

сообщения
объединенного
института
ядерных
исследований
Дубна

Б 20

P14-87-804

А.М.Балагуров, В.И.Горделий, Г.Клозе*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИЭТИЛОВОГО ЭФИРА
ГЕКСИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ
НА СТРУКТУРУ МОДЕЛЬНЫХ
ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН
МЕТОДОМ ДИФРАКЦИИ НЕЙТРОНОВ

*Университет им.К.Маркса, Лейпциг, ГДР

1987

Воздействия эстеров фосфоновой кислоты на физические свойства мембран изучались в работах ^{/1-4/}. В ^{/3/} было установлено, что в унн-ламеллярных небольших везикулах эстеры встраиваются предпочтн-тельно во внешний монослой мембраны, до относительно больших ко-личеств сохраняют ламеллярную фазу и частично ориентируются в плос-кости бислоя. В ^{/4/} в предположении о непроникновении воды в поляр-ную область мембраны было показано, что эстеры уменьшают толщину бислоя и изменяют гидратационные свойства мембран. Однако их распо-ложение в мембране и детали образующейся структуры до сих пор не изучались.

Целью данной работы является определение методом дифракции нейтронов параметров липидного бислоя и локализация эстеров и воды в яичном лецитине (EYL) в присутствии больших количеств диэтило-вого эфира гексилфосфоновой кислоты (PAE₆) (мольное отношение 2:1). Для этого использовалась ранее разработанная методика разно-стных фурье-синтезов ^{/5,6/}.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

EYL был получен из яичного желтка по методу, описанному в ^{/7/}, его состав проверялся с помощью тонкослойной жидкостной хромато-графии.

Эстеры C₆H₁₃P(O)(OC₂H₅)₂ и C₆D₁₁CH₂P(O)(CD₅)₂ (далее обо-значаются PAE₆ и PAE₆-D₂₁ соответственно) были синтезированы в Тех-ническом университете г. Дрездена. Их чистота контролировалась мето-дами ¹H и ³¹P ЯМР-спектроскопии.

EYL и PAE₆ (или PAE₆-D₂₁) растворялись в этаноле (5% раствор) в мольном соотношении 2:1. Около 0,2 мл этого раствора наносилось на полированную кварцевую пластинку (площадью ~ 6 см²), и раство-ритель медленно испарялся при температуре T = 55 °C, как описано в работе ^{/8/}. Количество образующихся при этом бислоев составляет — 3 · 10³. Мозаичность распределения мультислойной структуры была около 3° (ширина распределения на половине высоты).

Образцы помещались в алюминиевый контейнер, а определенное содержание воды в образце задавалось относительной влажностью паров воды над насыщенными растворами солей. Для установления равнов-есия образец выдерживался при заданной влажности в течение 2÷3 ч. Измерения проведены при двух значениях относительной влажности ψ = 60% и ψ = 97% при температуре T = 20 °C. Для определения фаз струк-

ОТДЕЛ ФИЗИКИ
Б. В. Л. О. В. Е. Н. А.

турных факторов и распределения воды в мембранах образец последовательно насыщался в парах H_2O , D_2O и смеси $H_2O:D_2O$ (мольное отношение 1:1).

Измерения дифракционных спектров проведены на нейтронном дифрактометре ДН-2 с одномерным позиционно-чувствительным детектором на импульсном реакторе ИБР-2 (ЛНФ ОИЯИ) ^{19/}. Интегральный поток на образце составлял $1,3 \cdot 10^7 \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Средний угол рассеяния равнялся $2\theta = 16^\circ$. Первые пять порядков брэгговских дифракционных отражений можно было регистрировать за $1 \div 3 \text{ ч}$ со статистической точностью не хуже 3%, 6-8 порядки отражения имели значительно меньшую интенсивность.

