

ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ЛАБОРАТОРИЯ НЕЙТРОННОЙ ФИЗИКИ ИМ. И.М. ФРАНКА

На правах рукописи

Горшкова Юлия Евгеньевна

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

Специальность: 01.04.07 – физика конденсированного состояния

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
кандидат физико-математических наук
Горделий Валентин Иванович

Дубна - 2017

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1 . ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	15
1.1. Липидный полиморфизм: молекулярный базис	17
1.1.1. Агрегация мономеров и их подвижность	17
1.1.2. Физические состояния и фазовые переходы липидных мембран.....	21
1.1.3. Упругие свойства мембран	24
1.1.4. Межмембранные взаимодействия.....	26
1.2. Структурные переходы в липидных мембранах.....	31
1.3. Современное состояние изучения взаимодействия ионов кальция с липидными мембранами.....	34
1.4. Обзор межмембранных взаимодействий ФХ мембран в присутствии сульфоксидов	40
1.5. Методы исследования структуры липидных мембран	48
1.6. Заключение к главе 1	50
Глава 2 . МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	51
2.1. Приготовление образцов	51
2.2. Малоугловое рассеяние нейтронов	53
2.2.1. Основные принципы МУРН	54
2.2.2. Малоугловой нейтронный спектрометр ЮМО.....	56
2.2.3. Рассеяние нейтронов на липидных мембранах. Анализ данных МУРН...	60
2.3. Заключение к главе 2	62

Глава 3 . ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА СТРУКТУРУ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ	63
3.1. Фазовые переходы.....	64
3.2. Структура МСВ и ОСВ: $0 \text{ мМ} \leq C_{Ca^{2+}} \leq 10 \text{ мМ}$	67
3.3. Переход в «несвязанное» состояние	69
3.4. Критическая концентрация перехода.....	73
3.5. Структура МСВ и ОСВ: $0 \text{ мМ} \leq C_{Ca^{2+}} \leq 1 \text{ мМ}$	79
3.6. Слияние мембран	91
3.7. Выводы к главе 3.....	95
Глава 4 . ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ, СВОЙСТВ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ НЕВОДНЫХ ПОЛЯРНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ.....	97
4.1. Структура и фазовые переходы липидных мембран в присутствии сульфоксидов	97
4.2. Слипание однослойных везикул.....	114
4.3. Выводы к главе 4.....	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	127

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

БМ – биологическая мембрана

ДЛФО – теория устойчивости дисперсных систем

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФХ – 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин

ДПФХ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин

ДЭСО – диэтилсульфоксид

ДЭС – двойной электрический слой

МНК – метод наименьших квадратов

МСВ – многослойные везикулы

МУРН – малоугловое рассеяние нейтронов

ОСВ – однослойные везикулы

ФХ – фосфатидилхолин

X-Ray – рентгеновское рассеяние

A_l – площадь поверхности липидной молекулы, \AA^2

$b_{\text{ДМСО}}$ – длина рассеяния тепловых нейтронов молекул ДМСО, см

b_w – длина рассеяния тепловых нейтронов молекул воды, см

$C_{\text{Ca}^{2+}}$ – молярная концентрация ионов кальция, мМ (ммоль/л)

$C_{\text{Ca}^{2+}}^*$ – молярная концентрация ионов кальция, при которых происходит переход МСВ в «несвязанное» состояние, мМ

C_l – концентрация липида, мас. %

d – период повторяемости, \AA

d_b – толщина бислоя ($\sqrt{12}R_g$), \AA

d'_b – реальная толщина бислоя, \AA

d_{bm} – толщина ОСВ, образованных из МСВ, \AA

d_{bu} – толщина ОСВ, приготовленные методом экструдирования, \AA

α – угол между нормалью к плоскости мембраны и направлением $\text{P}^- \text{--} \text{N}^+$ диполя, $^\circ$

ξ – корреляционная длина, \AA

ΔG^0 – изменение свободной энергии Гиббса, кДж/моль

d_s – межмембранное расстояние, \AA

$F^2(q)$ – форм-фактор частиц

q – вектор рассеяния, \AA^{-1}

q_0 – значение q , которому соответствует максимальная интенсивность дифракционного пика

$I(q)$ – интенсивность рассеяния, см^{-1}

I_0 – интенсивность рассеяния в нулевой угол, см^{-1}
 $K_{Ca^{2+}}$ – константа связывания ионов Ca^{2+} с липидными молекулами, M^{-1}
 $L_{\beta'}$ – гелевая фаза
 L_u (ЖК) – жидкокристаллическая фаза
 M_l – молярная масса липида, г/моль
 m_l – масса липида, мг
 N – количество слоев в мультислойной системе
 n – число молекул липида, связанных с одним ионом кальция
 n_w – количество молекул воды, расположенных в полярной области липидной головы
 $P_{\beta'}$ – риппл фаза
 R – газовая постоянная, $R = 8,3144598(48)$ Дж/(моль·К)
 R_H – радиус окружности, соответствующей полярной области липидной молекулы, Å
 R_g – радиус инерции частиц, Å
 R_t – радиус инерции везикул, Å
 R_v – радиус везикулы, Å
 $S(q)$ – структурный фактор частиц
 S_{intg} – интегральная площадь дифракционного пика
 T – температура, $^{\circ}\text{C}$
 T_m – температура главного (основного) фазового перехода, $^{\circ}\text{C}$
 σ – плотность поверхностного заряда, Кл/м²
 $\overline{\rho_m}$ – плотность длины рассеяния мембран, см^{-2}
 ρ_s – плотность длины рассеяния растворителя, см^{-2}
 $\Delta\rho = \overline{\rho_m} - \rho_s$ – контраст в МУРН, см^{-2}
 ΔH – изменение энтальпии, кДж/моль
 ΔS – изменение энтропии, кДж/(моль·К)
 2θ – угол рассеяния
 V_l – объем молекулы липида, Å^3
 V_w – объем молекул воды, связанных с мембраной, Å^3
 V_w – объем молекулы воды, Å^3
 V_{DMCO} – объем молекулы ДМСО, Å^3
 w (FWHM) – полная ширина дифракционного пика на уровне половинной амплитуды
 X_b – количество связанных ионов кальция с липидными молекулами, моль/моль
 X_{DMCO} – мольная доля ДМСО в растворе ДМСО/вода
 $X_{DЭСО}$ – мольная доля ДЭСО в растворе ДЭСО/вода
 χ – количество молекул ДМСО, приходящихся на одну молекулу воды растворителя

ВВЕДЕНИЕ

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. 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 рН.

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 CH₃ - 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 (Ca²⁺, La³⁺ и др.), малыми органическими молекулами (н-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 (ДМСО и ДЭСО) 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 гидрофобного/гидрофильного взаимодействия в случае 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 гидрофобного эффекта 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 ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) ФХ мембран. Исчезновение предперехода

- ($L_{\beta'}$ → $P_{\beta'}$) при мольных долях обоих сульфоксидов ≥ 0.2 свидетельствует о стабилизации гелевой фазы МСВ ДМФХ.
2. 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, 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: $K_{\text{Ca}^{2+}} = 22 \text{ M}^{-1}$ в гелевой фазе и $K_{\text{Ca}^{2+}} = 19 \text{ M}^{-1}$ 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 $L_{\beta'}$ фазе и -8.0 кДж/моль в L_{α} фазе; оценки изменения направления $\text{P}^{\text{--}}\text{--}\text{N}^{\text{+}}$ 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 $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ 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 → ОСВ в присутствии ионов Ca^{2+} , ОСВ → 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 $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ при концентрации ионов кальция более 0.4 мМ. Система, которая возвращается в исходное состояние, испытывая переходы ОСВ → МСВ в ЖК фазе и

МСВ \rightarrow ОСВ в области фазового перехода $L_{\alpha} \rightarrow L_{\beta}$, соответствует ОСВ ДМФХ в D₂O при добавлении ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$) 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 малуглового рассеяния. В работе продемонстрированы уникальные возможности малоуглового нейтронного рассеяния для определения константы связывания комплексов Ca²⁺/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 влияния 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:

1. International SAS Workshop, **2006**, FLNP JINR, Dubna, Russia
2. XIX Совещание по использованию рассеяния нейтронов, **2006**, Обнинск, Россия
3. 4-th European Conference on Neutron Scattering, **2007**, Lund, Sweden
4. РСНЭ – НБИК 2009, **2009**, ИК РАН, РИЦ КИ, Москва, Россия
5. Всероссийская научная школа для молодежи «Современная нейтронография: фундаментальные и прикладные исследования функциональных и наноструктурированных материалов», ОИЯИ, **2010**, Дубна, Россия
6. 5th European conference on neutron scattering, **2011**, Prague, Czech Republic
7. SANS-YuMO user Meeting, May 27-30 **2011**, FLNP, JINR, Dubna, Russia
8. International Summer School and Workshop “Complex and Magnetic Soft Matter Systems: Physico-Mechanical Properties and Structure», 3-7 September **2012**, Alushta, Ukraine
9. 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
10. II Международная конференция «Многомасштабное моделирование структур, строение вещества, наноматериалы и нанотехнологии», 11 – 14 ноября **2013**, Тула, Россия.
11. 17th International Seminar on “Neutron Scattering Investigation in Condensed Matter», Adam Mickiewicz University, May **2014**, Poznan, Poland
12. International Conference «Condensed Matter Research at the IBR-2“, **2014**, ЛНФ ОИЯИ, Дубна, РФ
13. Совещание и Молодёжная конференция по использованию рассеяния нейтронов и синхротронного излучения в конденсированных средах: РНСИ-КС-2014, **2014**, ФГБУ ПИЯФ, Гатчина, Россия
14. International Summer School and Workshop «Complex and Magnetic Soft Matter Systems: Physico-Mechanical Properties and Structure», **2014**, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

15. International workshop «Structure and Functions of Biomembranes», Joint Institute for Nuclear Research, Moscow Institute of Physics and Technology, **2014**, Dolgoprudny, Russia
16. 16th International Conference on Small-Angle Scattering (SAS-2015), 13 - 18 September, **2015**, Berlin, Germany
17. Workshop on Condensed matter research by means of neutron scattering methods - CMRNS Dubna, 4-7 July, **2015**, Constanta, Romania
18. International Conference «Condensed Matter Research at the IBR-2», 11-15 October **2015**, Dubna, Moscow region, Russia
19. XXIII Международная конференция «Математика. Компьютер. Образование.», 25-30 января **2016**, Дубна, Россия
20. Future of biology and soft matter research on reactor PIK, 14-16 May, **2017**, Peterhof, Russia
21. 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
22. WORKSHOP on Condensed matter research by means of neutron scattering methods (CMRNS-Dubna-2017), 14 - 16 July **2017**, Constanta, Romania.
23. 17th International Balkan Workshop on Applied Physics and Materials Science (IBWAP-2017), 11 - 14 July **2017**, Constanta, Romania.
24. V Собрание 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. Часть материалов работы отражена в трудах конференций.

