

**СООБЩЕНИЯ  
ОБЪЕДИНЕННОГО  
ИНСТИТУТА  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА**

P14-86-644

Б-20

А.М.Балагуров, В.И.Горделий

**ВЛИЯНИЕ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ  
И ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА  
НА МУЛЬТИЛАМЕЛЛЯРНУЮ СТРУКТУРУ  
ИЗ ЯИЧНОГО ЛЕЦИТИНА**

**1986**

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Структурная организация системы липид - вода в настоящее время хорошо изучена в широкой области температур и концентраций <sup>/1-3/</sup>. Известно, в частности, что в этой системе при определенных условиях возможно образование ориентированных мультислойных упаковок, состоящих из липидных бислоев и прослоек воды между полярными головками липида. Конформация углеводородных цепей липида в бислое зависит от температуры  $t$  и концентрации воды  $c$  и сводится большей частью к двум типам:

- жидкокристаллическому / $L_{\alpha}$ -фаза/ - при высоких  $t$  и  $c$ ,
- "твердому" / $L_{\beta}$ -фаза/ - при низких  $t$  и  $c$ .

В твердом состоянии углеводородные цепи упакованы в двумерную гексагональную решетку и перпендикулярны ламеллярной плоскости или наклонены под определенным углом к ней / $L_{\beta}$ '-фаза/.

Бислойная структура липидных мембран определяется балансом электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий полярных головок липида и воды и гидрофобных взаимодействий в области углеводородных цепей. Замена воды на какой-либо другой полярный растворитель может радикально нарушить этот баланс вплоть до невозможности образования бислоя.

Прямое доказательство существования бислойной структуры и одновременно ее параметры дают дифракционные эксперименты - рентгеновские <sup>/1/</sup> и нейтронные <sup>/4,5/</sup>. Возможности нейтронографии в изучении структуры мембран прежде всего связаны с использованием изотопного замещения /в основном  $H \rightarrow D$ / для локализации воды и отдельных молекулярных групп. Например, таким способом были определены положение холестерина <sup>/6/</sup> и гексана <sup>/7/</sup>, внедренных в бислой.

Насколько нам известно, до сих пор дифракционных исследований мультислойных структур из фосфолипидов, находящихся в неводной среде или в смеси воды с другими полярными растворителями, не проводилось. Указания на возникновение бислоев при суспендировании фосфатидилхолина в глицерине, этиленгликоле и диметилсульфоксиде получены в экспериментах по ЯМР <sup>/8/</sup>. Оптическим методом наблюдалось образование бислоев из дилауроилфосфатидилхолина и яичного лецитина в этиленгликоле <sup>/9/</sup>. В этих исследованиях, однако, не определялись ни параметры бислоев, ни их фазовое состояние.

В нейтронных дифракционных экспериментах, результаты которых представлены в настоящей работе, во-первых, выяснялось, образуются ли мультислойные структуры из яичного лецитина (EYL) в растворах этиленгликоля (EG) и диметилсульфоксида (DMSO),

измерялись их параметры, и, во-вторых, определялось распределение молекул DMSO в структуре из яичного лецитина и воды. Эксперименты проведены на нейтронном дифрактометре ДН-2<sup>/10/</sup> на высокопоточном импульсном реакторе ИБР-2 ОИЯИ по ранее разработанной схеме<sup>/11/</sup>.

## 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ И УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Исследовались образцы, приготовленные следующим образом:

- № 1 - 0,1 мл 14% раствора яичного лецитина в этаноле наносился на покровное стекло размером 25x25 мм, затем растворитель медленно испарялся при  $t = 15^\circ\text{C}$ ;
- № 2 - на образец № 1 /после проведения на нем измерений/ накладывалось покровное стекло того же размера с равномерно размазанными по нему 3 мг EG;
- № 3 - готовился аналогично № 1, но в раствор добавлялось 3 мг EG;
- № 4 - готовился аналогично № 1, но в раствор добавлялось 3 мг DMSO;
- № 5 - готовился как № 4, но использовался полностью дейтерированный DMSO;
- № 6 - дисперсия яичного лецитина в избытке воды и DMSO, вода и DMSO в соотношении 1:1.

При измерении нейтрограмм параметры дифрактометра не отличались от приведенных в работе<sup>/11/</sup>. Ламеллярная дифракция на образцах № 1-5 измерялась в геометрии зеркального отражения при угле рассеяния  $2\theta = 20^\circ$ , дифракция на дисперсии /образец № 6/ - при  $2\theta = 10^\circ$ . Рассеяние на углеводородных цепях регистрировалось на образцах № 3 и 4 в геометрии симметричного прохождения при  $2\theta = 90^\circ$ .

