

ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

14-2018-19
На правах рукописи
УДК 577.352.2:538.91:539.171.4

ГОРШКОВА
Юлия Евгеньевна

СТРУКТУРА И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН
В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И ПОЛЯРНЫХ
МОЛЕКУЛ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ

Специальность: 01.04.07 — физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Отпечатано методом прямого репродуцирования
с оригинала, предоставленного автором.

Подписано в печать 05.04.2018.
Формат 60×90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 1,56. Уч.-изд. л. 1,95. Тираж 100 экз. Заказ № 59379.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.
E-mail: publish@jinr.ru
www.jinr.ru/publish/

Дубна 2018

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики имени И.М. Франка Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна, Московская обл., Россия).

Научный руководитель: **Горделий Валентин Иванович**
кандидат физико-математических наук,
консультант, Лаборатория нейтронной физики
имени И.М. Франка, Объединенный институт
ядерных исследований

Официальные оппоненты: **Чупин Владимир Викторович**
доктор химических наук, профессор,
заведующий кафедрой биофизики, заведующий
лабораторией химии и физики липидов,
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования «Московский физико-технический
институт»
Петухов Максим Владимирович
кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник, Федеральный
научно-исследовательский центр
"Кристаллография и фотоника" Российской
академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Петербургский институт ядерной
физики имени Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра
"Курчатовский институт", Лаборатория
нейтронных физико-химических исследований

Защита состоится "28" сентября 2019 г. в 15 часов на заседании
диссертационного совета Д 720.001.06 при Лаборатории нейтронной физики и
Лаборатории ядерных реакций Объединенного института ядерных
исследований (141980, г. Дубна Московской области).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Объединенного института
ядерных исследований.

Автореферат разослан "14" сентября 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 720.001.06

А.Г. Полеко

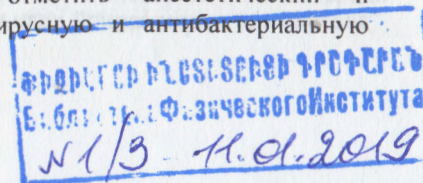
Общая характеристика работы

Актуальность работы. Биологическая мембрана (БМ) – структурный элемент клетки, представляющий собой динамичную функциональную оболочку, которая отделяет клетку от внешней среды (а клеточные органеллы от цитоплазмы клетки) и, кроме того, осуществляет важные клеточные процессы. Основными компонентами БМ являются липиды (фосфолипиды, гликолипиды и др.), белки и холестерин, каждый из которых выполняет важную роль в биофизических и биохимических процессах. Фосфолипидный бислой является структурной основой биологических мембран и выполняет значимую роль в ряде важных физиологических процессов: свертывание крови, проведение нервных импульсов, активация мембранных и лизосомальных ферментов, регенерация тканей, иммунологические реакции, перенос электронов в цепи «дыхательных» ферментов. Кроме того, особая роль фосфолипидам отводится в формировании липопротеиновых комплексов. Значимую часть фосфолипидного бислоя в животном и растительном мире составляют фосфатидилхолин (лецитин, ФХ) и фосфатидилэтаноламин (кефалин, ФЭ). Понимание таких важных проблем, как локализация воды или органических растворителей в мембране, распределение ионов на ее поверхности, изменение структурных параметров самих мембран и межмембранных взаимодействий являлись первостепенными задачами липидологии в конце XX века и остаются актуальными в настоящее время.

Для решения упомянутых выше задач используют, как правило, более простые одно- или двухкомпонентные системы – модельные липидные мембраны: мультислойные везикулы (МСВ) и однослойные везикулы (ОСВ). Среди различных методов исследования модельных мембран малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН) занимает лидирующие позиции, поскольку позволяет проводить структурные исследования в нативной среде с контролем таких важных параметров, как температура и pH.

Понимание механизма переноса различных молекул через мембраны, выполняющие барьерную функцию, имеет большое значение для многих биологических процессов и является ключевым компонентом в развитии таких технологий, как криосохранение биоматериалов, доставка лекарств и генная терапия. Большинство небольших незаряженных молекул (вода, кислород, ...) достаточно свободно диффундируют через мембраны. Транспортировка больших или заряженных молекул, таких как ионы, сахара и аминокислоты, требует активных регуляторных механизмов для быстрого достижения осмотического баланса через плазматические мембраны в ответ на быстрые изменения различных физико-химических свойств.

Диметилсульфоксид (ДМСО) - амфифильная молекула, состоящая из гидрофильной сульфоксидной группы ($S=O$) и двух гидрофобных групп CH_3 - увеличивает проницаемость мембран. Среди важных биологических и медицинских свойств ДМСО следует отметить анестетический и противовоспалительный эффекты, противовирусную и антибактериальную



активность, возможность связывать радионуклиды. Именно благодаря этим уникальным свойствам, изучение взаимодействия ДМСО с липидными мембранами, его влияния на структуру липидного бислоя и межмембранные взаимодействия до сих пор остаются актуальными задачами липидологии. В настоящее время ДМСО широко используется в качестве криопротектора. Важнейшей задачей криобиологии является сохранение, или другими словами восстановление биологических объектов после их размораживания. ДМСО является токсичным для ряда клеток животного и растительного происхождения. В связи с чем, нахождение «нового» криопротектора является приоритетной задачей криобиологии и криомедицины XXI века. Одним из таких «новых» криопротекторов может быть диэтилсульфоксид (ДЭСО), обладающий более выраженным гидрофобным эффектом.

Одной из важнейших функций биологических мембран является их способность отделять клетки от внеклеточной среды. Нарушение целостности мембраны приводит к гибели клеток. Однако в краткосрочном временном масштабе локальные изменения целостности мембраны приводят к созданию новых структур путем слияния или деления клеток. Слияние мембран играет важную роль в физиологических процессах, таких как экзоцитоз, секреция, образование вторичных лизосом. Кроме того, направленное слияние клеток с помощью различных агентов слияния (фьюжн агенты) *in vitro* широко используется для решения ряда проблем в области биомедицины и биотехнологии. Известно, что механизм слияния заряженных и нейтральных липидов, вызванный двух- и трехвалентными катионами (Ca^{2+} , La^{3+} и др.), малыми органическими молекулами (n-гексил бромид, этанол), не зависит от выбора вещества, которым он вызывается, и происходит в три стадии: стерический контакт, полуслияние и слияние. Тем не менее, до сих пор не определены минимальные концентрации веществ, вызывающих слияние мембран, остается открытым вопрос о стабильности образованных систем при изменении внешних, в частности температурных, условий.

Реальные биологические мембраны – комплексные системы со сложным химическим составом. Очевидно, что даже малейшее изменение одной из компонент этой сложной системы могут приводить к существенным изменениям функционирования БМ. Поэтому крайне важно знать, как изменяются физико-химические свойства отдельных компонент системы в присутствии различных молекул или ионов. В данной работе акцент сделан на изучении влияния полярных молекул и ионов Ca^{2+} на структуру и свойства фосфолипидных мембран на основе фосфатидилхолина.

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы является исследование влияния полярных молекул (сульфоксидов) и катионов на структуру и свойства фосфатидилхолиновых мембран. Основное внимание в работе уделено определению роли ионов Ca^{2+} или гидрофобной/гидрофильной природе ДМСО и ДЭСО в балансе сил межмембранного взаимодействия. Для достижения поставленной цели ставились следующие задачи:

1. Определение температуры основного фазового перехода ФХ мембран в присутствии ионов Ca^{2+} и сульфоксидов для приготовленных и спонтанно образованных мультислойных систем.
2. Детальное изучение перехода мультислойных мембран в «несвязное» состояние, индуцируемое увеличением концентрации ионов Ca^{2+} , и определение ряда структурных и физико-химических параметров в области перехода, а так же выявление влияния способа приготовления образцов и температурного режима проведения эксперимента на эти параметры.
3. Проведение сравнительного анализа влияния ДМСО и ДЭСО на структуру ФХ мембран в широком диапазоне концентраций сульфоксидов. Определение роли гидрофобной природы сульфоксидов и степени дегидратации липидного бислоя при взаимодействии сульфоксид-липид.
4. Исследование процесса слияния ФХ мембран в присутствии ионов Ca^{2+} и сульфоксидов ДМСО и ДЭСО. Определение роли различных факторов: времени, концентрации веществ, индуцирующих слияние, условий приготовления образцов на данный процесс. Изучение кинетики слияния однослойных везикул в жидкокристаллической фазе, вызванное добавлением сульфоксидов, и их стабильность.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Ионы кальция, как и полярные апротонные растворители, увеличивают температуру основного фазового перехода из риппл фазы в жидкокристаллическую (ЖК) фазу ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) ФХ мембран. Исчезновение предперехода из гелевой фазы в риппл фазу ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) при мольных долях обоих сульфоксидов ≥ 0.2 свидетельствует о стабилизации гелевой фазы МСВ ДМФХ.
2. Переход мультислойных 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолиновых (ДМФХ) мембран (1.0 мас.%) в «несвязанное» состояние в присутствии ионов Ca^{2+} носит непрерывный характер как в ЖК, так и в гелевой фазах, а сами значения критических концентраций ионов Ca^{2+} , при которых наблюдается обсуждаемый переход, зависят как от массовой доли липида в смеси, так и от условий проведения эксперимента: 0.33 и 0.37 мМ в $L_{\beta'}$ и L_{α} фазах, соответственно, при переходе системы из гелевой в ЖК фазу; $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.56$ мМ при переходе $L_{\alpha} \rightarrow L_{\beta'}$ во всех исследуемых фазах.
3. Предложен способ определения константы связывания ионов Ca^{2+} с липидными молекулами из малоугловых нейтронных данных по значениям критических концентраций ионов и заданных значений концентрации липидов: $K_{\text{Ca}^{2+}} = 22 \text{ М}^{-1}$ в гелевой фазе и $K_{\text{Ca}^{2+}} = 19 \text{ М}^{-1}$ в ЖК фазе; значений ряда физико-химических параметров в области перехода МСВ ДМФХ в «несвязанное» состояние: плотность поверхностного заряда $3.7 \cdot 10^{-2} \text{ Кл/м}^2$ при $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ и $2.6 \cdot 10^{-2} \text{ Кл/м}^2$ при $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$,