1. **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
2. 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.

3. **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
4. **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.
5. **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
6. **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

Структура и основное содержание работы

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав и заключения.

Во **введении** представлена основная цель диссертационной работы, обсуждаются преимущества, научная новизна и значимость исследования влияния ионов Ca^{2+} и сульфоксидов на структуру и свойства ФХ мембран. Обсуждается практическая значимость полученных результатов.

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 температуру основного фазового перехода. В заключение раздела 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. Представлены современное состояние изучения взаимодействия ионов кальция с липидными мембранами и дан обзор межмембранных взаимодействий ФХ мембран в присутствии сульфоксидов. Также в этой главе 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 материалов и методов, использованных в работе. В этом же разделе описан спектрометр малоуглового нейтронного рассеяния ЮМО, 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.

Третья глава посвящена изучению влияния ионов Ca^{2+} на структуру и фазовые переходы ФХ мембран, приготовленных разными способами. Определены критические концентрации ионов Ca^{2+} , при которых мультислойные везикулы переходят в «несвязанное» состояние в зависимости от концентрации липида и фазовых состояний. Рассмотрен метод определения константы связывания при формировании комплексов Ca^{2+} /липид и изменения термодинамических параметров при переходе системы из гелевой в жидкокристаллическую фазу. Предложена модель для количественного описания изменения ориентации P^-N^+ диполя при взаимодействии ионов кальция с полярной головой ФХ мембран на основе анализа толщин однослойных везикул, определенных из данных МУРН. В завершении рассмотрено слияние мультислойных везикул ДМФХ, приготовленных в воде, при добавлении ионов кальция.

В четвертой главе обсуждается влияние сульфоксидов на структуру и фазовые переходы ФХ мембран в зависимости от мольной доли ДМСО и ДЭСО в растворе сульфоксид/вода. Приведен сравнительный анализ приготовленных и образованных спонтанно мультислойных везикул в присутствии ДМСО и ДЭСО. Для определения степени дегидратации липидного бислоя предложен метод вариации контраста. Детально описана кинетика слияния однослойных везикул ДМФХ в воде при добавлении сульфоксидов в жидкокристаллической фазе, рассмотрена стабильность полученных систем в процессе охлаждения-нагрева.

В заключении кратко обобщены результаты проведенных исследований.

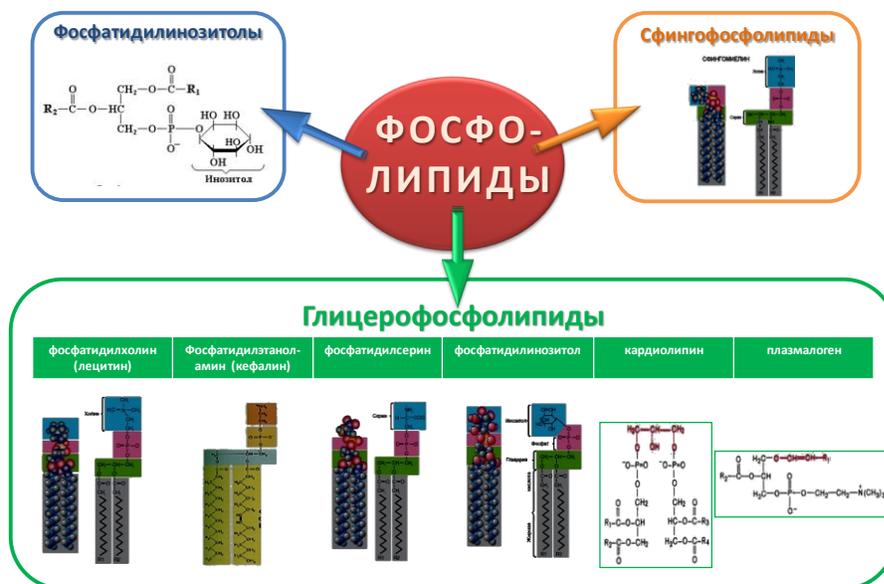


Рис.1.2. Классификация фосфолипидов

Многообразие структур водно-липидных систем

Амфифильность ГФЛ (гидрофильные «головки» - остаток фосфорной кислоты и полярная группировка, и гидрофобные «хвосты» - радикалы жирных кислот R_1 и R_2 (Рис.1.1., справа)) объясняет способность липидов при определенных условиях, таких как температура и гидратация в первую очередь, спонтанно образовывать в воде ламеллярные фазы: одиночные бислои липосомы – однослойные везикулы (ОСВ) или одномерные периодические структуры из липидных бислоев, разделенных между собой водной прослойкой $\sim 10 - 30 \text{ \AA}$, – многослойные везикулы (МСВ), как схематично представлено на Рис.1.3. [2, 3]. В зависимости от размеров сформированных ОСВ различают большие ($> 100 \text{ нм}$) и малые ($< 100 \text{ нм}$) однослойные везикулы.

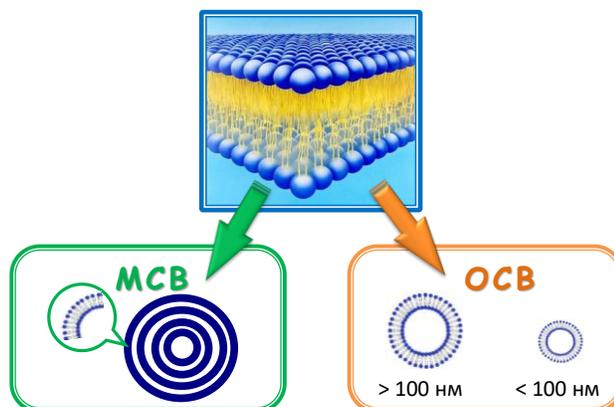


Рис.1.3. Схематическое представление липидного бислоя, многослойных и однослойных везикул

Кроме ламеллярной фазы липиды могут формировать в воде и различные неламеллярные жидкокристаллические (ЖК) фазы, как было впервые показано Лузатти [4]: двумерные нормальные и инвертированные гексагональные фазы, различные трехмерные кубические фазы (Рис. 1.4.).

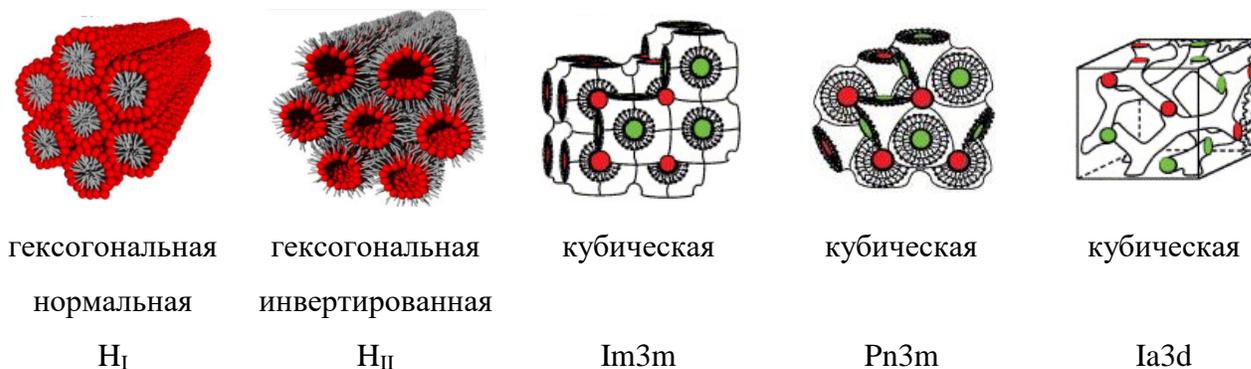


Рис.1.4. Примеры неламеллярных фаз водно-липидных систем[4]

Формирование той или иной фазы определяется не только геометрией липидных молекул, длиной и насыщенностью углеводородных хвостов, но и концентрацией липида в водном растворе или растворителе. Кроме того, изменение внешних условий: температуры, давления, рН также влечет переход системы из одной фазы в другую, как будет показано в разделах 1.3. и 1.4.

1.1. Липидный полиморфизм: молекулярный базис

В современном представлении молекулярный базис липидного полиморфизма включает в себя: агрегацию мономеров, плавление углеводородных цепей, упругие свойства мембран и межмембранные взаимодействия [5].