При обработке нейтронограмм выполнялась нормировка на эффективный спектр нейтронов, после чего нейтронограмма переводилась в шкалу межплоскостных расстояний. Положение 1-го порядка дифракционного 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 $\sim 5 \cdot 10^{-3} \text{ см}$ он практически не отличается от единицы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения положения эстера в бислое проводился совместный анализ дифракционных данных, полученных на образцах, содержащих обычный (РАЕ₆) и частично дейтерированный эстер (РАЕ₆-D₂₁). Фазы (знаки) структурных факторов определялись из сравнения их модулей при H_2O - D_2O обмене. На рис.1 приведены зависимости измеренных структурных факторов от содержания D_2O для образцов из EYL и РАЕ₆ (2:1) при $\psi = 97\%$. Как и должно быть для centrosymmetric структур, наблюдается линейная зависимость структурных факторов от степени замещения H_2O на D_2O . Это также означает, что экстинкцией можно пренебречь.

После определения знаков и модулей структурных факторов выполнялся фурье-синтез, т.е. вычислялась проекция распределения плотности амплитуды рассеяния нейтронов на направление, перпендикулярное плоскости бислоя (коротко — "профиль плотности"):

$$\rho(x) = \sum_h F(h) \cdot \cos(2\pi xh/d), \quad (1)$$

где h — номер порядка отражения, d — период бислоя. Разностные фурье-синтезы позволяют построить распределение плотности воды и дейтерированной молекулярной группы:

$$\rho_w(x) = \sum_h (F_{D_2O}(h) - F_{H_2O}(h)) \cdot \cos(2\pi xh/d) \quad (2)$$

и

$$\rho_D(x) = \sum_h (F_D(h) - F_H(h)) \cdot \cos(2\pi xh/d), \quad (3)$$

где F_{D_2O} и F_{H_2O} — структурные факторы для образца в парах D_2O и H_2O соответственно, а F_D и F_H — структурные факторы для образцов с дейтерированной и недейтерированной молекулярными группами при одной и той же ψ . При построении ρ_D приведение структурных факторов F_D и F_H разных образцов в одну шкалу выполнялось с помощью нормировки на распределение воды, которое предполагалось одинаковым в обоих образцах. Разностные профили плотности ρ_w и ρ_D с точностью до постоянного коэффициента соответствуют распределению воды и дейтерированной молекулярной группы в мембране. Кроме того, зная (1) и (2) или (1), (2), и (3), для образцов с эстером можно построить $\rho_L(x)$ — распределение плотности липида.

На рис.2 показаны распределения воды $\rho_w(x)$ в образцах при $\psi = 97\%$ и $\psi = 60\%$. Фурье-профили плотности амплитуды рассеяния нейтронов для воды и бислоя на образцах при $\psi = 97\%$ представлены на рис.3. В соответствии с ^{15/} пики в углеводородной области при $\pm 15,7 \text{ \AA}$ ($\psi = 97\%$) соответствуют карбонильным группам. Расстояние

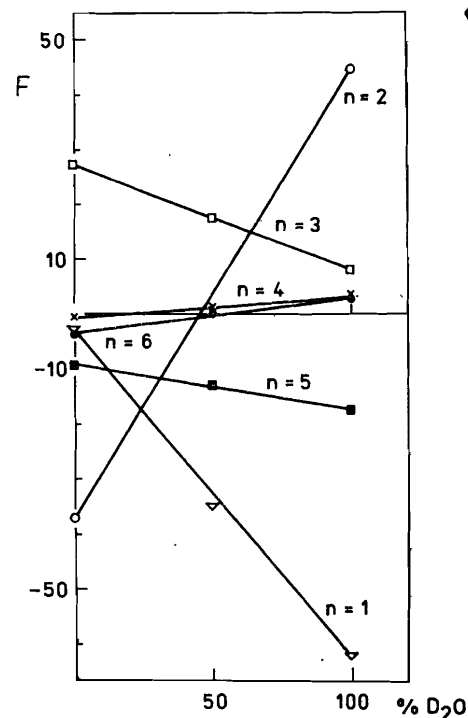
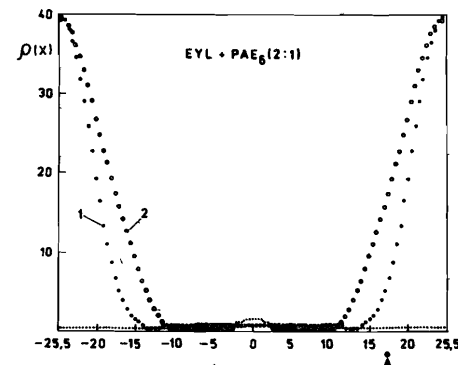