изменение энергии Гиббса составляет -7.4 кДж/моль в L_{β} фазе и -8.0 кДж/моль в L_{α} фазе; оценки изменения направления $P-N^+$ диполя относительно направления, перпендикулярного к плоскости мембраны, при связывании ионов Ca^{2+} с полярной головой липидных молекул: 15° в ЖК фазе и 20.6° в гелевой фазе.

4. Сульфоксиды оказывают существенное влияние на структуру ДМФХ мембран. Взаимодействие ДМСО-липид при $X_{ДМСО} = 0.2$ связано со значительной дегидратацией липидного бислоя. Сравнительный анализ влияния ДЭСО и ДМСО на структуру и свойства липидных мембран позволил сделать вывод о значимой роли гидрофобного эффекта, который наиболее выражен в случае ДЭСО.
5. Спонтанные процессы: $МСВ \rightarrow ОСВ$ в присутствии ионов Ca^{2+} , $ОСВ \rightarrow МСВ$ в присутствии сульфоксидов происходят путем слияния ФХ мембран. Показано, что данный процесс, стабильность исходных и образованных систем зависят как от способа приготовления образцов, так и от температурных условий проведения эксперимента. Наиболее стабильной является система сформированных ОСВ ДМФХ в смеси $CaCl_2 \bullet 2H_2O/D_2O$ при концентрации ионов кальция более 0.4 мМ. Система, которая возвращается в исходное состояние, испытывая переходы $ОСВ \rightarrow МСВ$ в ЖК фазе и $МСВ \rightarrow ОСВ$ в области фазового перехода $L_{\alpha} \rightarrow L_{\beta}$, соответствует ОСВ ДМФХ в D_2O при добавлении ДЭСО ($X_{ДЭСО} = 0.1$) в ЖК фазе.

Научная новизна. Впервые определена критическая концентрация ионов кальция, при которой мультислойные везикулы ДМФХ в избытке растворителя переходят из «связанного» состояния в «несвязанное», и впервые показано, что эта концентрация зависит от способа приготовления образцов и температурного режима проведения эксперимента.

Предложен новый метод точного определения константы связывания двухвалентных катионов с липидным бислоем на основе данных малоуглового рассеяния. В работе продемонстрированы уникальные возможности малоуглового нейтронного рассеяния для определения константы связывания комплексов Ca^{2+} -липид и ряда важных термодинамических параметров; определено, что процесс связывания ионов кальция с ДМФХ мембраной является экзотермическим.

На основе данных МУРН впервые проведены расчеты, позволяющие количественно оценить изменение ориентации $P-N^+$ диполя при взаимодействии ионов кальция с полярной головой ФХ мембран.

Впервые исследовано влияние ДЭСО на структуру и свойства ДМФХ в избытке растворителя с помощью методов МУРН и рентгеновского рассеяния, что позволило провести сравнительный анализ с хорошо изученным ДМСО и выявить роль гидрофобных взаимодействий при образовании комплекса

сульфоксид-липид. Впервые с помощью метода вариации контраста количественно показано, что ДМСО с мольной долей 0.2 в растворе ДМСО/вода приводит к значительной дегидратации мембранной поверхности.

Проведение экспериментов МУРН в реальном времени позволило впервые проследить кинетику слияния ФХ мембран, индуцируемого сульфоксидами, и определить факторы, влияющие на скорость и стабильность этого процесса. На основе полученных данных предложена модель слияния многослойных ФХ мембран в присутствии ионов кальция.

Личный вклад диссертанта. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены при непосредственном участии автора. Автор диссертации участвовал в постановке задач, выполнял работы по приготовлению образцов, проводил эксперименты на спектрометре малоуглового рассеяния нейтронов ЮМО и рентгеновском дифрактометре Дрон-4. Обработка и анализ экспериментальных данных также выполнены автором. Диссертант активно участвовал в обсуждении результатов и написании статей, представлении материалов на российских и международных научных мероприятиях.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены диссертантом на российских и международных конференциях и совещаниях: International SAS Workshop, 2006, FLNP JINR, Dubna, Russia; XIX Совещание по использованию рассеяния нейтронов, 2006, Обнинск, Россия; 4-th European Conference on Neutron Scattering, 2007, Lund, Sweden; РСНЭ – НБИК 2009, 2009, ИК РАН, РИЦ КИ, Москва, Россия; Всероссийская научная школа для молодежи «Современная нейтронография: фундаментальные и прикладные исследования функциональных и наноструктурированных материалов», ОИЯИ, 2010, Дубна, Россия; 5th European conference on neutron scattering, 2011, Prague, Czech Republic; SANS-YuMO user Meeting, May 27-30 2011, FLNP, JINR, Dubna, Russia; International Summer School and Workshop "Complex and Magnetic Soft Matter Systems: Physico-Mechanical Properties and Structure", 3-7 September 2012, Alushta, Ukraine; XXII СОВЕЩАНИЕ и Международная молодежная конференция по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния (РНИКС-2012), ПИЯФ НИЦ «Курчатовский институт», 15-19 октября 2012, Зеленогорск, Россия; II Международная конференция "Многомасштабное моделирование структур, строение вещества, наноматериалы и нанотехнологии", 11-14 ноября 2013, Тула, Россия; 17th International Seminar on "Neutron Scattering Investigation in Condensed Matter", Adam Mickiewicz University, May 2014, Poznan, Poland; International Conference "Condensed Matter Research at the IBR-2", 2014, ЛНФ ОИЯИ, Дубна, РФ; Совещание и Молодёжная конференция по использованию рассеяния нейтронов и синхротронного излучения в конденсированных средах: РНСИ-КС-2014, 2014, ФГБУ ПИЯФ, Гатчина, Россия; International Summer School and Workshop "Complex and Magnetic Soft Matter Systems:

Physico-Mechanical Properties and Structure", 2014, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia; International workshop "Structure and Functions of Biomembranes", Joint Institute for Nuclear Research, Moscow Institute of Physics and Technology, 2014, Dolgoprudny, Russia; 16th International Conference on Small-Angle Scattering (SAS-2015), 13-18 September, 2015, Berlin, Germany; Workshop on Condensed matter research by means of neutron scattering methods - CMRNS Dubna, 4-7 July, 2015, Constanta, Romania; International Conference "Condensed Matter Research at the IBR-2", 11-15 October 2015, Dubna, Moscow region, Russia; XXIII Международная конференция "Математика. Компьютер. Образование.", 25-30 января 2016, Дубна, Россия; Future of biology and soft matter research on reactor PIK, 14-16 May, 2017, Peterhof, Russia; 3rd International Summer School and Workshop "Complex and Magnetic Soft Matter Systems: Physico-Mechanical Properties and Structure" – CMSMS'17, 28-30 June, 2017, Dubna, Russian; Workshop on Condensed matter research by means of neutron scattering methods (CMRNS-Dubna-2017), 14-16 July 2017, Constanta, Romania; 17th International Balkan Workshop on Applied Physics and Materials Science (IBWAP-2017), 11-14 July 2017, Constanta, Romania; V Совещание по Малоугловому Рассеянию Нейтронов «МУРомец - 2017», 20-22 сентября 2017, Гатчина, Орлова роща, НИЦ КИ ПИЯФ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 статей в российских и международных научных журналах, индексируемых в базе Scopus [A1-A6]. Часть материалов работы отражена в трудах конференций.

Структура диссертация. Диссертационная работа состоит из списка сокращений и обозначений, введения, четырех глав, заключения, списка цитируемой литературы. Диссертация содержит 139 страниц машинописного текста, включая 57 рисунков, 7 таблиц и 178 библиографических ссылок.