1.1.1. Агрегация мономеров и их подвижность

При достаточно низких концентрациях амфифильные молекулы присутствуют в растворах в виде мономеров. Увеличение их концентрации до определенного значения (10^{-10} – 10^{-8} М для фосфолипидов) – критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) приводит к агрегации, основной причиной которой является гидрофобный эффект [6]: неполярным частям молекул для избежания контакта с водой энергетически более выгодно объединяться. Водный раствор амфифильного соединения может состоять из смеси различных форм, включая мономеры и различные агрегаты. Из условий равновесной

термодинамики следует, что химические потенциалы сосуществующих агрегатов должны быть равными:

$$\mu_N^0 + \frac{kT}{N} \ln \left(\frac{x_N}{N} \right) = \mu_1^0 + kT \ln(x_1), \quad (1.1)$$

где μ_N^0 - химический потенциал агрегата из N молекул, x_N - мольная доля амфифильных молекул в агрегатах, содержащих N молекул, k - константа Больцмана, T - температура. Правая часть уравнения (1.1) описывает состояние мономера ($N = 1$). До настоящего времени понимание того, как μ_N^0 изменяется для различных молекул липидов и всевозможных форм агрегации (сферические везикулы, цилиндры, диски и т.д.) является фундаментальной проблемой агрегации мономеров. В работах [7,8] было показано, что форма образуемых из мономеров агрегатов главным образом определяется геометрией молекул, а именно формой молекул и молекулярной площадью на границе раздела гидрофильной и гидрофобной областей.

$$\mu_N^0 = 2\gamma a_0 + \frac{\gamma}{a} (a - a_0)^2, \quad (1.2)$$

где γ - поверхностная энергия на единицу площади одной молекулы, a - данная площадь молекулы и a_0 - оптимальная площадь на молекулу.

Для характеристики формы агрегатов в работе [8] был введен критический параметр упаковки $P = v / (a_0 l_c)$, где v - объем, a_0 - площадь и l_c - длина полностью вытянутой углеводородной цепи для одной молекулы. На рис. 1.5. представлены различные упаковки мицелл и структуры липидных молекул в зависимости от величины P . Как видно из Рис. 1.5. при $1/2 < v/(a_0 l_c) < 1$ предпочтительна бислойная форма упаковки молекул. Именно такая форма упаковки характерна для молекул фосфатидилхолина (ФХ).

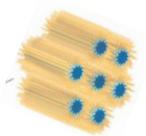
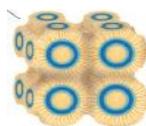
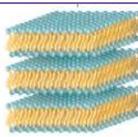
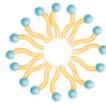
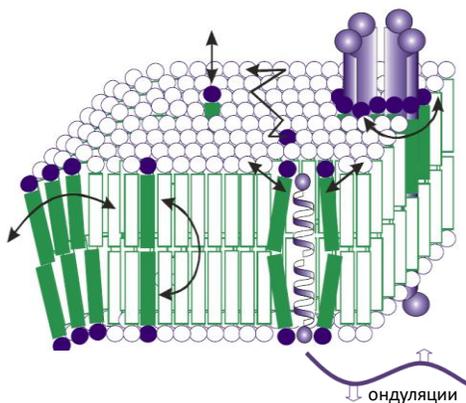
ЛИПИД	фаза		P	форма молекулы
	инвертированная мицелярная			
фосфатилэтаноламин (ненасыщенный) кардиодипин -Ca ²⁺ фосфатилсерин (pH<4)	инвертированная гексогональная		> 1	
	кубическая			
фосфадилхолин сфингомелин фосфатилсерин фосфатилинозитол кардиодипин	ламеллярная		$1/2 - 1$	
	гексогональная		$1/3 - 1/2$	
лизофосфолипиды детергенты	мицелярная		$1/3$	

Рис.1.5. Схематическое представление фаз липидных агрегатов (адаптировано с <http://www.particlesciences.com>) в зависимости от формы молекул[9].

Молекулы в бислое обладают определенной подвижностью и совершают поступательные, вращательные и колебательные движения (Рис. 1.6.), имеющие различные временные значения.



- изменение ориентации полярных голов;
- латеральная диффузия (10^{-7} с);
- колебания ацильных цепей (10^{-12} с);
- гош-транс изомеризация (10^{-12} с);
- ротационная диффузия (10^{-8} с);
- переход с одной стороны бислоя на другую – флип-флоп переход (10^{-3} - 10^4 с);
- выход из бислоя;
- ондуляции (10^{-6} - 1 с).

Рис.1.6. Различные виды движения молекул в биологических мембран

Большой вклад в подвижность липидного бислоя вносят внутримолекулярные движения углеводородных цепей липидных молекул, происходящие путем *гош-транс*-поворотов смежных звеньев углеводородной цепи вокруг связи С—С. В результате этого вращения жирнокислотные цепи могут находиться в различных конфигурациях (Рис. 1.7.). При низких температурах углеводородные цепи находятся преимущественно в *транс*-конфигурации (*t*, цепь максимально вытянута и не меняет своего направления), *гош*-комформация (g^+ и g^- –поворот на $\pm 120^\circ$ относительно *транс*-конформации, цепь при этом меняет направление) возникает при увеличении температуры. Последовательность *гош-транс-гош* (g^+tg^-) приводит к образованию изломов (кинков), в результате чего уменьшается эффективная длина цепи на $\sim 0,127$ нм, часть цепи сдвигается на $\sim 0,15$ нм, образуя свободный объем, а занимаемый молекулой липида общий объем увеличивается на $0,025\text{--}0,050$ нм³. Почти все двойные связи в мембранных липидах находятся в *цис*-конфигурации, что также отражается на изменении направления углеводородной цепи [1]. Минимальной энергией обладает *транс*-, а максимальной — *цис*-конформация углеводородных цепей.

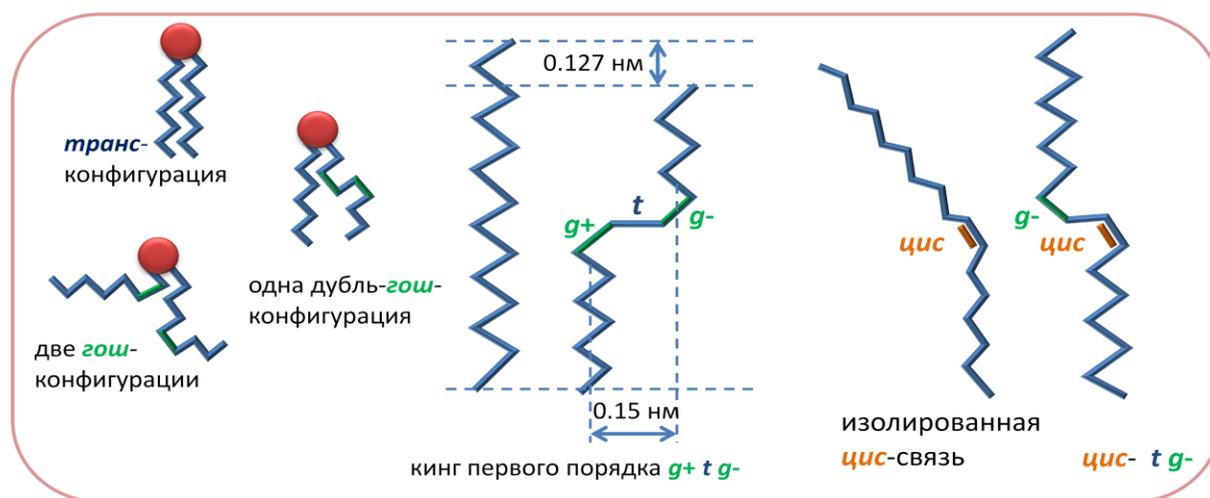


Рис. 1.7. Различные конфигурации жирнокислотных цепей фосфолипидов.

Кроме движений отдельных участков, липидные молекулы способны совершать аксиальное вращение вокруг своей длинной оси, перпендикулярной к плоскости бислоя с частотой $\sim 10^7\text{--}10^8\text{c}^{-1}$, маятниковые и поплабочные колебания молекулы относительно ее равновесного положения в бислое [10]. Кроме того молекулы совершают тепловое движение в пределах монослоя – латеральная диффузия, скорость которой зависит от плотности упаковки, длины и насыщенности углеводородных цепей [11], содержания в мембранах холестерина. Скорость латеральной диффузии фосфолипидов с разными полярными

головками различается незначительно. В целом этот процесс происходит медленнее, чем аксиальное вращение (средний коэффициент латеральной диффузии липидов $\sim 10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$), но гораздо быстрее, чем переход молекул с одной стороны бислоя на другую сторону. Этот переход известен как трансмембранная миграция или флип-флоп переход и совершается с частотой от нескольких минут до дней, в результате чего практически не вносит вклад в подвижность мембраны. К факторам, определяющим скорость трансмембранной миграции можно отнести длину углеводородных радикалов ацильных цепей и природу полярной головки [12].

1.1.2. Физические состояния и фазовые переходы липидных мембран

В биологических мембранах **липидный** слой состоит из различных **липидных** молекул, большая часть которых при физиологических температурах находятся в жидком состоянии. Поэтому липидный слой можно рассматривать как жидкое тело с вязкостью, близкой к вязкости подсолнечного масла. Это обусловлено тем, что текучесть мембраны ограничена внутренней гидрофобной частью, состоящей из углеводородных цепей жирных кислот. Однако липидный слой не всегда представляет собой жидкую фазу. При определенной температуре, которую принято называть температурой главного фазового перехода (T_m), происходит переход «жидкое-твердое». Так, например, при охлаждении до температур ниже 10°C липидный слой затвердевает, приобретая свойства двумерного кристалла. На Рис. 1.8. перечислен ряд факторов, которые наряду с температурой и рН способны понижать или повышать температуру главного фазового перехода [13].



Рис. 1.8. Факторы, влияющие на повышение или понижение температуры главного фазового перехода.

Таким образом, для липидных систем характерен полиморфизм фазовых состояний. Для глицерофосфолипидных модельных мембран различают кристаллическую L_c , гелевую L_β или $L_{\beta'}$, риппл P_β и жидкую (жидкокристаллическую) L_α ламеллярные фазы (Рис. 1.9.). Кроме этого, для ряда липидов существует ламеллярная гель фаза $L_\beta I$ с взаимным проникновением цепей липидов одного монослоя в область цепей другого монослоя.

