфорил-группа PAE₆ способна образовывать сильные водородные связи /42,43/. Однако для объяснения большого значения n_h без допущения об изменении гидратации липидов приходится принимать, что одна PO₃⁻-группа связывает примерно 24 молекулы воды, что представляется неправдоподобным. Исследования растворимости воды в PAE₆ показывают, что при комнатной температуре 1 моль PAE₆ растворяет не более 5 моль воды /44/. В связи с этим мы полагаем, что преобладающим эффектом является возрастание доступности липидов (в особенности глицириновой группы) для молекул воды, вызванное добавлением PAE₆.

В случае PL/PAE₆ наблюдается несколько меньшая интенсивность диффузного рассеяния, чем в PL (см. рис. 6). В основном это изменение связано с большей емкостью набухания, однако высокая несимметричность молекулы PAE₆ /40,45,46/, увеличивающая тенден-

цию мембраны к искривлению и, возможно, приводящая к латеральным неоднородностям (см. обсуждение в /47/), может повлиять и на причины, приводящие к диффузному рассеянию.

Уменьшение толщины мембраны и повышение тенденции к искривлению, сопровождающиеся большей доступностью липидов для воды, должны увеличить вероятность образования пор в мембране и скорость "флип-флоп" процессов для липидов. Оба механизма обсуждаются в связи с исследованиями ионной проницаемости PL/PAE везикул /46/.

В заключение авторы благодарят проф. д-ра Гроссмана, ТУ, Дрезден за синтез PAE , д-ра Герхардта, ЦИОХ, Берлин за синтез $EO-9$ и д-ра Эйфельда, ВУ, Росток за измерение плотности PAE . Кроме того, большая благодарность выражается д-ру Гавришу, КМУ, Лейпциг за ценные и полезные обсуждения.

Литература

1. Israelachvili J.N.M., Marcelja S., Horn R.G., *Qart.Rev.Biophys.* 13 (1980) 121.
2. Atkinson D., Hauser H., Shipley G.G., Stubbs J.M., *Biochim.Biophys.Acta* 339 (1974) 10.
3. Lundberg B., Sjöblom L., *Acta Acad.Aboensis, Ser. B*, 33 (1973) 1.
4. Lis L.J., McAlister M., Fuller N., Rand R.P., Parsegian V.A., *Biophys. J.*, 37 (1982) 657.
5. Hauser H., *Biochim.Biophys.Acta*, 772 (1984) 37.
6. LeNeveu D.M., Rand R.P., Parsegian V.A., Gingell D., *Biophys.J.*, (1977) 209.
7. Inoko Y., Mitsui T., *J.Phys.Soc.Japan*, 44 (1978) 1918.
8. Rand R.P., Parsegian V.A., Henry J.A.C., Lis L.J., McAlister M., *Can.J.Biochem.* 58 (1980) 959.
9. Seddon M., Cevc G., Kaye R.D., Marsh D., *Biochemistry*, 23 (1984) 2634.
10. Zaccai G., Büldt G., Seelig A., Seelig J., *J.Mol.Biol.*, 134 (1979) 693.
11. Büldt G., H.U.Gally, Seelig J., *J.Mol.Biol.* 134 (1979) 673.
12. Gawrisch K., Richter W., Möps A., Balgavy P., Arnold K., Klose G., *Studia Biophysica*, 108 (1985) 5.
13. McCown, E.Evans, Diehl S., Wiles H.C., *Biochemistry* 20 (1981) 3134.
14. Cowley A.C., Fuller N.L., Rand R.P., Parsegian V.A. 17 (1978) 3163.
15. Harbich W., Helfrich W., *Chem.Phys.Lipids* 36 (1984) 39.
16. Brückner S., Klose G., in preparation.
17. Hanahan D.J., Turner M.B., Jayko M.E., *J.Biol.Chem.*, 192 (1951) 623.