Содержание диссертации

Во введении дано обоснование актуальности работы, сформулированы основная цель и задачи диссертационной работы, обсуждаются научная новизна и значимость исследования влияния ионов Ca^{2+} и сульфоксидов на структуру и свойства ФХ мембран, положения, выносимые на защиту. Обсуждается практическая значимость полученных результатов. Кратко изложена структура и содержание диссертации.

В первой главе представлен литературный обзор по структуре и основным свойствам биологических и липидных мембран, межмембранным взаимодействиям. Рассмотрены физические состояния и фазовые переходы липидных мембран, а так же факторы, влияющие на изменение температуры основного фазового перехода. Также в этой главе обсуждаются проблемы, являющиеся предметом диссертации. Особое внимание уделено таким структурным переходам в липидных мембранах как индуцированное формирование ОСВ в присутствии катионов и слияние ФХ мембран в

присутствии сульфоксидов. Представлено современное состояние изучения взаимодействия ионов кальция с липидными мембранами и дан обзор межмембранных взаимодействий ФХ мембран в присутствии сульфоксидов. В заключении первой главы рассмотрены основные методы, используемые в мембранной биофизике и относящиеся к теме настоящей диссертации, освещены преимущества использования рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей при исследовании биологических объектов.

Вторая глава состоит из описания использованных в работе материалов и методов приготовления модельных однослойных или многослойных ФХ мембран (1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин с протонированными или дейтерированными углеводородными цепями: ДМФХ ($\text{C}_{36}\text{H}_{72}\text{NO}_8\text{P}$), ДМФХ-d54 ($\text{C}_{36}\text{H}_{18}\text{NO}_8\text{PD}_{54}$); 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин: ДПФХ ($\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{NO}_8\text{P}$)) в смеси $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /вода или сульфоксид/вода с заданными концентрациями.

В этой же главе описан спектрометр малоуглового нейтронного рассеяния ЮМО [1], на котором была выполнена основная часть экспериментов, даны его характеристики и описание. Приведены методы первичной обработки спектров МУРН и основные модели для описания рассеяния от однослойных, многослойных везикул и комбинированных систем:

А) Рассеяние на ОСВ. Однослойные везикулы с массовой долей ≤ 2 мас.% (мас.% – массовая доля растворённого вещества в процентах) в растворителе рассматриваются как сильно разбавленные и слабо взаимодействующие между собой монодисперсные центросимметричные частицы, для которых структурный фактор, описывающий взаимодействие между частицами, $S(q) = 1$ [2,3]. В первом приближении однослойные везикулы представляют собой полые сферы с оболочкой (липидный бислой), разделяющей внутреннюю и внешнюю среду. Тогда рассеяние на ОСВ будет описываться форм-фактором, нормированным на объем оболочки, сформированной липидным бислоем, (V_b) [4]:

$$P(q) = \frac{\phi}{V_b} \left[\frac{3V_{in}(\rho_s - \bar{\rho}_m)J_1(qR_{in})}{qR_{in}} + \frac{3V_v(\bar{\rho}_m - \rho_s)J_1(qR_v)}{qR_v} \right]^2 + bkg, \quad (1)$$

где ϕ – объемная доля липидного бислоя, V_{in} и R_{in} – объем и радиус сферы, образованной растворителем внутри мембраны, V_v и R_v – объем и радиус ОСВ, ρ_s и $\bar{\rho}_m$ – плотности длин рассеяния мембраны и растворителя, q – вектор рассеяния, J_1 – сферическая функция Бесселя первого порядка ($J_1 = (\sin(x) - x\cos(x))/x^2$) и bkg – остаточный некогерентный фон, имеющий место в эксперименте по рассеянию нейтронов.

Закон рассеяния на одиночных везикулах в области q , удовлетворяющей условию $1/R_v \leq q \leq 1/R_t$, можно записать в виде приближения Кратки-Порода:

$$I(q) = I_0 q^{-2} \exp[-R_t^2 q^2]. \quad (2)$$

Используя зависимость $\ln(Iq^2)$ от q^2 из радиуса гирации R_g можно определить толщину мембран как $d_b = \sqrt{12} R_g$ с точностью 1 Å [5]. Точное значение d_b может быть получено в соответствии с работой [6];

Б) Рассеяние на МСВ характеризуется дифракционным пиком с амплитудой A и шириной w в области $q \approx 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ на кривой МУРН, который можно описать функцией Гауссиана в виде $A \cdot \exp[-(q - q_0)^2/2w^2]$. По положению q_0 , которому соответствует максимальная интенсивность дифракционного пика, легко определить период повторяемости мультислойной структуры как $d = 2\pi/q_0$.

Для аппроксимации кривой МУРН в полном диапазоне вектора рассеяния q в случае рассеяния на МСВ используется функция:

$$I(q) = Bq^{-\alpha} + A \cdot \exp[-(q - q_0)^2/2w^2] + bkg, \quad (3)$$

где первый член – степенной закон рассеяния с показателем степени $\alpha < 4$ в области малых q , B – масштабный коэффициент;

В) Рассеяние на системах, состоящих из ОСВ и МС. Присутствие различных органических растворителей или ионов в растворителе может приводить к структурным переходам ФХ мембран: ОСВ → МСВ и МСВ → ОСВ. В этом случае при анализе экспериментальных данных необходимо учитывать вклад, как от однослойных, так и от мультислойных везикул. Интенсивность рассеяния для таких комбинированных систем имеет вид:

$$I(q) = I_0 q^{-2} \exp[-R_g^2 q^2] \cdot \left(1 + A \exp\left[-\frac{(q - q_0)^2}{2w^2}\right]\right) + bkg. \quad (4)$$

Третья глава посвящена изучению влияния ионов Ca^{2+} на структуру и фазовые переходы ФХ мембран, приготовленных разными способами и при разных температурных режимах. Проведенные исследования показали, что температура основного фазового перехода в присутствии ионов кальция увеличивается. Так 0.1 мМ ионов Ca^{2+} в растворе $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ сдвигает T_m на 1 °С [A.5].

С увеличением концентрации ионов кальция реализуется переход МСВ ДМФХ в «несвязанное» состояние, которое характеризуется значительным увеличением периода повторяемости (~250 Å) мультислойных мембран, как в гелевой, так и в жидкокристаллической фазах (Рис. 1). Анализ данных, полученных с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов, позволил сделать вывод о непрерывном (нерезком) переходе в обеих фазах. Если подобный характер в ЖК фазе был предсказан теоретически [7-9], то подобный результат для гелевой фазы неожидан. Как известно, жесткость изгиба липидных бислоев в фазе L_β больше, чем в фазе L_α , вследствие чего ондуляции Хельфрига в гелевой фазе подавлены. Полученный выше результат ставит под сомнение такую точку зрения.

Детальный анализ кривых МУРН для ДМФХ МСВ в присутствии ионов Ca^{2+} в диапазоне концентраций 0–1 мМ в смеси $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (Рис. 2, вверху) позволил установить, что значения критических концентраций ионов Ca^{2+} , при которых наблюдается переход МСВ в «несвязанное» состояние, зависят как от массовой доли липида в смеси, так и от условий проведения эксперимента. Для МСВ ДМФХ (1.0 мас.%) эти значения определены из зависимости интегральной площади (S_{img}) дифракционного пика от концентрации ионов кальция (Рис. 2, внизу) как: $C_{\text{Ca}^{2+}}^* = 0.33(3)$ мМ в фазе L_β и $C_{\text{Ca}^{2+}}^* = 0.37(2)$ мМ в фазе L_α при переходе системы из гелевой в жидкокристаллическую фазу (серия образцов А-I), $C_{\text{Ca}^{2+}}^* = 0.56$ мМ при переходе $L_\alpha \rightarrow L_\beta$ во всех исследуемых фазах (серия образцов А-II, Рис. 2).

Для МСВ ДМФХ (0.5 мас.%) линейная аппроксимация зависимости S_{img} от $C_{\text{Ca}^{2+}}$ при $S_{\text{img}} = 0$ дает следующие значения: $C_{\text{Ca}^{2+}}^* = 0.29(2)$ мМ в гелевой фазе и $C_{\text{Ca}^{2+}}^* = 0.33(2)$ мМ в жидкокристаллической фазе (серия образцов А-I).