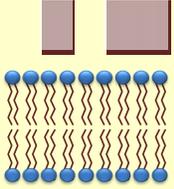
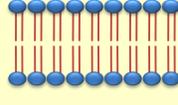
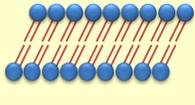
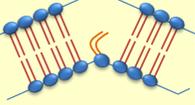
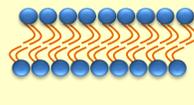
Фаза	Кристаллическая	Гелевая		Жидкая	
		прямая / наклонная	рипл		
Обозначение	L_c	L_β	$L_{\beta'}$	P_β	L_α
Схема					
Характеристика	углеводородные цепи полностью вытянуты и находятся в <i>транс</i> -конформации; липидные молекулы практически не перемещаются в плоскости мембраны	для углеводородных цепей характерно достаточно быстрое анизотропное движение, благодаря поворотам вокруг единичных связей С-С; липидные молекулы достаточно быстро диффундируют в плоскости мембраны	поверхность мембраны волнистая с длиной волны порядка $d \sim 150 \text{ \AA}$ и амплитудой $A \sim 25 \text{ \AA}$	углеводородные цепи, как и молекулы в целом, обладают большой подвижностью, мембрана ведет себя в латеральном направлении как двумерная жидкость, а в направлении перпендикулярном плоскости мембраны как твердое тело	

Рис. 1.9. Полиморфизм фазовых состояний в зависимости от температуры для фосфолипидов.

Для липидов с гетерогенными цепями, например, для липидов фосфатидилэтаноламинового ряда, у которых площадь головы практически совпадает с площадью хвостов, углеводородные цепи в бислое направлены вдоль нормали к плоскости бислоя. Для липидов содержащих одинаковые полностью насыщенные углеводородные цепи, например, для липидов фосфатидилхолинового ряда в гелевой фазе характерен наклон углеводородных цепей относительно нормали к плоскости бислоя (Рис. 1.10.). Угол наклона определяется как $\cos \alpha = 2A_c/A$, A – площадь головы липида и A_c – удвоенная площадь

углеводородных цепей, и составляет $\sim 30^\circ$. Средняя площадь на липидную голову в липидном бислое составляет $\sim 60 \text{ \AA}^2$, тогда как эффективное суммарное сечение двух цепей в транс-конформации $\sim 40 \text{ \AA}^2$. В жидкой фазе молекулы липидов расположены перпендикулярно к плоскости бислоя, полярные головки остаются связанными между собой. За счет теплового движения углеводородных хвостов происходит взаимное отталкивание липидных молекул, что приводит к увеличению их общей площади. Так для дипальмитоил фосфатидилхолина (ДПФХ) изменение температуры от $23 \text{ }^\circ\text{C}$ (L_β') до $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (L_α) приводит к увеличению суммарной площади молекулы от 70 до 77 \AA^2 [14].

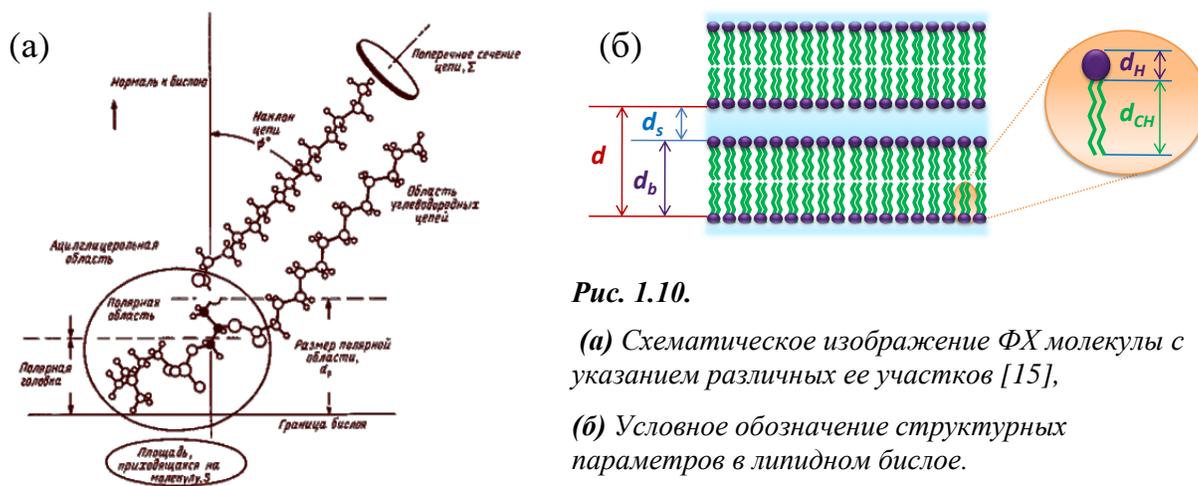


Рис. 1.10.

(а) Схематическое изображение ФХ молекулы с указанием различных ее участков [15],

(б) Условное обозначение структурных параметров в липидном бислое.

Важными факторами, определяющими фазовое состояние липидного бислоя, так же являются степень гидратации и состав липидного бислоя. Переход из твердого (кристаллического) состояния в жидкокристаллическое и обратно происходит строго при определенной температуре, характерной для данного липида (Рис. 1.11.а) и его степени гидратации (Рис. 1.11.б). Температура фазового перехода зависит как от строения углеводородных цепей, так и от природы их полярных голов. Чем длиннее цепь, тем выше температура фазового перехода, поскольку увеличивается сила вандерваальсового взаимодействия. Как правило, T_m возрастает на $15\text{-}20 \text{ }^\circ\text{C}$ при увеличении насыщенной цепи на два метиленовых звена. Введение цис-двойной связи даже в одну углеводородную цепь резко понижает температуру фазового перехода, при этом снижение сильно зависит от положения двойной связи в цепи: наибольший эффект наблюдается, когда двойная связь находится в положении девятого – десятого атома углеводородной цепи.

Различие в строении полярных голов также существенно сказывается на температуре фазового перехода, так фазовый переход для фосфатидилхолина на $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ниже, чем для фосфатидилэтаноламина, находящегося при тех же условиях (Рис. 1.11.а).

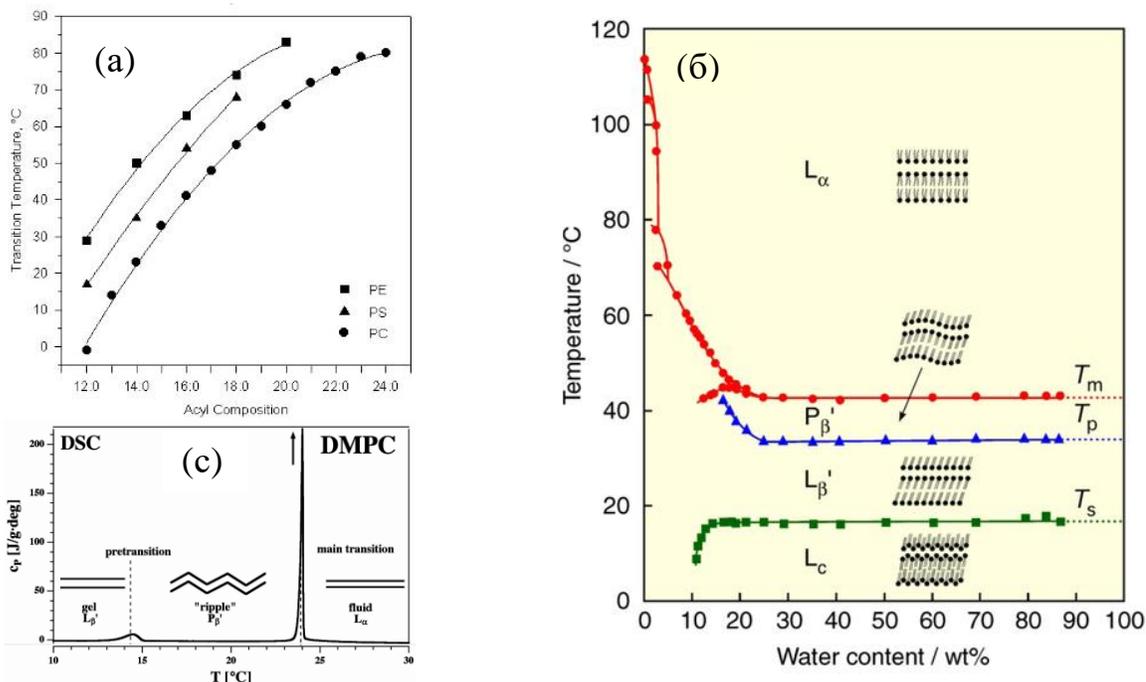


Рис. 1.11. Температуры фазовых переходов в зависимости от: (а) – длины углеводородных хвостов (n) [16]; (б) – содержания воды для ДПФХ [17]; (с) – профиль теплоемкости для МСВ ДМФХ [18].

В свою очередь многие физические параметры одного и того же фосфолипида, как будет продемонстрировано далее, зависят от температуры. Поэтому первостепенной задачей является определение влияния окружающей среды на температуру фазовых переходов. В главах 3 и 4 будет подробно рассмотрен полиморфизм фазовых состояний МСМ и ОСВ ДМФХ в избытке растворителя в зависимости от мольной доли сульфоксидов ДМСО и ДЭСО в растворе сульфоксид/вода, от концентрации ионов кальция.