18. Вагов В.А., Кунченко А.В., Останевич Ю.М., Саламатин И.М. ОИЯИ, Р14-83-898, Дубна, 1983.
19. Guinier A., Fournet G., *Small-angle-scattering of x-rays*, Wiley, New York, 1955.
20. Jacrot B., *Rep.Prog.Phys.*, 39 (1976) 911.
21. Neef H., *Grundlagen und Anwendung der Röntgenstrukturanalyse*, R.Oldenburger, München, 1962, p.299.
22. Rand R.P., Luzatti V., *Biophys. J.*, (1968) 125.
23. Worcester D.L., Franks N.P., *J.Mol.Biol.*, 100 (1976) 359.
24. Kaye G.W.C., Laby T.H., *Tables of Physical and Chemical Constants*, Longmans, Green and Co., London, New York, Toronto, 1959.
25. Rand R.P., *Ann.Rev.Biophys.Bioeng.*, 10 (1981) 277.
26. Lange Y., Gary Bobo C.M., *J.Gen. Physiol.*, 63 (1974) 690.
27. Jendrsiak G.L., Mendible J.C., *Biochim.Biophys. Acta*, 424 (1976) 149.
28. Kleman M., Williams C.E., Costello M.J., Gulik-Krzywicki T., *Philosoph. Mag.*, 35 (1977) 33.
29. Gulik-Krzywicki-T., *Biochim.Biophys.Acta*, 415 (1975) 1.
30. Klose G., Gawrisch K., *Studia Biophysica*, 84 (1981) 21.
31. Salisbury N.J., Darke A., Chapman D., *Chem.Phys.Lipids* 8 (1972) 142.
32. Finer E.G., Darke A., *Chem.Phys. Lipids*, 12 (1974) 1
33. Chapman D., Williams R.M., Ladbroke B.D., *Chem Phys.Lipids*, 1 (1967) 445.
34. Small D.M. *J.Lipid Res.*, 8 (1967) 551.
35. LeNeveu D.M., Rand R.P., Parsegian V.A., *Nature*, 259 (1976) 601.
36. Lichtenberg D., Robson R.J., Dennis E.A., *Biochim.Biophys. Acta*, 737 (1983) 285
37. Arnold K., Pratsch L, Gawrisch K., *Biochim.Biophys. Acta*, 728 (1983) 121.
38. Overbeek J.Th.G., *Adv.Coll.Interf.Sci.*, 16 (1982) 17.
39. Klose G., Zheliaskova A., Brückner S., in preparation
40. Bilke St., Klose G. *Coll.Polym.Sci.*, in press.
41. Tenchov B.G., *Progress in Surface Science*, in press.
42. Gramstad T., *Spectrochimica Acta*, 20 (1964) 729.
43. Gramstad T., *Spectrochimica Acta*, 19 (1963) 497.
44. Petr R., Ph.D. Thesis, TU Dresden Sektion Chemie, 1985.
45. Klose G., Hentschel M., Bayerl Th, Strobel U., *Seventh School on Biophysics of Membrane Transport, School Proceedings*, (1984) 185-204, Wroclaw University Press.
46. Hentschel M., Klose G., *Biochim.Biophys. Acta* 812 (1985) 447.
47. Knoll W., Haas J., Stuhman H.B., Fuldner H.-H., Vogel H., Sackmann E., *J.Appl.Cryst.* 14 (1981) 191.

Рукопись поступила в издательский отдел
20 июня 1986 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