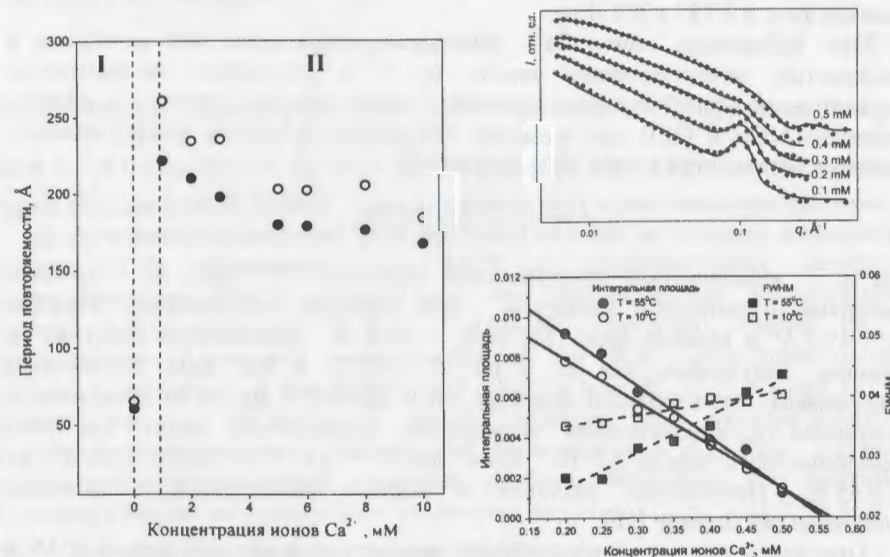


Рис.1. Зависимость периода повторяемости d от концентрации ионов кальция для МСВ ДМФХ 1 мас.% в смеси $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$: открытые круги - в гель ($T = 15$ °С) и закрашенные круги - в ЖК ($T = 55$ °С) фазах в интервале концентраций ионов кальция $0 \text{ мМ} \leq C_{\text{Ca}^{2+}} \leq 10 \text{ мМ}$, пунктирными линиями обозначена область перехода МСВ в «несвязанное» состояние I → II.

Рис.2. Вверху - кривые МУРН для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в смеси $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ в ЖК фазе для серии образцов А-II; внизу - зависимость интегральной площади дифракционных пиков и их полной ширины на уровне половинной амплитуды (FWHM) от $C_{\text{Ca}^{2+}}$ для серии образцов А-II при температурах 55 и 10 °С.

Предложен метод расчета константы связывания ионов Ca^{2+} с мембранной поверхностью ФХ мембран ($K_{\text{Ca}^{2+}}$) при формировании комплексов Ca^{2+} /липид для серии образцов А-I по данным МУРН. Константу связывания можно определить, зная количество связанных ионов кальция (0.08 мМ) с липидными молекулами (X_b , в моль/моль) и используя изотерму адсорбции Ленгмюра в виде:

$$X_b / (1 - nX_b) = K_{\text{Ca}^{2+}} (C_{\text{Ca}^{2+}}^* - X_b C_l), \quad (5)$$

где n – число молекул липида, связанных с одним ионом кальция, C_l – концентрация ДМФХ в мМ. Рассчитанные константы связывания ионов Ca^{2+} с мембранной поверхностью ДМФХ: $K_{\text{Ca}^{2+}} = 22 \text{ М}^{-1}$ в гелевой фазе и $K_{\text{Ca}^{2+}} = 19 \text{ М}^{-1}$ в ЖК фазе находятся в хорошем соответствии с данными, полученными альтернативными методами для нейтрально заряженных ФХ мембран, но с большим значением $C_{\text{Ca}^{2+}}$ и/или при наличии в растворителе ионов Na^+ и Cl^- [10-12]. Отношение количества связанных ионов кальция к количеству липидных молекул в переходной области составляет 1/198 в гелевой фазе и 1/185 в ЖК фазе.

При добавлении ионов Ca^{2+} нейтрально заряженные ФХ мембраны с плотностью поверхностного заряда $\sigma_0 = 0$ становятся положительно заряженными. Приобретенную плотность поверхностного заряда σ в области перехода МСВ в ОСВ для мембран, состоящих только из фосфолипидных молекул, можно определить по формуле [13]:

$$\sigma = \sigma_0 + (2e_0/A_l)X_b, \quad (6)$$

где e_0 – элементарный электрический заряд ($1.6 \cdot 10^{-19}$ Кл), A_l – площадь поверхности липидной молекулы. Для расчетов использованы значения $A_l = 47.2 \text{ \AA}^2$ в гелевой фазе [14] и $A_l = 64.5 \text{ \AA}^2$ (усредненное значение по данным, полученных для 50 и 60 °С в [15]) в ЖК фазе. Вычисления показывают, что в области перехода МСВ ДМФХ 1 мас.% из «связанного» состояния в «несвязанное» мембранная поверхность имеет плотность поверхностного заряда $3.7 \cdot 10^{-2} \text{ Кл/м}^2$ при $T = 15 \text{ °С}$ и $2.6 \cdot 10^{-2} \text{ Кл/м}^2$ при $T = 55 \text{ °С}$. Полученные значения σ хорошо согласуются с данными, полученными ранее в [10].

Определен ряд термодинамических параметров в области перехода МСВ ДМФХ из «связанного» состояния в «несвязанное». Предполагая, что механизм ассоциации липидных молекул с ионами кальция одинаков во всех фазах, константа $K_{\text{Ca}^{2+}}$ изменяется линейно с температурой согласно уравнению Вант-Гоффа [16]

$$\ln K_{\text{Ca}^{2+}} = - \frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}, \quad (7)$$

где R – газовая постоянная ($R = 8,31 \text{ Дж/(моль}\cdot\text{К)}$), ΔH^0 – изменение энтальпии и ΔS^0 – изменение энтропии. Из построения Вант-Гоффа ($\ln K_{\text{Ca}^{2+}}$ от $1/T$), где

наклон прямой равен $-\Delta H^0/R$, а пересечение прямой с осью $\ln K_{\text{Ca}^{2+}}$ есть величина $\Delta S^0/R$, определено: $\Delta H = -3 \text{ кДж/моль}$, $\Delta S = 0.015 \text{ кДж/(моль}\cdot\text{К)}$. Поскольку $\Delta H < 0$, то можно сделать вывод о том, что процесс связывания ионов кальция с ДМФХ мембраной при $C_{\text{Ca}^{2+}} = C_{\text{Ca}^{2+}}^*$ является экзотермическим.

Зная константу связывания $K_{\text{Ca}^{2+}}$, можно определить свободную энергию Гиббса (ΔG^0) – изменение энергии в результате ассоциации ионов Ca^{2+} с мембранной поверхностью. В химических процессах одновременно действуют два противоположных фактора: энтропийный ($T\Delta S$) и энтальпийный (ΔH). Суммарный эффект этих противоположных факторов в процессах, протекающих при постоянном давлении и температуре, определяет изменение энергии Гиббса:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0. \quad (8)$$

Используя соотношения (7) и (8) для величины ΔG^0 можно получить следующее соотношение:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{\text{Ca}^{2+}}. \quad (9)$$

Таким образом, изменение энергии Гиббса составляет -7.4 кДж/моль в L_β фазе и -8.0 кДж/моль в L_α фазе. Поскольку $\Delta G^0 < 0$, то процесс связывания ионов кальция с МСВ ДМФХ – самопроизвольная (экзергоническая) реакция.

Далее проведено сравнение влияния ионов кальция на толщину липидного бислоя ОСВ, образованных из МСВ и приготовленных методом экструдирования (Рис.3). Определено, что формирование однослойных везикул (серия образцов А-I) с толщиной липидного бислоя (d_{bm}), соответствующей толщине липидного бислоя для ОСВ в отсутствие ионов Ca^{2+} (d_{bu}), начинается в предпереходной области при $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.3 \text{ мМ}$ как в гелевой, так и в ЖК фазах. В области перехода МСВ из «связанного» состояния в «несвязанное» наблюдается рост величины d_{bm} . При полном разрушении мультислойной структуры мембран обнаружено, что толщина липидного бислоя не изменяется с увеличением величины $C_{\text{Ca}^{2+}}$ и на $2.5/1.5 \text{ \AA}$ (L_β / L_α) больше, чем величина d_{bu} для ОСВ ДМФХ в D_2O .

Для серия образцов А-II установлено, что из МСВ формируются ОСВ с толщинами бислоев, равными толщинам бислоев приготовленных ОСВ. Добавление ионов кальция на интервале концентраций $0.25 \text{ мМ} \leq C_{\text{Ca}^{2+}} \leq 0.5 \text{ мМ}$ не вносит изменений в структуру липидного бислоя. В указанном диапазоне значения d_{bu} равны $40.2(3) \text{ \AA}$ в L_α фазе, $43.2(3) \text{ \AA}$ и $47.5(2) \text{ \AA}$ в L_β фазе при температурах 15 и 10 °С, соответственно. Эти величины больше, чем толщины ОСВ без добавления ионов Ca^{2+} , для которых определены

следующие значения: 36.2(1) Å при $T = 55^\circ\text{C}$, 41.2(1) Å при $T = 15^\circ\text{C}$ и 41.8(2) Å при $T = 10^\circ\text{C}$.

Основываясь на данных по изменению толщины липидного бислоя, в работе продемонстрировано, что ионы Ca^{2+} , связываясь с полярной головой липидных молекул, изменяют направление P-N⁺ диполя в сторону межмембранного пространства от практически параллельного относительно плоскости ДМФХ мембран в воде (Рис.4): для образцов серии А-II угол α между вектором P-N⁺ и нормалью к плоскости мембраны составляет 65° в L_{α} фазе и 69.4° в L_{β} фазе ($T = 10^\circ\text{C}$) в диапазоне концентраций ионов кальция от 0.4 до 1.0 мМ; для ОСВ, образованных из МСВ (серия образцов А-I), угол α составляет 80° , 74° и 72° при концентрации ионов кальция 0.3, 0.4 и 0.5 мМ, соответственно, в ЖК фазе, для приготовленных ОСВ изменение направления P-N⁺ диполя не обнаружено.