1.1.3. Упругие свойства мембран

Молекулы биологических мембран обладают подвижностью, как в плоскости мембраны, так и в перпендикулярном к ней направлении (Рис.1.6.). В подобном ракурсе современная наука рассматривает клеточные мембраны как жидкомозаичные структуры. В тоже время мембраны обладают свойствами твердого тела – например, упругостью. Впервые модуль упругости (E) был определен для мембраны эритроцита и его величина составила 10^8 дин/см² [19]. В опыте с осмотическим набуханием клеток полагалось, что мембрана растягивается и сжимается также по толщине. Однако попытки описать проблему механического равновесия и деформации мембран как задачу теории тонких оболочек в предположении изотропности свойств в трех направлениях [20,21] не принесли успеха. Дальнейшие эксперименты показали, что увеличение площади поверхности мембраны – не тривиальная задача:

увеличение площади даже на несколько процентов ведет к разрыву клеток [22,23]. С другой стороны, больших удлинений мягких не набухших клеток можно легко достичь при постоянной площади [24]. Это обусловлено малыми модулями упругости мембраны для деформаций растяжения и сдвига при постоянной площади. Противоречия в определении модулей были объяснены после появления определяющих уравнений, в которых разделены упругие эффекты изменения площади и деформации растяжения при постоянной площади. Такое описание позволило определить, что большие значения модулей в опытах с набуханием клеток связаны с большим сопротивлением мембран к изменению их площади. Малые силы, необходимые для вытягивания мягких не набухших клеток, обусловлены малыми модулями упругости для изгиба, деформаций растяжения или сдвига при постоянной площади. Вклад в свободную энергию системы за счет относительного изменения поверхности (α) и деформационного растяжения поверхности (β) можно представить в виде:

$$(dF)_t = \left(\frac{\partial F}{\partial \alpha}\right)_{t,\beta} d\alpha + \left(\frac{\partial F}{\partial \beta}\right)_{t,\alpha} d\beta \quad (1.3)$$

Связь изменения изотропного натяжения T_o с относительно малыми изменениями площади задается модулем поверхностного изотермического сжатия (K) (1.4), при деформационном растяжении (постоянная площадь) сопротивление деформации характеризуется поверхностным модулем мембран при сдвиге (μ) (1.5). Эти два модуля являются важнейшими характеристиками мембран при механическом воздействии.

$$T_o = \left(\frac{\partial F}{\partial \alpha}\right)_{t,\beta} ; K = \left(\frac{\partial^2 F}{\partial^2 \alpha}\right)_{t,\beta} \quad (1.4)$$

$$\mu = \left(\frac{\partial F}{\partial \beta}\right)_{t,\alpha} \quad (1.5)$$

Между энергией изгиба и собственной жесткостью бислойных мембран существует связь [25,26]. Как правило, монослой в бислое не связаны между собой и скользят свободно относительно друг друга, поэтому липидный бислой сам по себе не оказывает заметного сопротивления изменению кривизны. Однако если граница липидного бислоя устроена так, что не позволяет скользить отдельным слоям, то слои можно считать связанными, а модуль изгиба (K_C) легко вычислить, используя соотношение:

$$K_C = h^2 \frac{K_1 \cdot K_2}{K_1 + K_2}, \quad (1.6)$$

где K_1 и K_2 – модули поверхностной сжимаемости для двух противоположных монослоев и h – толщина монослоя. Важными параметрами, характеризующими упругие свойства мембран, также являются модули сжатия в объеме (K_A) и по площади (B). В работе [27] определены значения величин K_C и B для ДМФХ мембран при $T = 30^\circ\text{C}$ различными физическими методами как $5.6 \div 8.0 \times 10^{-20}$ Дж и $1.0 \div 2.0 \times 10^{15}$ Дж/м⁴, соответственно. Исследование зависимости упругих свойств мембран от температуры выявило следующие закономерности: значения K_C и K_A уменьшаются с ростом T ($K_C \sim 1/\exp(455/T)$, K_A на 5% для ДОФХ [28]), в то время как величина B не зависит от T . Следует отметить, что K_C описывает изгиб одного слоя ФХ мембран и не зависит от взаимодействия между соседними слоями и, как следствие, не зависит от ламелярного периода повторяемости (d) МСВ. Величина B описывает взаимодействие соседних бислоев и становится меньше с уменьшением межмембранного расстояния. Параметры K_C и K_A связаны между собой соотношением, полученным из модели «полимерной щетки» (polymer brush model) [29]:

$$K_A = \frac{24K_C}{(2d_{CH})^2}. \quad (1.7)$$

Связь параметров K_C и B можно проанализировать из экспериментальных дифракционных данных, используя теорию Калье [30]:

$$\eta = \frac{k_B T}{8\sqrt{BK_C}} \frac{4\pi}{d^2}, \quad (1.8)$$

где η – параметр Калье, k_B - постоянная Больцмана; или зная корреляционную длину (ζ) в плоскости мембраны: $\zeta^4 = K_C/B$ [31].

1.1.4. Межмембранные взаимодействия

При растворении липида в небольшом количестве воды образуется гидратированный липид, который представляет собой единую фазу липид-вода. Увеличение концентрации воды в системе липид/вода до определенного предела приводит только к изменению структурных параметров и конформации липидных молекул в бислое: увеличение объема полярной области, ослабление межмолекулярных водородных связей, образование новых связей с молекулами воды. Дальнейшее увеличение концентрации воды приводит к образованию свободной воды между липидными бислоями. Именно с этого момента в действие вступают силы взаимодействия с водой как с полярным растворителем. В этом качестве вода обладает уникальными свойствами [32]. Сильные водородные связи между

молекулами воды препятствуют растворению инертных (неполярных или гидрофобных) молекул. Гидрофобные взаимодействия являются результатом действия дисперсионных сил Ван-дер-Ваальса–Лондона и структурирования молекул воды. Молекулы воды, окружающие неполярное вещество, стремятся переориентироваться таким образом, чтобы число образованных водородных связей было максимально. Тем самым компенсируется разрыв водородных связей на границе с веществом. В результате этого вокруг неполярной области образуется слой, в котором число энергетически благоприятных ориентаций молекул воды ограничено. При этом уменьшается энтропия и увеличивается структурированность системы (гидрофобный эффект). Это понижение энтропии только частично компенсируется энтальпией образования новых водородных связей с веществом [8]. С другой стороны, вода может сильно связывать и растворять полярные и гидрофильные вещества, к которым относятся коллоидные частицы и всевозможные биологические структуры, в том числе и липидные мембраны.

Теория устойчивости дисперсных систем

Из коллоидной химии известно, что любая дисперсная система, к которой относятся и липидные мембраны, растворенные в воде или органическом растворителе, обладает агрегативной и кинетической устойчивостью, которые зависят от наличия факторов стабилизации и дестабилизации дисперсной системы. Эти факторы, в свою очередь, определяются физико-химическими и электрокинетическими свойствами компонентов, входящих в дисперсную систему. Динамика агрегации при взаимодействии поверхностей макромолекул в воде сильно зависит от энергии взаимодействия или от величины силы, варьируемой от расстояния между поверхностями. Агрегация может быть кинетически медленной из-за присутствия отталкивания или энергетического барьера даже в случае высокой энергии связывания поверхностей ($d = 0$), несмотря на то, что связанное состояние может быть энергетически более выгодно.

Теория устойчивости дисперсных систем (ДЛФО) [33,34] была разработана Дерягиным и Ландау в 1937— 1941 гг., а несколько позднее и независимо от них к аналогичным выводам пришли и голландские физико-химики Фервей и Овербек. Баланс сил межбранного взаимодействия первоначально объяснялся основными постулатами этой теории: на очень малых расстояниях (d), соизмеримых с радиусом частиц, преобладают межмолекулярные силы притяжения (Ван-дер-Ваальсовы силы), за дальнедействующее отталкивание отвечает двойной электрический слой. Полная потенциальная энергия взаимодействия мембраны (V_T)

в этом случае определяется как сумма потенциальных энергий притяжения (V_A) и отталкивания (V_R), как схематично представлено на Рис. 1.12.

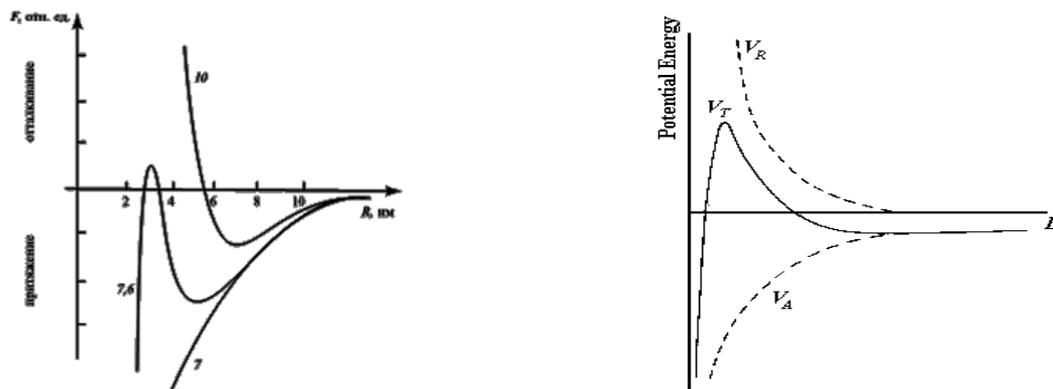


Рис. 1.12. Слева – зависимость суммарной потенциальной энергии взаимодействия мембраны (V_T) от расстояния (d) при различных плотностях поверхностного заряда (7, 7.6, 10); справа – вклады сил притяжения и отталкивания в полный потенциал энергии

Однако дальнейшие исследования в этой области показали, что при расстояниях меньше 10-30 Å теория ДЛФО перестает работать. Детальный анализ измерения сил в диапазоне указанных межмембранных расстояний привел к следующим выводам: во-первых, при более точном измерении сил [35-37] были обнаружены затухающие осцилляции с периодом 2.5 Å (соответствует диаметру молекулы воды), которые теория ДЛФО не описывает; во-вторых, на малых расстояниях ($\leq 10-30$ Å) возникает не притяжение между поверхностями, даже нейтральными [38,39], а сильное отталкивание, что противоречит теории ДЛФО.