Рис.1. Зависимость структурных факторов от содержания D_2O для образца из EYL + РАЕ₆ (2:1) при $\psi = 97\%$ (F — в относительных единицах). n = 1,2,3,4,5,6 — номера порядков дифракционных отражений.

Рис.2. Распределение воды в исследованных образцах при $\psi = 60\%$ (кривая 1) и $\psi = 97\%$ (кривая 2). Третья кривая соответствует величине экспериментальных ошибок $\Delta\rho(x)$.



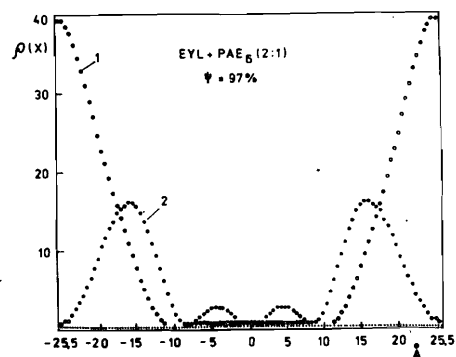


Рис.3. Профили – плотности рассеяния нейтронов для воды (кривая 1) и бислоя (кривая 2) на образцах из EYL + PAE₆(2:1) при $\psi = 97\%$.

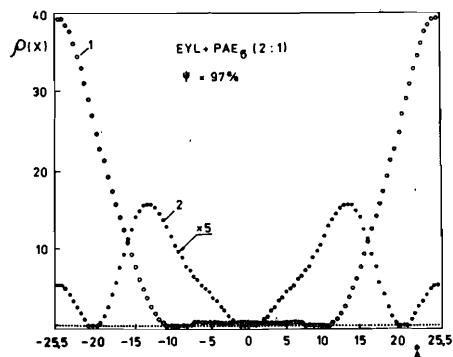


Рис.4. Профили – плотности амплитуды рассеяния нейтронов для воды – кривая 1, эстера – кривая 2 при $\psi = 97\%$.

между пиками $d_L^* = 31,4 \pm 0,5 \text{ \AA}$. На рис.4 показаны профили плотности воды и эстера PAE₆ при $\psi = 97\%$. Максимум распределения в данном случае соответствует среднему положению эфирных групп эстера и расположенных на расстоянии $\ell_{est} = 13,2 \pm 0,5 \text{ \AA}$ от центра бислоя. Если принять, что размер полярной головы липида (средняя длина сегмента $\text{CH}_2\text{PO}_4^-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ в направлении, перпендикулярном ламеллярной плоскости) равен аналогичному размеру такого же сегмента в DPPC (L_α -фаза при $T = 50^\circ\text{C}$) /16, 17/, то толщина бислоя $d_L = d_L^* + 8,8 = 40,2 \text{ \AA}$. Аналогичным образом были определены d , d_L , d_L^* , ℓ_{est} при $\psi = 60\%$.

Из распределения воды в мембране (рис.2) следует, как и ожидалось, что при увеличении влажности количество воды между бислоями увеличивается. Фурье-профили позволяют определить значения n_w/n_L количества молекул воды на молекулу липида /6/. Определенные таким образом значения равны 16 ± 2 , 23 ± 3 для $\psi = 60\%$ и $\psi = 97\%$ соответственно. Значения d , d_L , d_L^* , n_w/n_L и ℓ_{est} при относительных влажностях $\psi = 60\%$ и $\psi = 97\%$ для системы EYL + PAE₆ (2:1), а также аналогичные данные, полученные в работе /6/ для EYL, приведены в таблице.