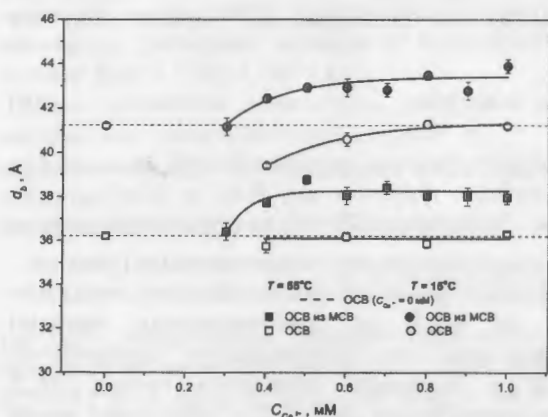


Рис.3. Зависимость толщины липидного бислоя от концентрации ионов кальция для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (серия А-I) и ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в гелевой ($T = 15^\circ\text{C}$) и ЖК ($T = 55^\circ\text{C}$) фазах.

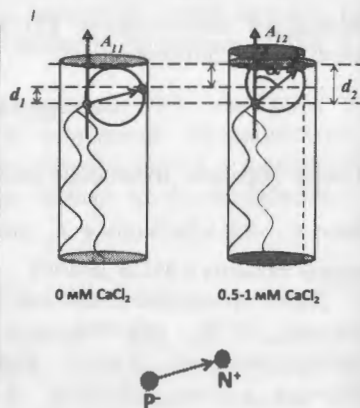


Рис.4. Схематичное изображение изменения направления P-N⁺ диполя в ЖК фазе: слева – ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в D_2O ; справа – ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, полученных из МСВ.

В заключительной части этой главы представлены результаты исследования слияния МСВ ДМФХ (1 мас.%), приготовленных в D_2O , которое индуцируется присутствием ионов кальция во внешней среде с концентрацией ≥ 0.3 мМ в ЖК фазе (Рис.5). Из аппроксимации дифракционных функций Гауссиана (Рис.5.а, правая вставка) получены зависимости ширины (FWHM – w) и интегральной площади дифракционного пика от концентрации ионов кальция (Рис.5.б), откуда следует, что разрушение мультислойной структуры происходит при $C_{\text{Ca}^{2+}}^* = 0.56$ мМ, как и для МСВ ДМФХ,

изначально приготовленных в растворе $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (серия образцов А-II) с заданной концентрацией ионов кальция. Однако для данной системы формирование ОСВ не наблюдается. Оцененные корреляционные длины рассеяния как $\xi = 2\pi/w$ и периоды повторяемости мультислойной структуры как $d = 2\pi/q_0$ представлены на Рис.5.б.

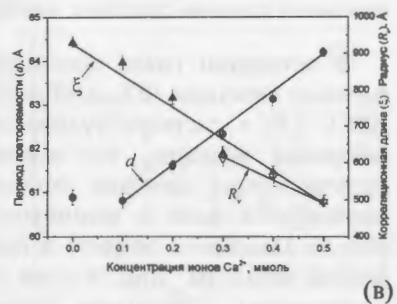
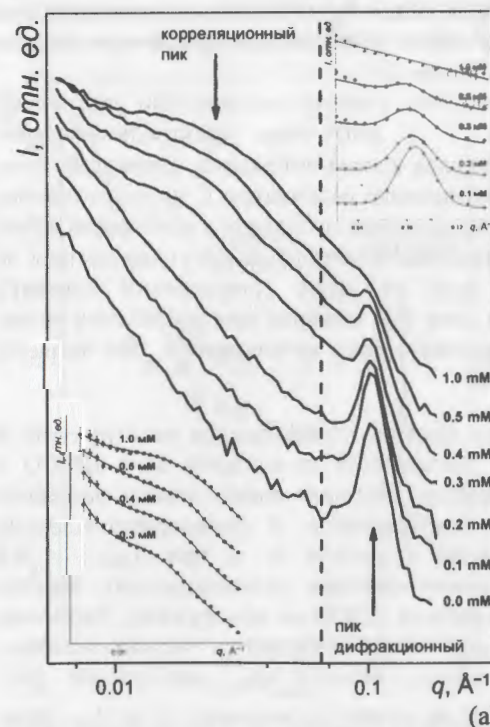


Рис.5. (а) – изменение кривых МУРН для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в D_2O при добавлении ионов кальция; вертикальная пунктирная линия разграничивает области дифракционного и корреляционного пиков, аппроксимация которых функцией Гауссиана представлена линиями на вставках для экспериментальных данных (точки) для соответствующих концентраций; (б) – зависимость интегральной площади (S_{int}) и ширины (w) дифракционного пика от концентрации ионов кальция; (в) – зависимость периода повторяемости (d), корреляционной длины (ξ), определенных из аппроксимации дифракционного пика, и радиуса везикул (R_v), определенного из аппроксимации корреляционного пика, от концентрации ионов кальция.

По положению q_0 широкого пика, которое определено из аппроксимации экспериментальных данных функцией Гауссиана (Рис.5.а, левая вставка), можно вычислить характерный размер сформированных объектов, на которых происходит рассеяние. Так $R_g = 2\pi/q_0$ составляет 366.5, 338.1 и 296.3 Å для $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.3, 0.4$ и 0.5 мМ, соответственно. Предполагая, что сформированные

объекты имеют сферическую форму с $R_v = (5/3)^{1/2}R_g$, получены радиусы 610.9, 563.6 и 493.8 Å для указанных выше концентраций. Эти значения совпадают с корреляционными длинами рассеяния с учетом ошибок их определения, полученных при анализе дифракционных пиков для тех же концентраций: 624.9, 573.4 и 494.6 Å. Количество слоев МСВ, которое может быть оценено как $N = \xi/d$, в интервале концентраций ионов кальция от 0.3 до 0.5 мМ уменьшается с 10 до 7. На основе этих данных предложена модель слияния ФХ мембран в присутствии ионов Ca^{2+} .

Таким образом, в работе показано, что, с одной стороны, при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} ($C_{\text{Ca}^{2+}} \geq 1$ мМ) силы электростатического отталкивания вносят существенный вклад в межмембранные взаимодействия, вызывая разбегание бислоев на значительные расстояния. С другой стороны, электростатическое отталкивание в присутствии небольшого количества ионов кальция ($C_{\text{Ca}^{2+}} < 1$ мМ) легко преодолимо, и мембраны могут находиться на достаточно близком расстоянии друг от друга (стерический контакт), Частичная дегидратация липидного слоя ФХ мембран при добавлении ионов Ca^{2+} приводит к ослабеванию гидратационного отталкивания. Это является причиной слияния соседних мембран.

В четвертой главе обсуждается влияние сульфоксидов на структуру и фазовые переходы ФХ мембран в зависимости от мольной доли ДМСО и ДЭСО (X) в растворе сульфоксид/вода. Методом малоуглового рассеяния нейтронов показано, что период повторяемости d свежеприготовленных мультислойных мембран уменьшается с ростом X , и при $X_{\text{ДМСО}} = 0.8$ формируется фаза с взаимным проникновением углеводородных хвостов (Рис.6). Подобного эффекта в присутствии ДЭСО не обнаружено. Частичная замена воды на ДМСО до $X_{\text{ДМСО}} = 0.13$ приводит к незначительному уменьшению толщины однослойных везикул d_b , дальнейший рост концентрации ДМСО до $X_{\text{ДМСО}} = 0.4$ не влияет на величину d_b в $L_{\beta'}$ фазе. Увеличение мольной доли ДМСО в растворе ДМСО/вода практически не влияет на толщину ОСВ в исследуемом диапазоне $X_{\text{ДМСО}}$ в L_{α} фазе [A1]. Линейное уменьшение толщины однослойных везикул ДМФХ было обнаружено в диапазоне мольных долей 0-0.2 ДЭСО в растворе ДЭСО/ D_2O с 41.2 Å до 34.1 Å в $L_{\beta'}$ фазе и с 36.2 Å до 27.5 Å в L_{α} фазе [A4]. Причиной подобного влияния сульфоксидов на толщину липидного бислоя является увеличение роли гидрофобных взаимодействий в случае ДЭСО. Подобное уменьшение величины d_b может быть следствием как большего наклона P^--N^+ диполя в сторону межмембранного пространства, как это имеет место в гелевой фазе в случае ДМСО [17], так и связано с конформационными изменениями ФХ молекул.

Комплементарное использование величин d и d_b позволило определить межмембранное расстояние (d_s). Показано, что d_s значительно уменьшается с

ростом $X_{\text{ДМСО}}$, и при $X_{\text{ДМСО}} = 0.4$ соседние мембраны находятся практически в стерическом контакте друг с другом, что приводит к слиянию одиночных мембран с образованием мультислойной структуры. Это означает, что увеличение мольной доли ДМСО приводит к уменьшению действия короткодействующих сил отталкивания: как гидратационных, проявляющих свое действие на расстоянии 4-8 Å, так и стерических, когда расстояние между соседними мембранами становится менее 4 Å.