Альтернативные теории межмембранных взаимодействий

В современном представлении основной вклад в баланс сил, действующих между незаряженными мембранами, вносят три компоненты [40]:

I. Короткодействующая сила отталкивания («гидратационная» сила).

$$f_{H(d_w)} = A_H \exp(-d_w / \lambda), \quad (1.9)$$

где $A_H \approx 10^{-17} - 10^{-18}$ Дж/м² и длина спада гидратационного взаимодействия $\lambda \approx 0.1 - 0.24$ nm для фосфолипидных мембран [41,42].

Природа возникновения этой силы до сих пор является предметом обсуждения. В основу одной из альтернативных теорий теории ДЛФО легло предположение о

структуризации воды вблизи поверхности, которая порождает отталкивание с экспоненциальным затуханием: первый ориентированный слой индуцирует появление второго ориентированного слоя и так далее, пока притяжение Ван-дер-Ваальса не становится сравнимым по силе с гидратационным отталкиванием [41,43]. Амплитуда силы пропорциональна степени ориентации или поляризации первого слоя молекул воды, длина спада зависит от корреляционной длины в жидкости (1.9).

В основе другой альтернативной теории, объясняющей короткодействующие силы отталкивания, лежит энтропийная природа взаимодействия воды с поверхностью мембраны, обусловленная химическими и физическими свойствами поверхностей. Именно эта теория, а в частности постулат о том, что любые взаимодействия, связанные с водой, должны быть силами притяжения (монотонными или осциллирующими), как схематично представлено на Рис. 1.13, но не отталкивания [44], легла в основу возможного описания таких процессов как слипание и слияние частиц.

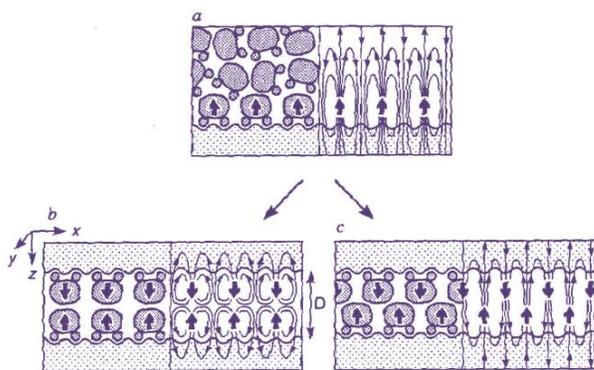


Рис. 1.13. Схематическая диаграмма диполь-дипольных взаимодействий [44]: а) гидрофильная поверхность с сильно связанным первым слоем молекул воды; б) отталкивающее взаимодействие двух поверхностей в воде с зеркально симметричным расположением диполей; с) более энергетически выгодная конфигурация диполей с притяжением поверхностей.

Таким образом, до сих пор не выявлена однозначная зависимость $f_{H(d_w)}$ от T . С одной стороны, если «гидратационная» сила определяется свойствами воды, то она должна ослабевать с ростом температуры [41, 42]. С другой стороны обсуждаемая сила обладает энтропийной природой, термические флуктуации липидных молекул в направлении перпендикулярном плоскости липидного бислоя возрастают с ростом температуры, а, следовательно, и $f_{H(d_w)}$ будет увеличиваться ($\lambda \sim T/\gamma$, где γ – межфазная энергия, которая уменьшается при нагревании).

II. Дальнодействующая сила притяжения.

Притяжение Ван-дер-Ваальса между двумя мембранами толщиной d_b в результате различной поляризуемости молекул липида и воды имеет вид [41]:

$$f_{vdw} = -\frac{H}{12\pi} \left(\frac{1}{d^2} - \frac{2}{(d_w - d_b)^2} + \frac{1}{(d_w + 2d_b)^2} \right), \quad (1.10)$$

где константа Гамакера (H) имеет значение в диапазоне $(3 \div 7) \cdot 10^{-21}$ Дж и линейно зависит от температуры:

$$H = \frac{3k_b T}{4} \left(\frac{\varepsilon_l - \varepsilon_w}{\varepsilon_l + \varepsilon_w} \right)^2 + \frac{3h\nu_e}{16\sqrt{2}} \frac{(n_l^2 - n_w^2)^2}{(n_l^2 + n_w^2)^{3/2}}, \quad (1.11)$$

где ε_l и ε_w являются постоянными диэлектрической проницаемости липидов и воды, соответственно; n_l и n_w – показатели их преломления, а ν_e – частота ультрафиолета.

В зависимости от межмембранного расстояния (d_w) сила Ван-дер-Ваальса изменяется по степенному закону следующим образом:

$$f_{vdw} \propto \begin{cases} 1/d_w^2, & \text{если } d_w \ll d_b \\ 1/d_w^4, & \text{если } d_b \ll d_w \\ 1/d_w^5, & \text{если } d_w \text{ слишком велико} \end{cases} \quad (1.12)$$

III. Дальнедействующая сила отталкивания (ондуляционная сила).

В жидкой фазе бислои обладают тепловыми осцилляциями (ондуляции) благодаря наличию свойств упругости, амплитуда которых увеличивается с увеличением температуры, в то время как величина модуля изгиба K_C уменьшается. В работе [45] Хельфрих (*Helfrich*) показал, что для двух бислоев с модулем изгиба K_C , разделенных средним расстоянием d_w , возникают силы отталкивания энтропийной природы (ондуляционные силы):

$$f_{und} = C_{fl} \frac{(k_B T)^2}{K_C d_w^2}, \quad (1.13)$$

где универсальная флуктационная постоянная $C_{fl} = 3\pi^2/128 \approx 0.23$. Кроме того, мембраны подвергаются перестальтическим изменениям, когда толщина мембраны флуктуирует возле среднего значения.

Другой вклад в отталкивание между мембранами вносят выступающие из поверхности отдельные гидрофильные головы молекул согласно теории Александра де Жена [46].

Электростатика липидного бислоя

Полярная голова фосфолипидов состоит из отрицательно заряженной фосфатной группы и положительно заряженной аминогруппы, соединенных между собой короткой углеводородной цепочкой $\text{CH}_2\text{—CH}_2$. Голова фосфолипида обладает значительным

дипольным моментом (19Д), небольшой вклад в суммарный дипольный момент вносят карбонильные группы С=О (1.8Д). В отличие от обычных коллоидных систем поверхность фосфолипидных бислоев обладает особенностью, которая в значительной степени осложняет теоретическое описание межфазных явлений в системе. Связано это с тем, что область полярных голов проницаема для ионов и молекул воды. Вследствие чего в этой области, которую можно рассматривать как некий приповерхностный слой, перемешаны как источники электрических полей, принадлежащие самой поверхности, так и заряды ионов и электрические диполи молекул воды. Это затрудняет выделение четкой границы раздела между липидной фазой и электролитом. Учет этой особенности позволил рассмотреть целый ряд новых явлений [47]. В частности, оказалось, что поверхностные диполи в значительной степени влияют на структуру двойного электрического слоя (ДЭС) [48] и даже образуют ДЭС вблизи электрически нейтральной поверхности.

В классической теории Гуи-Чепмена [49], в рамках которой ДЭС определяется только поверхностными зарядами и при этом электрические диполи не влияют на его структуру, принимают, что все поверхностные заряды располагаются на геометрической плоскости и, как правило, пренебрегают толщиной поверхностного слоя при теоретическом анализе электрических явлений. Однако в работе [48] было показано, что при учете распределения диполей в конечном ненулевом поверхностном слое диполи вносят существенный вклад в электрическое поле вблизи поверхности.

1.2. Структурные переходы в липидных мембранах

Кроме фазовых переходов, описанных ранее, для фосфолипидных мембран возможны и структурные переходы, вызванные либо временным фактором (спонтанные переходы), либо внешними воздействиями путем приложения внешней силы или изменения внешней среды (индуцированные переходы). К числу таких переходов можно отнести формирование однослойных везикул из многослойных и обратный процесс.

Индукционное формирование ОСВ

Типичным примером рассматриваемого структурного изменения липидных мембран может служить индуцированный переход МСВ в ОСВ в присутствии катионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , La^{3+} . Основоположниками исследования влияния ионов на структуру мембран ФХ были японские ученые Иноко и др., опубликовавшие свою статью в 1975 году [50]. С тех пор появился ряд теоретических и экспериментальных обзоров по данной тематике [27,51-62].

Так, например, в этих работах установлено, что разрушение ламелярной структуры мультислойных мембран происходит при малых концентрациях ионов кальция ($C_{Ca^{2+}} = 1-10$ мМ). Однако ни характер перехода, ни значение $C_{Ca^{2+}}$, при котором он происходит до сих пор не определены однозначно. Кроме того, в западной литературе этот переход часто именуется как спонтанный. Однако стоит отметить, что наблюдается он только при увеличении концентрации ионов кальция до определенных значений $C_{Ca^{2+}}$. Именно увеличение числа ионов Ca^{2+} , связанных с липидными молекулами, изменение рН вызывают разрушение ламелярной структуры мультислойных мембран и формирование ОСВ. Таким образом, следуя классификации приведенной выше, данный переход не может быть рассмотрен как спонтанный процесс. В то время как формирование многослойных везикул из однослойных может быть как спонтанным, так и индуцированным процессом, проходящим путем слияния мембран, как будет показано в главах 3 и 4.

Слияние фосфолипидных мембран

Одной из важнейших функций биологических мембран является ее способность отделять клетки от внеклеточной среды. Нарушение целостности мембраны приводит к гибели клеток. Тем не менее, локальные изменения в краткосрочном временном масштабе целостности мембраны приводит к созданию новых структур путем слияния или деления клеток [63].

Слияние мембран, играет важную роль в физиологических процессах, таких как экзоцитоз, секреция, образование вторичных лизосом [64-67]. 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.

Механизм слияния заряженных и нейтральных липидов, вызванный двух- и трехвалентными катионами (Ca^{2+} , La^{3+}), малыми органическими молекулами (н-гексил бромид, этанол), исследовали на модельных липидных мембран [68]. Было показано, что, природа слияния не зависит от выбора фьюжн агентов. Слияние происходит поэтапно: тесный контакт мембран (I), полуслияние (II), и слияние (III), как схематично представлено на Рис. 1.14.