Параметры бислоя определялись на образцах № 1-4, при этом образцы не изолировались от окружающей среды. Измерения на них проведены при  $t = 18^\circ\text{C}$  и относительной влажности  $\psi = 20\%$ . Структурный эксперимент по локализации DMSO выполнен на образцах № 1, 4 и 5. В этом случае они помещались в герметичный объем, относительная влажность  $\psi = 60\%$  в котором задавалась с помощью насыщенного раствора соли. Температура в этих измерениях была  $21^\circ\text{C}$ . Для определения фаз структурных факторов использовался метод изотопного замещения воды<sup>/4/</sup>, и каждый образец последовательно помещался в пары  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 1/1$  и  $\text{D}_2\text{O}$ .

При обработке нейтрограмм выполнялась нормировка на эффективный спектр нейтронов, после чего нейтрограмма переводилась в шкалу межплоскостных рассеяний. Положение 1-го порядка отражения в этой шкале непосредственно дает период бислоя. При переходе от интегральных интенсивностей пиков к структурным факторам учитывался только множитель Лоренца в виде  $d^4$ . Фактор поглощения не учитывался, т.к. при  $2\theta > 10^\circ$  и толщине образца  $\sim 5 \cdot 10^{-3}$  см он практически не отличается от единицы.

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

### 3.1. Фазовое состояние и параметры бислоя

При комнатной температуре и  $\psi \geq 10\%$  яичный лецитин находится в  $L_\alpha$ -фазе<sup>/3/</sup> с периодом бислоя  $d = 50,8 \text{ \AA}$  /  $t = 23^\circ\text{C}$ ,  $\psi = 66\%$ <sup>/4/</sup>. Состояние углеводородных цепей при этом является жидкокристаллическим, и при дифракции на них в экваториальной плоскости возникает сравнительно широкая полоса с  $d \approx 4,6 \text{ \AA}$ <sup>/1/</sup>. В нашем случае образец № 1 /чистый EYL/ действительно находился в  $L_\alpha$ -фазе с  $d_0 = 51,0 \pm 0,3 \text{ \AA}$ , но на образцах № 3 и 4 при дифракции на углеводородных цепях были зарегистрированы узкие рефлексы с  $d = 4,2 \pm 0,1 \text{ \AA}$  /рис. 1/, характерные для упорядоченной  $L_\beta$ -фазы /или  $L_\beta'$ /. Ламеллярная дифракция на всех 4 образцах /№ 1-4/ дала типичные спектры /рис. 2/, возникающие от мультислойных структур с разориентацией бислоев не более  $5^\circ$ . Однако период повторяемости при добавлении к яичному лецитину EG и DMSO существенно изменился:  $d_0 = 41,8 \pm 0,3 \text{ \AA}$  для EYL + EG /№ 3/,  $d_0 = 44,0 \pm 0,3 \text{ \AA}$  для EYL + DMSO /№ 4/.

Дифракционная картина от образца № 2, структура которого формировалась за счет диффузии EG в уже существующую ламеллярную струк-

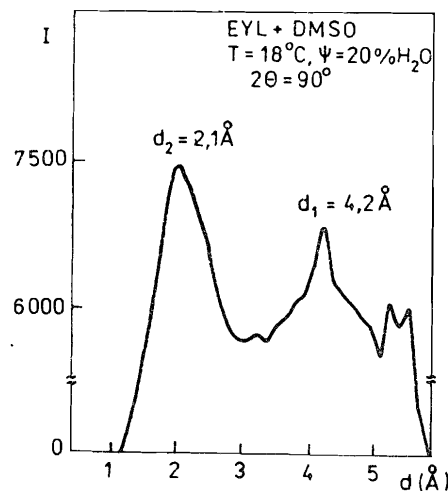
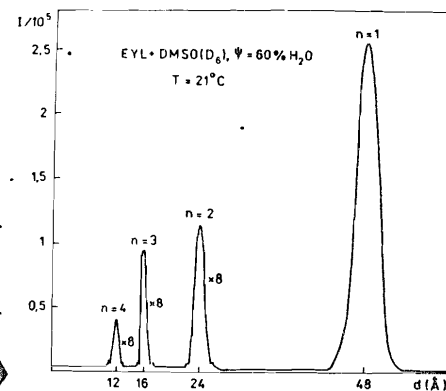


Рис. 1. Образец № 4, дифракция на углеводородных цепях. Видны интенсивные, узкие рефлексы при  $d = 4,2$  и  $2,1 \text{ \AA}$ .