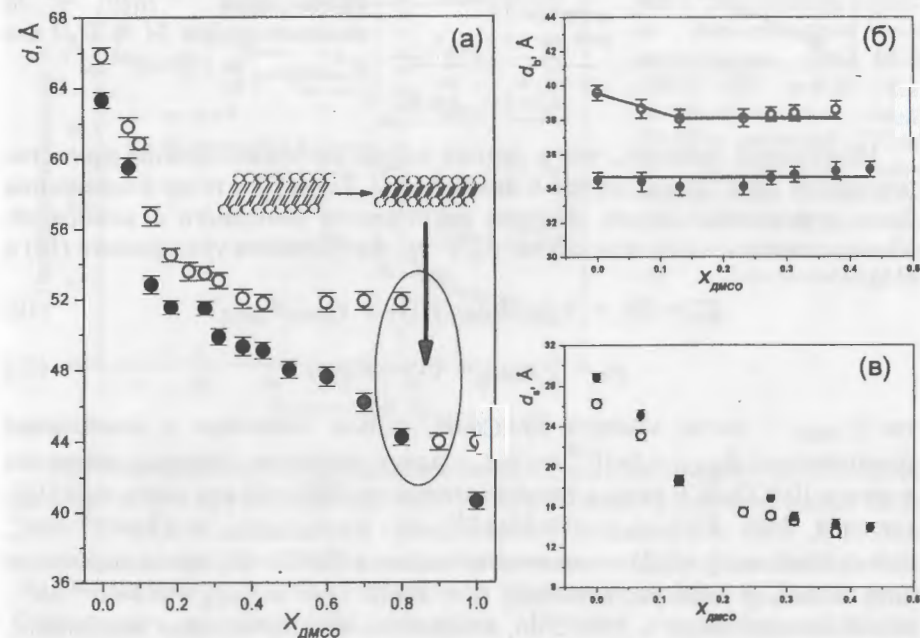


Рис.6. Зависимости (а) периода повторяемости d , (б) толщины липидного бислоя d_b и (в) межмембранного расстояния $d_s = d - d_b$ от мольной доли ДМСО для ДМФХ-d54 мембран (2 мас.%) в растворе ДМСО/вода в гелевой ($T = 12.5$ °C) и ЖК ($T = 55$ °C) фазах. Открытые и закрашенные круги соответствуют гелевой и ЖК фазам.

Использование дейтерированного ДМСО и метод вариации контраста по воде позволили впервые оценить количество молекул ДМСО, сильно связанных с мембраной при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ [A1]. Определение зависимости интенсивности в нулевой угол $I(0)$ от $\Delta\rho$ дает возможность вычислить точку компенсации $I(0) = 0$ при $\bar{\rho}_m = \rho_s$ [5], как следует из уравнения $I(0) = \sum n_i (\bar{\rho}_m - \rho_s)^2 V_i^2$. Точка компенсации определена из Рис.7.

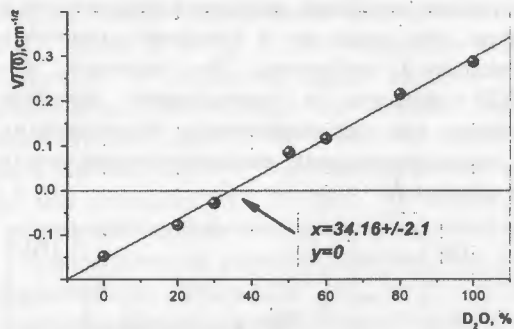


Рис.7. Зависимость $\sqrt{I(0)}$ от процентного содержания D_2O для ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в растворе ДМСО-d6/вода в гелевой фазе ($T = 15^\circ C$). Мольная доля ДМФХ-d6 $X_{DMCO-d6} = 0.2$. Точка компенсации ($I(0) = 0$) соответствует 34 % D_2O или $\rho_{s,matching} = 3.53 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$.

Необходимо отметить, что в данном случае не предполагается равенство отношений ДМСО/вода внутри и вне липосом. Тогда ρ_s в точке компенсации будет определяться также объемом растворителя связанного с мембраной. Можно показать, что в этом случае $\bar{\rho}_m$ и ρ_s определяются уравнениями (10) и (11):

$$\bar{\rho}_m = (b_l + n_{DMCO} b_{DMCO}) / (V_l + V_{DMCO} b_{DMCO}) \quad (10)$$

$$\rho_s = \chi \rho_{DMCO} + (1 - \chi) \rho_w, \quad (11)$$

где n_{DMCO} — число молекул ДМСО-d6, сильно связанных с мембранной поверхностью, $b_{DMCO} = 6 \cdot 10^{-12} \text{ см}$ и b_w — длины рассеяния тепловых нейтронов молекул ДМСО-d6 и воды в точке компенсации ($I(0) = 0$) для смеси H_2O/D_2O , где для 34% D_2O $b_w = 0.54 \cdot 10^{-12} \text{ см}$ и $\rho_{s,matching} = 3.53 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$, соответственно, $\chi = 0.25$ — количество молекул ДМСО-d6, приходящихся на одну молекулу воды растворителя, $V_w = 30 \cdot 10^{-24} \text{ см}^3$ и $V_{DMCO} = 118 \cdot 10^{-24} \text{ см}^3$ — объем молекул воды и ДМСО-d6, соответственно. Вычисления показывают, что ДМСО-d6 достаточно сильно взаимодействует с полярной головкой липида, проникая в гидрофильную область липидного бислоя. Число таких «избыточных» молекул ДМСО-d6 в гелевой фазе равно 3.65, а общий объем молекул ДМСО равен 430 \AA^3 , что сравнимо с объемом самой полярной головы липидной молекулы и объясняет ранее наблюдавшийся фазовый переход липидной мембраны в фазу с взаимным проникновением цепей. Полученный результат позволил сделать вывод о том, что присутствие ДМСО в растворе ДМСО/вода с мольной долей $X_{DMCO} = 0.2$ приводит к значительной дегидратации мембранной поверхности.

Для исследования влияния ДЕСО на температуру основного фазового перехода ФХ мембран был использован метод рентгеноструктурного анализа, измерения выполнены на дифрактометре ДРОН-4 [A3], адаптированном для исследования коллоидных систем. На примере МСВ ДПФХ (50 мас.%) определено: диэтилсульфоксид, как и диметилсульфоксид увеличивает температуру основного фазового перехода ФХ мембран; зависимость T_m от

X_{DES} носит экспоненциальный характер; существенного увеличения T_m при полной замене воды на диэтилсульфоксид, как это имеет место в случае $X_{DMCO} = 1$, не обнаружено. При мольных долях обоих сульфоксидов ≥ 0.2 происходит стабилизация гелевой фазы МСВ ДМФХ, о чем свидетельствует исчезновение риппл фазы, основной фазовый переход с увеличением X_{DES} протекает в более узком температурном диапазоне (Рис.8).

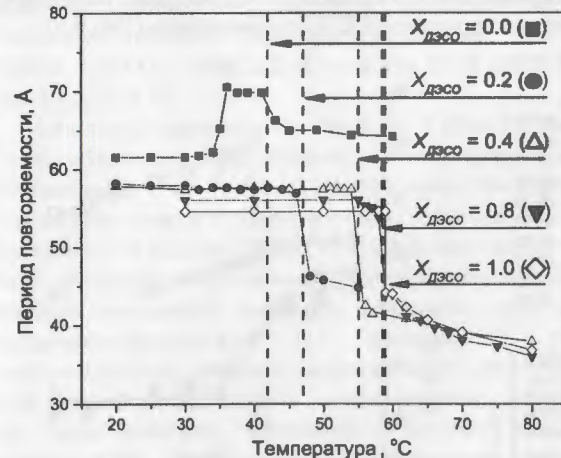


Рис.8. Зависимость периода повторяемости от температуры для МСВ ДПФХ (50 мас.%) для различных мольных долей ДЭСО в растворе ДЭСО/ H_2O . Вертикальные пунктирные линии соответствуют температурам основных фазовых переходов для соответствующих X_{DES} .

Изучены свойства сульфоксидов в качестве агентов слияния однослойных везикул на примере двух систем: ОСВ ДМФХ в смеси сульфоксид/вода и ОСВ ДМФХ в воде с добавлением сульфоксидов. Показано, что ОСВ ДМФХ в смеси сульфоксид/вода стабильны длительное время только при $X \leq 0.1$. При увеличении мольной доли сульфоксидов происходит слияние ОСВ, при этом формируется мультислойная структура. Изучена зависимость скорости слияния мембран от используемого агента слияния и его концентрации в растворе сульфоксид/вода. При $X = 0.2$ исследуемый процесс занимает 1/2 и 1 час от момента приготовления образцов в смесях ДЭСО/вода и ДМСО/вода, соответственно; слияние свежеприготовленных ОСВ происходит при меньших концентрациях ДЭСО (0.3), чем ДМСО (0.4) в смеси сульфоксид/вода [A4]. Температуры основных фазовых переходов для сформированных МСВ выше, чем для приготовленных МСВ (T_m увеличивается на $4.7^\circ C$ при $X_{DES} = 0.2$) [A6].