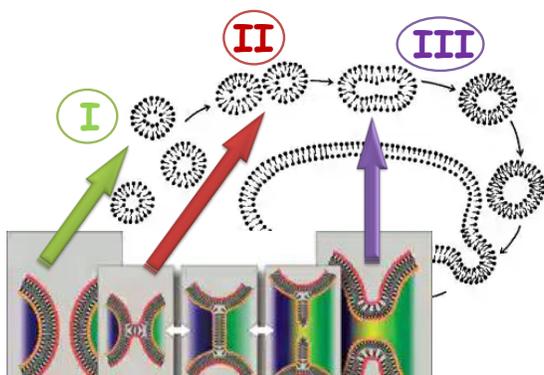


Рис. 1.14. Стадии слияния мембран

Согласно теории ДЛФО [45] процесс слияния липидных мембран является результатом суперпозиции сил притяжения Ван-дер-Ваальса и электростатических сил отталкивания. В зависимости от баланса этих сил в межмембранной прослойке возникает положительное расклинивающее давление, которое препятствует соединению мембран, или отрицательное давление, которое приводит к уменьшению межмембранного расстояния (d_s), и как следствие этого наблюдается стерический контакт соседних мембран [69]. Кроме того, необходимо учитывать и наличие на поверхности мембраны слоя воды с измененными свойствами. Ориентация молекул в гидратных слоях создает дополнительное препятствие для установления контакта между соседними мембранами. Таким образом, гидрофобные взаимодействия вносят значительный вклад в баланс межмембранного взаимодействия на малых расстояниях и поддерживают соседние везикулы в равновесии на расстоянии ~ 2 нм [41]. Для реализации процесса слияния необходимо выполнение несколько условий. Во-первых, сливающиеся мембраны должны вступить в тесный контакт. Для этого необходимо преодолеть электростатическое отталкивание и, что наиболее важно, должна произойти дегидратация полярных групп липидных молекул. Во-вторых, в плотно прилегающих друг к другу бислоях должен существовать некий локальный дефект упаковки, чтобы могли реализоваться межмембранные гидрофобные взаимодействия. Важно отметить, что для ФХ мембран, у которых гидрофобный хвост длиннее гидрофильной головы, дефекты (вспучивания) наиболее вероятны.

Таким образом, уменьшение гидратационного отталкивания приводит к слиянию мембран (этап I) [41]. Действительно, уменьшение воды ослабляет отталкивание связанных липидных бислоев и индуцирует стерический контакт мембран [70]. Дефекты или флуктуации в зоне контакта, вызванные действием агентов слияния или изменением некоторых физических параметров, таких как температура [71], искривление мембран [72]

или изменение поверхностного натяжения [71], играют ключевую роль в процессе слияния мембран (стадия II и III).

В главах 3 и 4 данной работы будет представлен механизм обоих переходов в присутствии ионов кальция и сульфокосидов, определены критические концентрации этих переходов на примере ДМФХ мембран в избытке растворителя, приготовленных различными методами.

1.3. Современное состояние изучения взаимодействия ионов кальция с липидными мембранами

Ионы кальция занимают особое место в биологических процессах [1]. Они регулируют важнейшие физиологические и биохимические процессы в организме. Они участвуют в процессах свертывания крови и в обеспечении постоянного осмотического давления крови, являются одним из универсальных вторичных посредников и регулируют различные внутриклеточные процессы: мышечное сокращение, экзоцитоз, секрецию гормонов, нейромедиаторов [51,73-75].

Этим объясняется интерес к изучению влияния ионов Ca^{2+} на структуру, фазовые состояния и межмембранные взаимодействия липидных мембран [27]. Исследования модельных липидных мембран в присутствии ионов кальция указывают на существенные изменения как локальных, так и общих свойств липидных бислоев. Так, например, увеличение концентрации ионов Ca^{2+} ($C_{\text{Ca}^{2+}}$) вызывает изменение конформации полярных голов липидных молекул, а именно наклона полярных голов относительно плоскости бислоя [58], упорядочение углеводородных цепей, что приводит к образованию агрегатов липид-соль [54,60,61]. Это, в свою очередь, влечет увеличение толщины липидного бислоя.

Методы исследования

Механизм связывания и влияния ионов кальция на фосфолипидные бислои были изучены различными физико-химическими методами: дифракция рентгеновских лучей и нейтронов [50,76-80], калориметрия [81-83], ядерный магнитный резонанс [84-89], метод измерения силы [90], инфракрасная спектроскопия [91], электрофорез частиц [92-95] и др.

Основные выводы этих работ можно сформулировать в следующем: ионы кальция существенным образом влияют на структуру мембран; увеличивают температуру фазового перехода; кальциевые связи ослабевают с увеличением степени ненасыщенности углеводородных цепей липидных мембран, а так же эти связи зависят от фазового состояния фосфолипидов (в гель фазе величина связывания больше, чем в ЖК фазе [85,90]).

Температура основного фазового перехода

Двухвалентные ионы приводят к значительному увеличению температуры фазового перехода в отличие от минутного эффекта в присутствии одновалентных ионов [96]. Катионы Ca^{2+} , как и Mg^{2+} связываются с поверхностью мембраны отрицательно заряженных и нейтральных липидов, таких как ДМФХ, изменяя поверхностный потенциал [85], головную ориентацию [97] и дипольный потенциал [98]. Однако Ca^{2+} более эффективно изменяет гидратационную оболочку в области головной части бислоя в соответствии с рядом Хофмайстера [99]. Это объясняет, почему ионы Ca^{2+} больше сдвигают температуру основного фазового перехода (T_m) липидных мембран по сравнению, например, с ионами Mg^{2+} . В [99] было показано, что полностью гидратированные МСВ ДМФХ испытывают фазовый переход при $T_m = 28.6$ °С в присутствии 1 М ионов Ca^{2+} , в то время как для МСВ ДМФХ в воде переход из гелевой в жидкокристаллическую фазу ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) происходит при температуре 23.6(5) °С, как указано в обзоре по биомембранам [96]. Методом калориметрии на переменном токе было показано, что при нагревании МСВ ДМФХ испытывают переход $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ при $T_m = 23.9$ °С, при охлаждении переход из фазы L_{α} в фазу $P_{\beta'}$ происходит в диапазоне температур 23.4 – 23.8 °С [100].

Межмембранные взаимодействия

Добавление ионов к липидным бислоям приводит к изменению баланса взаимодействующих сил притяжения Ван дер Вальса и отталкивающих гидрат сил [101,102], а также стерического отталкивания за счет колебаний изгиба мембраны [45]. Вследствие связывания ионов с полярной головой липида бислоем получает заряд. Это дополнительное электростатическое взаимодействие также конкурирует с силами Ван дер Вальса, которые в свою очередь предположительно уменьшаются в присутствии электролитов, приводя к экранированию низкочастотных флуктуаций заряда [102,103]. Дополнительные сложности создают ионы при конкуренции с полярными головами для межфазной воды, которая изменяет потенциал взаимодействия в связи с образованием изоляционного слоя соли [55,104].

Различие взаимодействий одно- и двухвалентных катионов с мембранами

Учитывая все вышеперечисленные эффекты, Петраче (*Petrache*) и др. [104] смогли объяснить наблюдаемое набухание нейтральных бислоев в присутствии одновалентных

солей. Проведенное Пабстом (*Pabst*) и др. комплексное изучение влияния NaCl и CaCl₂ на глобальные и локальные свойства ПОФХ [105] показало, что присутствие NaCl приводит к непрерывному набуханию бислоев. Двухвалентные соли сильнее взаимодействуют с полярными группами нейтральных фосфолипидов, на что указывают значения константы связывания ионов Ca²⁺ (40 M⁻¹), Na⁺ (0.15 M⁻¹) и Cl⁻ (0.20 M⁻¹) с яичным ФХ (L- α -фосфодитилхолин) при $T = 25$ °C [106], например. Это приводит к значительным отличиям двухслойных взаимодействий в присутствии одно- и двухвалентных ионов. Влияние CaCl₂ на межмембранные взаимодействия является более сложным: толщина водной прослойки МСВ ФХ при увеличении концентрации существенно возрастает; при дальнейшем добавлении соли величина d_s снова уменьшается. Наблюдаемый эффект связан с изменением баланса между электро-статическим и Ван-дер-ваальсовым взаимодействиями. В широком диапазоне концентраций солей от 0 до 5 М показано, что обе соли приводят к значительному увеличению порядка внутри липидного бислоя и как следствие к уменьшению упругости бислоя и сдвигу основной температуры фазового перехода. Этот эффект более выражен для CaCl₂ и наблюдается при высоких концентрациях $C_{Ca^{2+}} > 1$ М [105].

Несмотря на многочисленные публикации, посвященные влиянию ионов на структуру липидного бислоя, до сих пор нет единого мнения относительно наблюдаемых эффектов двухслойных взаимодействий. Методом молекулярно-динамического моделирования определено, что координационное число связывания Na⁺ с бислоями POPC равно 3, в то время как Ca²⁺ связывается с 4 молекулами липида [54,61]. Эти данные легли в основу объяснения уменьшения латерального коэффициента диффузии [54]. Образование кластеров ион/липид приводит к возрастанию упорядочения углеводородных цепей, что в свою очередь влечет увеличение толщины липидного бислоя. Авторы этой работы предполагают, что максимальное увеличение 2 Å соответствует 0.1 М Na⁺. С другой стороны, в исследованиях методом рентгеновской дифракции не было обнаружено каких либо изменений в структуре бислоя или изгиба упругости в диапазоне концентраций NaCl 0 – 1 М [56].