Рис. 2. Образец № 5, ламеллярная дифракция на бислоях. Видны только первые четыре порядка отражения от ламеллярной плоскости. Положение 1-го порядка соответствует периоду бислоя. Аналогичные дифракционные спектры получены для образцов № 1-4.



туру яичного лецитина, такая же, как и от № 3 /с тем же периодом повторяемости/, но дифракционные пики имеют несколько меньшую, а диффузный фон большую интенсивность, т.е. структура образца № 2 менее упорядочена. На образце № 6 /дисперсия/ также наблюдалась дифракция на бислоях с  $d_0 = 148,5 \pm 0,5 \text{ \AA}^*$ .

Таким образом, при растворении EYL как в EG, так и в DMSO возникает бислоенная структура, период которой меньше, чем у EYL в отсутствие растворителя, и, по крайней мере, часть углеводородных цепей липида находится в упорядоченном состоянии.

### 3.2. Положение DMSO в бислое

Для определения положения DMSO в бислое проводился совместный анализ дифракционных данных, полученных на образцах, содержащих обычный /№ 4/ и полностью дейтерированный /№ 5/ диметилсульфоксид DMSO(D<sub>8</sub>). Как обычно, для яичного лецитина при  $\psi = 60\%$  /L<sub>α</sub>-фаза/ первые четыре порядка отражения существенно интенсивнее остальных /рис.2/, поэтому только они и учитывались при определении структуры бислоя. Фазы структурных факторов определены из сравнения данных при H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O обмене. На рис.3 приведены зависимости измеренных структурных факторов от содержания D<sub>2</sub>O. Как и должно быть для centrosymmetричной структуры, эти зависимости линейные. Знаки структурных факторов выбраны в соответствии с тем, что если начало координат помещено в центр углеводородной области бислоя, то при увеличении содержания D<sub>2</sub>O величина F(h) при h четном должна увеличиваться, а при h нечетном - уменьшаться. После определения знаков структурных факторов выполнялся фурье-синтез, т.е. строилась проекция распределения плотности амплитуды рассеяния нейтронов на направление, перпендикулярное плоскости бислоя /коротко - "распределение плотности" /:

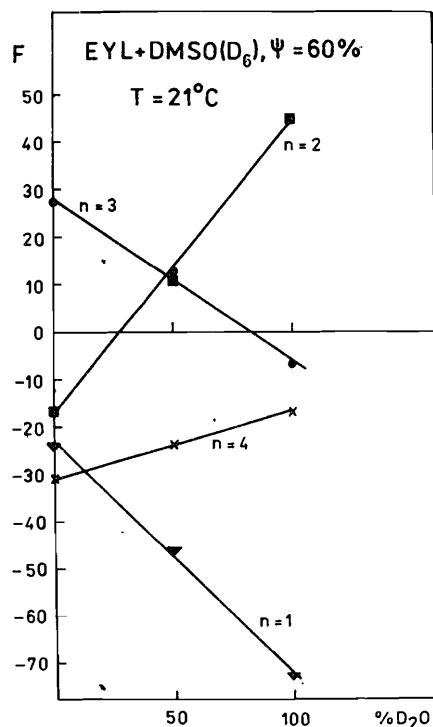


Рис.3. Зависимости структурных факторов от соотношения H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O в бислое.

\* Для сравнения: дисперсия EYL в воде имеет  $d_0 = 62 \text{ \AA}^{1/2}$ .

$$\rho(x) = \sum_h F(h) \cos 2\pi hx / d_0, \quad /1/$$

где h - номер порядка отражения, d<sub>0</sub> - период бислоя. Разностные фурье-синтезы позволяют построить распределение плотности воды и дейтерированной группировки:

$$\rho_W(x) = \sum_h (F_{D_2O}(h) - F_{H_2O}(h)) \cos 2\pi hx / d_0, \quad /2/$$

$$\rho_{DMSO}(x) = \sum_h (F_{DMSO(D_8)}(h) - F_{DMSO}(h)) \cos 2\pi hx / d_0, \quad /3/$$