Значения d_L^* и ℓ_{est} позволяют определить, что фосфоновая группа PAE₆ в среднем локализована около C_3 и C_4 при $\psi = 60\%$ и C_1 при $\psi = 97\%$ атомов углеводородных цепей липидов. То, что PAE₆ расположен относительно глубоко в углеводородной области, также означает, что из всех взаимодействий PAE₆ с мембраной гидрофобные взаимодействия являются доминирующими.

Значения d_L , приведенные в таблице, показывают, что толщина бислоя EYL уменьшается при наличии PAE₆. Этот же эффект был обнаружен при изучении системы из общей липидной фракции яичного желт-

Образец	$\psi\%$	Фаза	$d(\text{\AA})$	$d_L(\text{\AA})$	$d_L^*(\text{\AA})$	$\ell_{est}(\text{\AA})$	n_w/n_L
EYL	60%	L_α	$51,0 \pm 0,3$	$46,2 \pm 0,5$	$37,4 \pm 0,5$		$5,3 \pm 0,3$
EYL + PAE ₆ (2:1)	60%	L_α	$50,1 \pm 0,2$	$42,8 \pm 0,5$	$34,0 \pm 0,5$	$13,3 \pm 0,5$	16 ± 2
	97%	L_α	$51,0 \pm 0,2$	$40,2 \pm 0,5$	$31,4 \pm 0,5$	$13,2 \pm 0,5$	23 ± 2

ка (PL) и PAE₆ /4/. Как видно из рис.4, вода проникает глубоко в область бислоя вплоть до фосфоновых групп эстеров, что, по-видимому, объясняется свойством фосфоновых групп образовывать сильные водородные связи /10/.

ВЫВОДЫ

Таким образом, при добавлении к EYL эстера PAE₆ общая толщина бислоя уменьшается по сравнению с мембраной из чистого EYL. Этот эффект увеличивается при увеличении гидратации мембраны. Полярная голова эстера располагается между C_3 и C_4 атомами при $\psi = 60\%$ ($n_w/n_L \approx 16$) и сдвигается в сторону полярной головы, располагаясь в области C_1 атома, при $\psi = 97\%$ ($n_w/n_L \approx 23$). Гидратационная способность липидных мембран из EYL + PAE₆ значительно возрастает. Эти результаты хорошо объясняют данные, полученные в ЯМР-исследованиях таких систем /3/.

Авторы приносят свою благодарность Б.Кёнигу за помощь в проведении эксперимента, В.Г.Ивкову и Л.С.Ягужинскому за полезные обсуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klose G. et al. Seventh School Proceedibgs, Poland, 1984, p.185.
2. Bayerl Th. et al. Biochem. Biophys. Acta, 1985, 812, p.437.
3. Hentschel M., Klose G. Biochem. Biophys. Acta, 1985, 812, p.447.
4. Klose G. et al., Chem.Phys.Lipids, 1986, 41, p.293.
5. Worchester D.L. Trans. Amer. Cryst.Assoc., 1983, 19, p.37.
6. Балагуров А.М.Горделий В.И. Сообщение ОИЯИ, P14-86-644, Дубна, 1986.
7. Singleton W.S., Brown M.L., White S.L. J.Amer.Oil.Chem.Sol., 1965, 42, p.53.

8. Балагуров А.М., Горделий В.И., Ягужинский Л.С. Биофизика, 1986, в. 31, с.31.
9. Балагуров А.М. и др. ОИЯИ 3-84-291, Дубна, 1984.
10. Gramstad T. Spectrochimica Acta, 1964, 20, p.729.