Слияние однослойных мембран характерно и при добавлении сульфоксидов к ОСВ ДМФХ (2 мас.%), приготовленных в воде. Формирование стабильной мультислойной структуры в ЖК фазе происходит в течение нескольких минут после добавления ДМСО с мольной долей 0.1 и 0.2, в то время как формирование стабильных МСВ при добавлении ДЭСО занимает около 3-х часов. Процесс носит постепенный характер в исследуемом временном интервале: уменьшается толщина липидного бислоя и увеличивается количество мультислоев до 4/5 при $X_{DMCO} = 0.1/0.2$.

Сформированные МСВ в присутствии ДМСО ($X_{\text{ДМСО}} = 0.1, 0.2$) и ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$) стабильны во всем диапазоне исследованных температур, как при переходе $L_{\alpha} \rightarrow L_{\beta}$, так и при переходе $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$.

Переход МСВ в ОСВ обнаружен только для системы в присутствии ДЭСО с мольной долей 0.1 при охлаждении в области температуры основного фазового перехода, при нагревании структура ОСВ не изменялась (Рис.9.а).

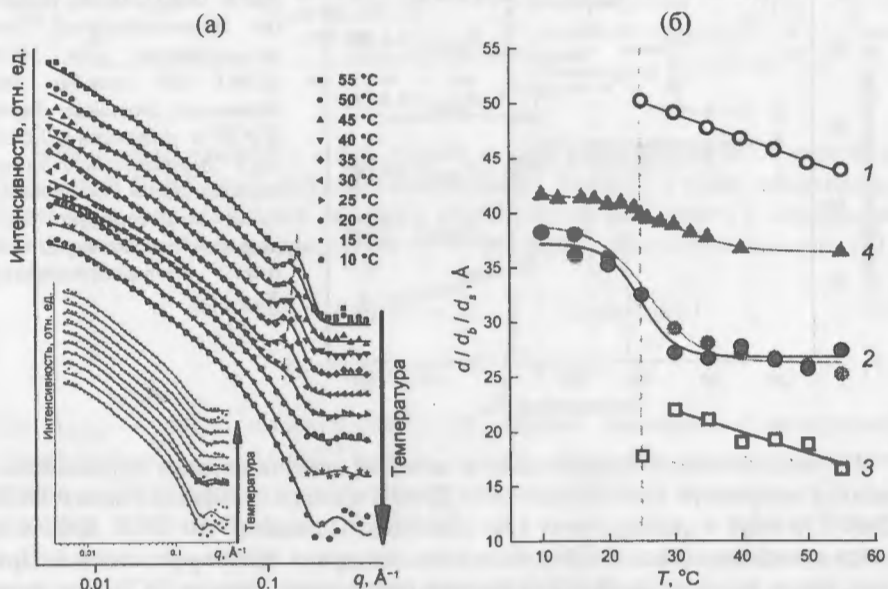


Рис.9. (а) - Изменение кривых МУРН для ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в D_2O после добавления ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$) и стабилизации в течение 3 ч при $T = 55^\circ\text{C}$ при охлаждении от 55 до 10°C и нагревании от 10 до 55°C (вставка). Пунктирной линией показано изменение положения q_0 ; (б) - Температурная зависимость структурных параметров системы, полученной для ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в D_2O после добавления ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$): периода повторяемости МСВ d (1); толщины липидного бислоя d_b (2); межмембранного расстояния d_s (3); толщины липидного бислоя ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в D_2O (4). Черные символы - нагревание, серые символы - охлаждение. Линии - аппроксимация функцией (10) параметра d_b и прямых параметров d и d_s . Вертикальная пунктирная линия обозначает температуру основного фазового перехода для ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в D_2O при добавлении ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$).

Для исследуемой системы величина T'_m определена как $24.8(9)$ °C из аппроксимации зависимости толщины липидного бислоя от температуры функцией Больцмана (Рис.9.б, синие круги). До указанной температуры наблюдается линейный рост периода повторяемости от $43.9(1)$ до $50.2(2)$ Å, в то время как толщина липидного бислоя фактически не изменяется в ЖК фазе, среднее значение d_b можно принять равным $26.9(5)$ Å, и растет до $32.5(2)$ Å при $T = 25$ °C, что связано с увеличением расстояний между углеводородными

группами гидрофобного хвоста липидных молекул. В гелевой фазе, при температуре 10 °C, $d_b = 38.3(2)$ Å для ОСВ ДМФХ в D_2O с добавлением ДЭСО, что на 2.9 Å меньше, чем определено для ОСВ ДМФХ в D_2O , но на 0.8 Å больше, чем определено для ОСВ ДМФХ в ДЭСО/ D_2O . При увеличении температуры от 10 до 55 °C ОСВ ДМФХ остаются стабильными. Значение T_m для них определено как $25.9(9)$ °C, в ЖК фазе от 30 до 55 °C наблюдается линейное уменьшение толщины липидного бислоя от $29.4(1)$ до $25.2(1)$ Å. Последнее значение существенно меньше, чем было определено для ОСВ ДМФХ в D_2O ($d_b = 36.2(2)$ Å) или для ОСВ ДМФХ в ДЭСО/ D_2O ($d_b = 31.4(3)$ Å при $X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$).

Используя зависимости d и d_b от T (Рис.9.б) можно определить изменение межмембранного расстояния в предпереходной области, используя соотношение $d_s = d - d_b$. Вычисления показывают, что расстояние между соседними слоями с уменьшением температуры от 55 до 30 °C возрастает линейно с $16.5(2)$ до $22.0(1)$ Å и уменьшается до $17.8(2)$ Å при $T = 25$ °C. При этой температуре увеличивается толщина липидного бислоя до $32.5(2)$ Å. В области основного фазового перехода, при переходе из "неаклонной" жидкокристаллической в "наклонную" гелевую фазу, везикулы деформируются за счет неоднородной кривизны мембраны, возникающей вследствие формирования топологических дефектов в направлении наклона, как было показано, например, в случае гигантских однослойных везикул ДМФХ [18]. Уменьшение гидратационного отталкивания в области T'_m приводит к сближению соседних бислоев, и в результате наблюдается слияние мембран, которое сопровождается разрушением мультислойной структуры. Поскольку молекулы ХФ мембран содержат как гидрофильную полярную голову, так и гидрофобную часть - углеводородные хвосты, система стремится замкнуться. В итоге формируются ОСВ, которые стабильны и в гелевой фазе, и при переходе $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$, и в ЖК фазе.

В заключении кратко обобщены результаты проведенных исследований.

Основные результаты и выводы диссертационной работы:

1. В результате исследования фазовых переходов ФХ мембран установлено, что уже незначительное содержание ионов кальция (0.1 мМ) в растворе $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/D_2O$ приводит к росту температуры основного фазового перехода ДМФХ мембран. Увеличение мольной доли ДЭСО в растворе сульфоксид/вода: (1) приводит к значительному росту величины T_m ; (2) стабилизирует гелевую фазу при $X_{\text{ДЭСО}} \geq 0.2$, как и ДМСО; (3) уменьшает температурный диапазон перехода при $X_{\text{ДЭСО}} = 0.8$ до 1°C .
2. Определено, что переход МСВ ДМФХ (1.0 мас.%) в «несвязанное» состояние в присутствии ионов Ca^{2+} носит непрерывный характер как в ЖК, так и в гелевой фазах, и сопровождается формированием однослойных везикул с толщиной липидного бислоя, практически

соответствующей толщине липидного бислоя для ОСВ в отсутствии ионов Ca^{2+} . Значения критических концентраций ионов Ca^{2+} , при которых наблюдается обсуждаемый переход, зависят от массовой доли липида в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ и от температурных условий проведения эксперимента. Эти значения определены как: 0.33 и 0.37 мМ в L_{β} и L_{α} фазах, соответственно, при переходе системы из гелевой в ЖК фазу; $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.56$ мМ при переходе $L_{\alpha} \rightarrow L_{\beta}$ во всех исследуемых фазах.