где F<sub>D<sub>2</sub>O</sub> и F<sub>H<sub>2</sub>O</sub> - структурные факторы для образца в парах D<sub>2</sub>O и H<sub>2</sub>O соответственно, F<sub>DMSO(D<sub>8</sub>)</sub> и F<sub>DMSO</sub> - структурные факторы для образцов с дейтерированным и недейтерированным DMSO. При построении ρ<sub>DMSO</sub> приведение структурных факторов F<sub>DMSO(D<sub>8</sub>)</sub> и F<sub>DMSO</sub> в одну шкалу выполнялось с помощью нормировки по распределению воды, которое предполагалось одинаковым в обоих образцах. Разностные плотности с точностью до постоянного коэффициента соответствуют распределению воды и DMSO в бислое. Кроме того, зная /1/ и /2/ или /1/, /2/ и /3/ для образцов с DMSO, можно построить ρ<sub>L</sub>(x) - распределение плотности липида. На рис.4 плотности ρ(x), ρ<sub>L</sub>(x) и ρ<sub>W</sub>(x) показаны для EYL /образец № 1/, они хорошо соответствуют аналогичным распределениям, приведенным в /4/. Распределение воды для образцов № 4 и 5 показано на рис.5. Разность распределений воды в двух образцах /кривая 3 на рис.5/ характеризует уровень экспериментальной ошибки, которая помимо статистической включает в себя ошибку нормировки и ошибку, свя-

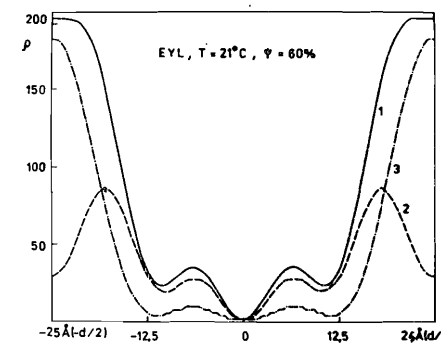
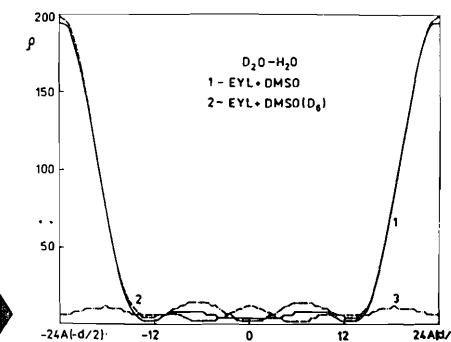


Рис.4. Образец № 1, фурье-профили плотности рассеяния: 1 - ρ(x) - полная плотность, 2 - ρ<sub>L</sub>(x) - плотность липидного бислоя, 3 - ρ<sub>W</sub>(x) - плотность распределения воды.

Рис.5. Фурье-профили распределения воды в бислое образцов № 4 и 5. Кривая 3 - разность распределений 2 и 1.



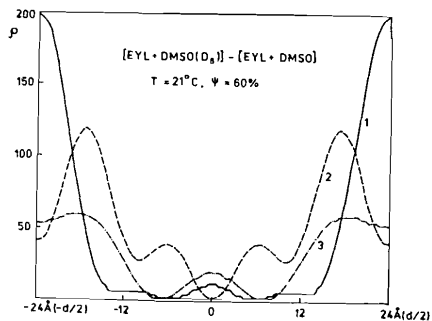


Рис.6. Образец № 5, фурье-профили плотности рассеяния:  
 1 -  $\rho_W(x)$  - плотность распределения воды, 2 -  $\rho_L(x)$  - плотность липидного бислоя, 3 -  $\rho_{DMSO}(x)$  - плотность распределения DMSO /умножено на 5/.

занную с неидеально точным изоморфизмом структур с  $H_2O$  и  $D_2O$ . Наконец, на рис.6 показаны распределения  $\rho_W(x)$  /то же, что кривая 2 на рис.5/,  $\rho_L(x)$  и  $\rho_{DMSO}(x)$  для образца № 5. Хорошо видимой особенностью распределения  $\rho_{DMSO}$  является большая ширина максимума, находящегося в области полярных головок липида /максимум при  $x = 0$ , так же как у  $\rho_W$ , является артефактом/, его ширина почти вдвое больше, чем для воды, и, следовательно, DMSO проникает глубоко в область полярных головок. Нормируя полученные распределения на известные средние когерентные амплитуды рассеяния нейтронов водой, липидом и DMSO, можно определить относительные количества молекул воды и DMSO в бислое. Эти и некоторые другие характеристики бислоев из EYL и EYL + DMSO приведены в таблице.