**ТЕМАТИЧЕСКИЕ КАТЕГОРИИ ПУБЛИКАЦИЙ
ОБЪЕДИНЕННОГО ИНСТИТУТА ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

Индекс	Тематика
1.	Экспериментальная физика высоких энергий
2.	Теоретическая физика высоких энергий
3.	Экспериментальная нейтронная физика
4.	Теоретическая физика низких энергий
5.	Математика
6.	Ядерная спектроскопия и радиохимия
7.	Физика тяжелых ионов
8.	Криогеника
9.	Ускорители
10.	Автоматизация обработки экспериментальных данных
11.	Вычислительная математика и техника
12.	Химия
13.	Техника физического эксперимента
14.	Исследования твердых тел и жидкостей ядерными методами
15.	Экспериментальная физика ядерных реакций при низких энергиях
16.	Дозиметрия и физика защиты
17.	Теория конденсированного состояния
18.	Использование результатов и методов фундаментальных физических исследований в смежных областях науки и техники
19.	Биофизика

Рукопись поступила в издательский отдел
12 ноября 1987 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

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

Д7-83-644	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983.	6 р.55 к.
Д2,13-83-689	Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983.	2 р.00 к.
Д13-84-63	Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике. Братислава, Чехословакия, 1983.	4 р.50 к.
Д2-84-366	Труды 7 Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984.	4 р.30 к.
Д1,2-84-599	Труды VII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1984.	5 р.50 к.
Д10,11-84-818	Труды V Международного совещания по проблемам математического моделирования, программированию и математическим методам решения физических задач. Дубна, 1983.	3 р.50 к.
Д17-84-850	Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1984. /2 тома/	7 р.75 к.
Д11-85-791	Труды Международного совещания по аналитическим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985.	4 р.00 к.
Д13-85-793	Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна, 1985.	4 р.80 к.
Д4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1985.	3 р.75 к.
Д3,4,17-86-747	Труды V Международной школы по нейтронной физике. Алушта, 1986.	4 р.50 к.
	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984. /2 тома/	13 р.50 к.
Д1,2-86-668	Труды VIII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1986. /2 тома/	7 р.35 к.
Д9-87-105	Труды X Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1986. /2 тома/	13 р.45 к.
Д7-87-68	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Дубна, 1986	7 р.10 к.
Д2-87-123	Труды Совещания "Ренормгруппа-86". Дубна, 1986	4 р.45 к.

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

Балагуров А.М., Горделий В.И., Клозе Г.

P14-87-804

Исследование влияния диэтилового эфира гексилфосфоновой кислоты на структуру модельных липидных мембран методом дифракции нейтронов

На нейтронном дифрактометре проведены эксперименты по изучению влияния диэтилового эфира гексилфосфоновой кислоты (эстера PAE₆) на структуру модельной липидной мембраны из яичного лецитина (EYL). Получено распределение плотности амплитуды рассеяния тепловых нейтронов на мембране в направлении, перпендикулярном ламеллярной плоскости. Для системы EYL + PAE₆ (молярное отношение 2:1) при относительных влажностях $\psi = 60\%$ и $\psi = 97\%$ ($T = 20^\circ\text{C}$) определены распределения воды в мембране и толщина бислоя. С использованием дейтерий-меченого эстера и метода разностного фурье-синтеза определено положение эстера. Показано, что диэфирная группа эстера располагается в области карбонильных групп липидов.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Перевод Т.Ф.Дроздовой

Balagurov A.M., Gordeliy V.I., Klose G.

P14-87-804

Neutron Diffraction Studies of the Influence of Phosphonic Acid Esters on the Lipid Membrane Structure

The investigation of the influence of hexane phosphonic acid diethylester (ester PAE₆) on the model lipid membrane structure from egg yolk lecithin (EYL) has been performed with a neutron diffractometer. The distribution of scattering amplitude densities in the perpendicular direction to the lamellar plane has been obtained. The distribution of water was determined for the system EYL + PAE₆ (molar relation 2:1) at relative humidities $\psi = 60\%$ and $\psi = 97\%$ ($T = 20^\circ\text{C}$). With the help of the deuterium labelled esters and the Fourier difference synthesis method the esters groups of phosphonic ester were shown to be placed near the carbonyl groups of lipids.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987