D2-82-568	Труды совещания по исследованиям в области релятивистской ядерной физики. Дубна, 1982.	1 р. 75 к.
D9-82-664	Труды совещания по коллективным методам ускорения. Дубна, 1982.	3 р. 30 к.
D3,4-82-704	Труды IV Международной школы по нейтронной физике. Дубна, 1982.	5 р. 00 к.
D11-83-511	Труды совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1982.	2 р. 50 к.
D7-83-644	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983.	6 р. 55 к.
D2,13-83-689	Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983.	2 р. 00 к.
D13-84-63	Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике. Братислава, Чехословакия, 1983.	4 р. 50 к.
D2-84-366	Труды 7 Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984.	4 р. 30 к.
D1,2-84-599	Труды VII Международного семинара по проблемам физики высоких энергии. Дубна, 1984.	5 р. 50 к.
D17-84-850	Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1984. /2 тома/	7 р. 75 к.
D10,11-84-818	Труды V Международного совещания по проблемам математического моделирования, программированию и математическим методам решения физических задач. Дубна, 1983	3 р. 50 к.
	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984 /2 тома/	13 р. 50 к.
D4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра, Алушта, 1985.	3 р. 75 к.
D11-85-791	Труды Международного совещания по аналитическим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985.	4 р.
D13-85-793	Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна 1985.	4 р. 80 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу:
101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79
Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

Беззаботнов В.Ю. и др.

P14-86-395

Гидратация и набухание липидной фракции яичного желтка и влияние модифицирующих амфифильных добавок /исследования с помощью малоуглового рассеяния нейтронов/

Методом малоуглового рассеяния нейтронов исследованы полная липидная фракция яичного желтка (PL) и те же липиды с добавками р-нонилфенолэтиленоксида (Е0-9) (молярное отношение PL:Е0-9 = 47:1) или диэтилового эфира гексилфосфоновой кислоты (РАЕ₆) (PL:РАЕ₆ = 2:1). Исследования выполнены в широком диапазоне концентраций τ от 3 до 100 молей воды на моль липида. Найдены значения гидратационной способности $n_H = 11$ (PL), 12 (PL/Е0-9), 21 (PL/РАЕ₆) молей воды на моль липида и значения n_S , характеризующие максимальное набухание $n_S = 23$ (PL), 30 (PL/Е0-9) и 42 (PL/РАЕ₆) молей воды на моль липида. Одна молекула липида в PL мембране занимает 0,48 нм² в "сухом" состоянии и 0,61 нм² - в гидратированном. Уже малая добавка Е0-9 сильно увеличивает n_S , что связано с уменьшением химического потенциала воды группами этиленоксида, тогда как РАЕ₆ увеличивает n_H и n_S , в основном, за счет облегчения доступа воды к полярным головкам липидов. Кроме того, РАЕ₆ вызывает заметное уменьшение толщины липидного бислоя, что указывает на взаимное переплетение липидов. Найдены указания на зависимость межмембранных сил от кривизны мембран.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1986

Перевод авторов

Bezzabotnov V.Yu. et al.

P14-86-395

Hydration and Swelling of the Total Lipid Fraction of Egg Yolk and the Influence of Some Additives Studied by Small - Angle Neutron Scattering

The total lipid fraction of egg yolk (PL) and that containing p-nonylphenol (ethylene oxide) (Е0-9) (molar ratio PL:Е0-9 = 47:1) or hexane phosphonic acid diethyl ester (РАЕ₆) (molar ratio PL:РАЕ₆ = 2:1) were studied as a function of water content in a wide concentration range from 3 to 100 moles of water per mole of lipid by small-angle neutron scattering. The hydration capacities found are: 11 (PL), 12 (PL/Е0-9), 21 (PL/РАЕ₆) moles of water per mole of lipid and the maximum swelling n_S is reached at: 23 (PL), 30 (PL/Е0-9), 42 (PL/РАЕ₆) moles of water per mole lipid, respectively. One lipid molecule in PL requires an area of 0.48 нм² in the "dry" and 0.61 нм² in the hydrated membrane. Already a small amount of Е0-9 added increases n_S considerably because of the decrease of the chemical potential of the water by the ethylene oxide groups whereas РАЕ₆ induces an increase of n_H and n_S mainly by increasing the accessibility of the lipids to water. Additionally, the РАЕ₆ induced a considerable decrease of the thickness of the lipid bilayer, which can be understood by an interdigitation of the lipids. Finally, indications are found that the forces between the membranes are dependent on the curvature of the membranes.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1986