Характеристики бислоев из EYL и EYL + DMSO

Таблица

Образец	$d_0, \text{Å}$	$d_L, \text{Å}$	$\frac{n_{H_2O}}{n_L}$	$\frac{n_{DMSO}}{n_L}$	$\frac{\bar{n}_{DMSO}}{n_{H_2O}}$	$\frac{V_{DMSO}}{V_{H_2O}}$
EYL	51,0±0,3	37,4±0,4	5,3±0,3			
EYL + DMSO	48,9±0,3	35,9±0,4	4,2±0,3	0,4	0,09±0,2	0,37

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из сравнения приведенных в таблице величин  $d_0$  и  $d_L$  следует, что уменьшение периода повторяемости мембраны при добавлении DMSO / $\Delta d = 2,1 \text{ Å}$ / произошло в основном за счет уменьшения толщины липидного бислоя / $\Delta d = 1,5 \text{ Å}$ /, в то время как расстояние между полярными головками соседних бислоев изменилось слабее / $\Delta d = 0,6 \text{ Å}$ /. При малом содержании воды уменьшение периода еще более существенное:  $\Delta d_0 = 7,0 \text{ Å}$  для воды EYL + DMSO /образец № 4/ и  $\Delta d_0 = 9,2 \text{ Å}$  для EYL + EG /образец № 3/. И для этих образцов столь большие изменения периода невозможно объяснить уменьшением толщины слоя воды при введении DMSO или EG, т.к. при  $\psi = 20\%$  толщина водной прослойки не превышает  $3 \text{ Å}$  /13/.

Известно /14/, что фосфолипидные мембраны имеют отрицательный тепловой коэффициент расширения для толщины бислоя. Это связывается с усилением разориентации и подвижности концов углеводородных цепей при повышении температуры. Наоборот, при встраивании в бислой молекул с жестким каркасом, как, например, холестерина, происходит упорядочение ориентации углеводородных цепей и, как следствие, увеличение толщины бислоя /15/.

Молекулы DMSO /и EG/ проникают в область полярных головок /но не в область углеводородных цепей, как холестерин/, что приводит к увеличению площади  $\Delta S$ , приходящейся на одну молекулу липида. Анализ фурье-профилей с учетом плотности амплитуды рассеяния в области полярной головки дает, что встраивание DMSO при  $n_{DMSO}/n_L = 0,4$  приводит к  $\Delta S \approx 2,5 \text{ Å}^2$ . В принципе этого достаточно для объяснения уменьшения толщины липидного бислоя при  $\psi = 60\%$ , т.к. при таком увеличении площади появляется возможность дополнительного отклонения углеводородных цепей от перпендикуляра к поверхности бислоя на угол  $\phi$ , определяемый из соотношения /13/:

$$\cos \phi = S_0 / (S_0 + \Delta S) \approx 0,98,$$

где  $S_0 = 40 \text{ Å}^2$  - удвоенная площадь углеводородной цепи. Принимая длину цепи  $l$  примерно равной  $13 \text{ Å}$ , получаем, что уменьшение толщины липидной части бислоя при отклонении цепей есть

$$\Delta d = 2l(1 - \cos \phi) \approx 1,6 \text{ Å},$$

что хорошо согласуется с экспериментальным значением.

Очевидным является значительное уменьшение периода бислоя при малой относительной влажности. Можно предположить, что в этом случае происходит отклонение углеводородных цепей от нормали на углы  $\phi \approx 45^\circ$  для EYL + DMSO и  $\phi \approx 49^\circ$  для EYL + EG. Столь большие отклонения сопровождаются переходом цепей в трансконформацию и упорядочением.

#### 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе доказано, что яичный лецитин в присутствии неводных полярных растворителей DMSO и EG образует классические бислоиные мультислойные структуры. Замена воды на DMSO или EG приводит к значительному уменьшению толщины бислоев. При малой влажности  $\psi = 20\%$  и  $t = 18^\circ\text{C}$  в системах EYL + EG и EYL + DMSO наблюдаются признаки дифракции от упорядоченных углеводородных цепей / $d = 4,2 \text{ Å}$ / на больших углах рассеяния. Возможно, что при этих условиях образцы находятся в  $L_{\beta}$ -фазе с углом отклонения цепей от нормали к ламеллярной плоскости  $\geq 45^\circ$ .