- Впервые по данным МУРН предложен способ определения константы связывания ионов Ca^{2+} с липидными мембранами: $K_{\text{Ca}^{2+}} = 22 \text{ M}^{-1}$ в гелевой фазе и $K_{\text{Ca}^{2+}} = 19 \text{ M}^{-1}$ в ЖК фазе; определен ряд физико-химических параметров в области перехода МСВ ДМФХ в «несвязанное» состояние: плотность поверхностного заряда $3.7 \cdot 10^{-2} \text{ Кл/м}^2$ при $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ и $2.6 \cdot 10^{-2} \text{ Кл/м}^2$ при $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$, изменение энергии Гиббса составляет -7.4 кДж/моль в L_{β} фазе и -8.0 кДж/моль в L_{α} фазе; установлено, что процесс связывания ионов кальция с ДМФХ мембраной при $C_{\text{Ca}^{2+}} = C_{\text{Ca}^{2+}}^*$ является экзотермическим ($\Delta H = -3$ кДж/моль, $\Delta S = 0.015$ кДж/(моль·К)); оценено изменение направления $\text{P}-\text{N}^+$ диполя при связывании ионов Ca^{2+} ($0.4 \geq C_{\text{Ca}^{2+}} \geq 1.0$ мМ) с полярной головой липидных молекул: 15° в ЖК фазе и 20.6° в гелевой фазе.
- Установлено, что взаимодействие ДМСО-липид при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ связано со значительной дегидратацией липидного бислоя. Использование дейтерированного ДМСО и метода вариации контраста по воде позволили впервые определить количество молекул ДМСО, сильно связанных с мембраной при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$. Их число равно 4, а общий объем таких молекул равен 430 \AA^3 .
- Определено, что ДЭСО существенным образом уменьшает толщину липидного бислоя ФХ мембран: линейное уменьшение толщины однослойных везикул ДМФХ было обнаружено в диапазоне мольных долей 0-0.2 ДЭСО в растворе ДЭСО/ D_2O в L_{β} и L_{α} фазах, в то время как увеличение мольной доли ДМСО в растворе ДМСО/вода практически не влияет на толщину ОСВ в исследуемом диапазоне $X_{\text{ДМСО}}$ в L_{α} фазе.
- Сравнительный анализ влияния ДЭСО и ДМСО на структуру и свойства липидных мембран позволил сделать вывод о важности гидрофобных взаимодействий при взаимодействии ДЭСО-липид.
- Спонтанные процессы $\text{МСВ} \rightarrow \text{ОСВ}$ в присутствии ионов Ca^{2+} и $\text{ОСВ} \rightarrow \text{МСВ}$ в присутствии сульфоксидов происходят путем слияния ФХ мембран. Показано, что слияние ФХ мембран, а также стабильность исходных и образованных систем зависят как от способа приготовления образцов, так и от температурных условий проведения эксперимента. Наиболее стабильной является система сформированных ОСВ ДМФХ в смеси $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$

при концентрации ионов кальция более 0.4 мМ. Система, которая возвращается в исходное состояние, испытывая переходы $\text{ОСВ} \rightarrow \text{МСВ}$ в ЖК фазе и $\text{МСВ} \rightarrow \text{ОСВ}$ в области фазового перехода $L_{\alpha} \rightarrow L_{\beta}$, соответствует ОСВ ДМФХ в D_2O при добавлении ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$) в ЖК фазе.

Основное содержание диссертации опубликовано в работах:

- Горшкова Ю.Е., Горделий В.И., Исследование взаимодействия диметилсульфоксида с липидными мембранами с помощью малоуглового рассеяния нейтронов, (2007) Кристаллография, Т. 52, № 3, с. 560-563
- Куклин А.И., Рогов А.Д., Горшкова Ю.Е., Утробин П.К., Ковалев Ю.С., Рогачев А.В., Иванов О.И., Кутузов С.А., Соловьев Д.В., Горделий В.И., Анализ спектров и потоков от криогенных и тепловых замедлителей нейтронов реактора ИБР-2 по результатам моделирования и экспериментов на установке малоуглового рассеяния ЮМО, (2011) Письма в ЭЧАЯ, т. 8, №2(165), с. 200-217.
- Gorshkova, Yu.E., Ivankov, O.I., Kuklin, A.I., Gordeliy, V.I. Investigation of DESO/LIPID membranes interaction by X-ray scattering (2012) IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series, 351 (1), art. no. 012006. DOI: 10.1088/1742-6596/351/1/012006
- Gorshkova, Yu.E. Fusion of unilamellar DMPC vesicles in presence of the sulfoxides: Effect of time and concentration (2015) Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, 17 (9-10), pp. 1532-1537.
- Ю. Е. Горшкова, А. И. Куклин, В. И. Горделий, Структура и фазовые переходы мультислойных везикул ДМФХ в присутствии ионов Ca^{2+} , (2016) Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, № 11, с. 34-45. DOI: 10.7868/S0207352816110068
- Gorshkova, Yu.E., Ivankov, O.I. Structure and phase transitions of the multilamellar DMPC membranes in presence of the DMSO and DESO sulfoxides (2017) IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series 848, 012014. DOI: 10.1088/1742-6596/848/1/012014

Список цитируемой литературы

- Kuklin A.I., Islamov A.Kh., Gordeliy V.I., Two-Detector System for Small Angle Neutron Scattering Instrument, Neutron News, 2005, 16 (3): 16-18. DOI: 10.1080/10448630500454361
- Knoll W., Haas J., Sturhrmann H.B., Fuldner H.H., Vogel H. and Sackmann E., Small-angle neutron scattering of aqueous dispersions of lipids and lipid mixtures. A contrast variation study, *J. Appl. Cryst.*, 1981, 14: 191-202. DOI: 10.1107/S0021889881009102

3. Nawroth T., Conrad H. and Dose K., Neutron small angle scattering of liposomes in the presence of detergents, *Physica B*, 1989, 156: 477–480. DOI: 10.1016/0921-4526(89)90708-4
4. Guinier A. and Fournet G. *Small-Angle Scattering of X-Rays*. John Wiley and Sons, New York. 1955.
5. Feigin L.A., Svergun D.I. *Structure Analysis by Small-angle X-ray and Neutron Scattering*. Plenum Press, New York and London. 1987. DOI: 10.1002/actp.1989.010400317
6. Gordeliy V.I., Cherezov V., Teixeira J., Strength of thermal undulations of phospholipid membranes, *Phys. Rev. E*, 2005, 72: 061913. DOI: 10.1103/PhysRevE.72.061913
7. Petersen O.H., Michalak M. Verkhatsky A., Calcium signalling: Past, present and future, *Cell Calcium*, 2005, 38(3-4): 161–169. DOI: 10.1016/j.ceca.2005.06.023
8. Lipowsky R. and Zelinska B., Binding and unbinding of lipid membranes. A Monte Carlo Study, *Phys. Rev. Lett.*, 1989, 62: 1572–1575. DOI: 10.1103/PhysRevLett.62.1572
9. Helfrich W. Mean field theory of n-layer unbinding, *J. Phys. II France*, 1993, 3(3): 385–393. DOI: 10.1051/jp2:1993100
10. Oshima H., Inoko Y. and Mitsui T., Hamaker constant and binding constants of Ca^{2+} and Mg^{2+} in dipalmitoyl phosphatidylcholine/water system, *J. Colloid Interface Sci.*, 1982, 86: 57–72. DOI: 10.1016/0021-9797(82)90041-8
11. Altenbach Ch. and Seelig J., Ca^{2+} binding to phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium magnetic resonance. Evidence for the formation of a Ca^{2+} complex with two phospholipid molecules, *Biochemistry*, 1984, 23(17): 3913–3920. DOI: 10.1021/bi00312a019
12. Satoh K., Determination of binding constants of Ca^{2+} , Na^+ , and Cl^- ions to liposomal membranes of dipalmitoylphosphatidylcholine at gel phase by particle electrophoresis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1239(2): 239–248. DOI: 10.1016/0005-2736(95)00154-U
13. Seelig, J., Interaction of phospholipids with Ca^{2+} ions. On the role of the phospholipid head groups, *Cell. Biol. Int. Rep.*, 1990, 14(4): 353–360. DOI: 10.1016/0309-1651(90)91204-H
14. Tristra-Nagle S., Liu Yu., Legleiter J., Nagle J.F., Structure of Gel Phase DMPC Determined by X-Ray Diffraction, *Biophys. J.*, 2002, 83: 3324–3335. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75333-2

15. Kučerka N., Nieh M-P, Katsaras J., Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature, *BBA–Biomembranes*, 2011, 1808(11): 2761–2771. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.07.022
16. Atkins P. W.; De Paula J., Section 7.4: The Response of Equilibria to Temperature. – In: *Physical Chemistry*, Oxford University Press., 2006. ISBN 0-19-870072-5
17. Schrader A.M., Donaldson S.H., Song J., Cheng Ch.-Yu., Lee D.W., Han S. and Israelachvili J.N., Correlating steric hydration forces with water dynamics through surface force and diffusion NMR measurements in a lipid–DMSO– H_2O system, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(34): 10708–10713. DOI: 10.1073/pnas.1512325112
18. Hirst L.S., Ossowski A., Fraser M., Geng J., Selinger J.V., Selinger R.L.B., Morphology transition in lipid vesicles due to in-plane order and topological defects, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(9): 3242–3247. DOI: 10.1073/pnas.1213994110

Получено 4 апреля 2018 г.

1. The first part of the paper deals with the general theory of the...
2. In the second part, we consider the special case of...
3. The third part is devoted to the numerical solution of...
4. Finally, we discuss some applications of the theory to...
5. The authors are grateful to the referee for his valuable...
6. This work was supported by the National Science Foundation...
7. Received by the editors June 15, 1977.