При влажности 60% и  $t = 21^\circ\text{C}$  определено распределение в бислое. Выяснено, что DMSO располагается не только между полярными

головками липидов, но и проникает глубоко в область головок. В этом случае также наблюдается уменьшение толщины липидного бислоя, которое можно объяснить увеличением подвижности углеводородных цепей, связанным с увеличением площади полярной головки при встраивании DMSO.

Авторы выражают признательность И.А.Василенко за предоставленные препараты и полезные обсуждения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Luzzati V. In: Biological Membranes. (Ed.D.Chapman). Academic Press, New York, 1968, p.71.
2. Shipley G.G. In: Biological Membranes. (Ed.D.Chapman, D.Wallach). Academic Press, London, 1973, v.2, p.1.
3. Tardieu A., Luzzati V., Reman F.C. J.Mol.Biol., 1973, 75, p.711.
4. Worcester D.L. In: Biological Membranes. (Ed.D.Chapman, D.Wallach). Academic Press, London, 1976, p.1.
5. Schoenborn B.P. Bioch.Bioph.Acta, 1976, 457, p.41.
6. Worcester D.L., Franks N.P. J.Mol.Biol., 1976, 100, p.359.
7. King G.I., Chao N-M., White S.H. In: Neutrons in Biology. (Ed.B.P.Schoenborn). Plenum Press, New York, 1984, p.159.
8. Василенко И.А. и др. ДАН СССР, 1982, 267, с.402.
9. Петров А.Г., Чумакова С.П., Найденова С.Б. Кристаллография, 1984, 29, с.1138.
10. Балагуров А.М. и др. ОИЯИ, 3-84-291, Дубна, 1984.
11. Балагуров А.М., Горделий В.И., Ягужинский Л.С. Биофизика, 1986, 31, с.31.
12. Torbet J., Wilkins M.H.F. J.Theor.Biol., 1976, 62, p.447.
13. Ивков В.Г., Берестовский Г.И. Динамическая структура липидного бислоя, "Наука", М., 1981.
14. Luzzati V., Husson F. J.Cell.Biol., 1962, 12, p.207.
15. Rand R.P., Pangborn W.A. Bioch.et Bioph.Acta, 1973, 318, p.299.

Рукопись поступила в издательский отдел  
29 сентября 1986 года.

Балагуров А.М., Горделий В.И.

P14-86-644

Влияние этиленгликоля и диметилсульфоксида на мультислойную структуру из яичного лецитина

Методом дифракции нейтронов установлено, что в системах яичный лецитин - этиленгликоль (EYL+EG) и яичный лецитин-диметилсульфоксид (EYL+DMSO) возможно образование мультислойных структур. Период повторяемости образующихся структур существенно меньше, чем в системе яичный лецитин - вода: 51,0 Å для EYL+H<sub>2</sub>O, 41,8 Å для EYL+EG и 44,0 Å для EYL+DMSO при относительной влажности  $\psi = 20\%$  и температуре  $T = 18^\circ\text{C}$ . Возможно, что сжатие бислоя происходит из-за значительного /на угол  $-45^\circ$ / отклонения углеводородных цепей от нормали к поверхности бислоя, сопровождающегося переходом структуры из  $L_\alpha$ - в  $L_\beta'$ -фазу. На системе EYL+DMSO + вода проведен структурный анализ. Из фурье-профиля проекции структуры на нормаль к бислою следует, что молекулы DMSO проникают глубоко в область полярных головок липида.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1986

Перевод Т.Ф.Дроздовой

Balagurov A.M., Gordeliy V.I.

P14-86-644

The Effect of Ethylenglycol and Dimethylsulphoxid on the Multilamellar Structure from Egg Lecithin

There was shown with the help of neutron diffraction methods that the bilayer may be formed in the systems of egg lecithin - ethylenglycol (EYL+EG) and egg lecithin - dimethylsulphoxid (EYL+DMSO). The repeat distance for these structures is significantly smaller than in the egg lecithin - water system: 51.0 for EYL+H<sub>2</sub>O, 41.8 Å for EYL+EG, 44.0 Å for EYL+DMSO at the relative humidity  $\psi = 20\%$ . The "compression" of the bilayer seems to be due to the phase transition from  $L_\alpha$  to  $L_\beta'$  phase. The structure analysis was carried out for the system EYL+DMSO + water. From the Fourier-profile of the structure projection on the normal to the bilayer it is seen that the DMSO molecules are incorporated in the region of polar head groups and between them.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1986