Модели взаимодействия ионов Ca²⁺ с мембранами

В обеих фазах P⁻-N⁺ диполь головы липида практически параллелен поверхности бислоя и свободно вращается вокруг оси, перпендикулярной к поверхности бислоя [84,107,108]. Плоскость связывания для двухвалентных катионов находится на расстоянии 3.5 – 4 Å от границы углеводородной области фосфолипидных бислоев [77,80]. Из-за связи катионов электрическое поле изменяет ориентацию P⁻ - N⁺ диполя от касательного к нормальному

направлению с $N^+(CH_3)_3$ группой наружу от поверхности бислоя [97,109]. Эти изменения нашли подтверждение в ранее опубликованных работах по ЯМР спектроскопии [86,87,110] и инфракрасному изучению [91].

Так же была предложена модель молекулярного взаимодействия Ca^{2+} /ДПФХ [97,111]: положительный заряд создает электрическое поле не только в перпендикулярном направлении, но и в плоскости бислоя. В результате этого цвиттер-ионы, окружающие молекулы ДПФХ, перестраиваются таким образом, что отрицательно заряженные группы ориентируются на связанный Ca^{2+} . Следовательно, дальнедействующее притяжение между связанными Ca^{2+} и молекулами, окружающих ДПФХ, производит большее боковое давление в гидрофобной части бислоя, чем в отсутствие ионов кальция, упаковка углеводородных цепей становится более плотной. Таким образом, при увеличении концентрации кальция, расстояние между катионами Ca^{2+} уменьшается и вместе с этим увеличивается среднее значение бокового давления.

Ca^{2+} индуцирует структурные изменения фосфолипидов

В работе по изучению влияния кальция на ДПФХ мембраны методом дифракции рентгеновских лучей Иноко (*Inoko*) с коллегами выделили 4 состояния для МСВ ДПФХ в растворе $CaCl_2$ /вода при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} [50], как схематично показано на Рис.1.15. Первый участок (I) соответствует значениям $C_{Ca^{2+}}$ от 0 до 1 мМ. При этом система в избытке воды формирует ламелярную фазу с периодом повторяемости $\sim 64.5 \text{ \AA}$ при $T = 5 \text{ }^\circ\text{C}$. Добавление кальция приводит к разрушению ламелярной структуры вплоть до $C_{Ca^{2+}} = 10 \text{ мМ}$, что соответствует состоянию II. Этот экспериментальный факт был подтвержден в работе [77]. Авторы сделали предположение о том, что основными силами, разрушающими ламелярную фазу ДПФХ бислоев, является электростатическое отталкивание. Теоретический анализ электростатического катион-дипольного взаимодействия для системы ДПФХ/ Ca^{2+} был проведен Изумитани (*Izumitani*) [109,112]. Вместе с этим в системе формируются ОСВ. Используя метод малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН), Ухрикова (*Uhríková*) с коллегами пришли к выводу о формировании ОСВ ДПФХ в диапазоне концентраций ионов кальция от 1 до 60 мМ [62]. В работе Иноко и др. [50] не было обнаружено подобного эффекта. Отсутствие дифракционных пиков в состоянии II обусловлено тем, что большие ОСВ не проявляют дальний порядок. Акаши (*Akashi*) и др. [113] методом микроскопических наблюдений зафиксировали спонтанное формирование больших ОСВ ПОФХ (0.12 мг/мл) диаметром 25 $\mu\text{м}$ в диапазоне концентраций

CaCl_2 1 – 100 мМ. Причем количество этих везикул с увеличением $C_{\text{Ca}^{2+}}$ сокращается с 1100 при 1 мМ до 1 при 100 мМ.

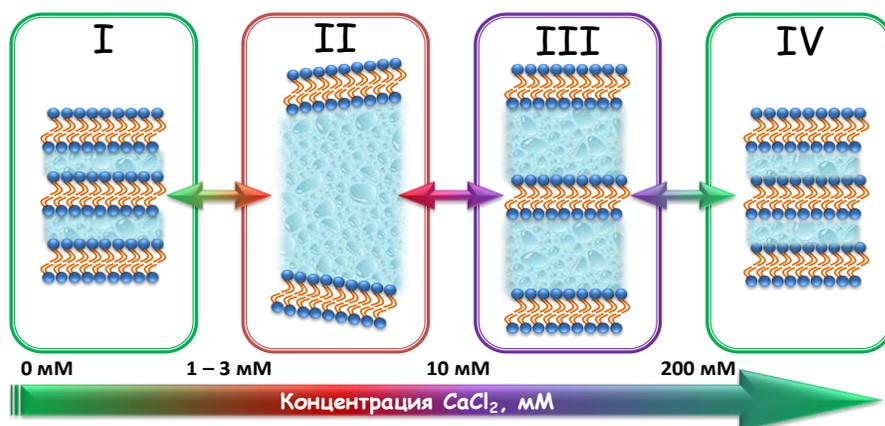


Рис. 1.15. Структура МСВ ДПФХ в зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} (адаптировано из [50])

В диапазоне концентраций ионов Ca^{2+} от 10 до 200 мМ (III) электростатическое отталкивание постепенно экранируется противоионами и формируется частично разупорядоченная ламелярная фаза с периодом повторяемости 150–200 Å [50,114]. Длина экранирования Дебая b определяется по формуле [115]:

$$b = \left(\frac{e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T} \sum_i \chi_i z_i^2 \right)^{-1/2}, \quad (1.14)$$

где ϵ_0 , ϵ_r - диэлектрические проницаемости, k_B - постоянная Больцмана, χ_i - плотность i -го иона с зарядовым числом z_i . С увеличением концентрации величина b уменьшается. Так, например, для 1 – 10 мМ CaCl_2 длина экранирования Дебая изменяется с 56 Å до 17 Å. Дальнейшее увеличение $C_{\text{Ca}^{2+}}$ возвращает систему в ламелярную фазу (IV).

Толщина липидного бислоя МСВ

Несмотря на многочисленные исследования влияния ионов Ca^{2+} на липидные бислои до сих пор не сформировалась единая точка зрения о структурных изменениях фосфолипидов. Так, например, ЯМР эксперименты [84,85] свидетельствуют о конформационных изменениях в полярной области ДМФХ бислоев. Шибата с коллегами [87] утверждает об увеличении параметров порядка как в области полярной головы, так и в углеводородных цепях ДМФХ бислоев для концентраций кальция $C_{\text{Ca}^{2+}} \geq 1$ мМ. В то же время Хустер с рядом авторов [110] упоминают только об изменениях организации углеводородных цепей ДМФХ бислоев при $C_{\text{Ca}^{2+}} \geq 15$ мМ в ЖК фазе (37 °С). В этой работе говорится об уменьшении поверхностной площади молекулы ДМФХ на 2.7 Å² при заданных условиях. Кроме того, есть данные,

полученные методом инфракрасной спектроскопии, предполагающие глубокое проникновение двухвалентных ионов в полярную область бислоя, тем самым вызывая частичную дегидратацию головной группы [91]. 5-10 мМ кальция приводит к значительному изменению сжимаемости ДПФХ монослоя [116] и везикул [117]. Конформационные изменения должны приводить к росту толщины липидного бислоя. Однако в литературе встречается достаточно много работ, при анализе которых можно сделать вывод о том, что на толщину липидного бислоя ионы кальция не оказывают никакого влияния.

Эксперименты Лис и др. [76,77] по гидратации свидетельствуют об отсутствии эффекта влияния кальция на толщину ДПФХ бислоев в ламелярной фазе. Рентгеноструктурные данные были проанализированы, используя приближение Луззати [4], предполагая, что липид и вода формируют отдельные слои. Татулян и др. [79], используя тот же самый подход для нейтронных данных, пришли к выводу о том, что толщина бислоя липида в ограниченной гидратации (отношение молекулярных масс $2\text{H}_2\text{O}:\text{DPPC} = 12:1$) не зависит от присутствия ионов кальция с точностью $\pm 2 \text{ \AA}$. Так в присутствии 100 мМ CaCl_2 толщина липидного бислоя ДПФХ составляет 45.6 \AA при 20 °С и 35.5 \AA при 55 °С. Для чистых двойных слоев ДПФХ определены толщины как 43.1 \AA при 20 °С и 33.9 при 55 °С.

Исследование эффекта кальция на толщину двойного слоя липида затруднено из-за набухания мультислоев и отсутствия дифракции. Эффективным методом для решения поставленной задачи является малоугловое рассеяние нейтронов. В работе [62] определено, что в ЖК фазе ($T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$) исследуемая величина d_b не изменяется в диапазоне $C_{\text{Ca}^{2+}}$ от 1 до 40 мМ и равна 43.2 \AA , в гель фазе ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$) толщина бислоя изменяется нелинейно и имеет максимум при $C_{\text{Ca}^{2+}} \sim 5 \text{ мМ}$. Для анализа данных МУРН было применено приближение Луззати. Применение стрип-функциональной модели [118] для тех же данных позволило сделать вывод об идентичном поведении величины d_b с изменением концентрации ионов кальция в обеих фазах. Максимальные значения толщин липидных бислоев 54.4 \AA при $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ и 50.6 \AA при $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ $C_{\text{Ca}^{2+}} \sim 2.5 \text{ мМ}$ при мольном отношении ДПФХ: $\text{Ca}^{2+} \sim 5:1$. При данной концентрации Ca^{2+} определены минимальные значения таких структурных параметров, как A_l - площадь, приходящаяся на одну ДПФХ молекулу и n_w - количество молекул воды, расположенных в полярной области липидной головы. Различия значений $\Delta d_b \sim 1.8$ и 2.6 \AA , $\Delta A_l \sim 2.3$ и 4.7 \AA^2 в гелевой и ЖК фазах, соответственно, для везикул с CaCl_2 и чистых везикул ДПФХ, приготовленных методом экстудирования (использованы поликарбонатные фильтры с диаметром 500 \AA), что подтверждает данные о конформационных изменениях липидных молекул в бислое. Толщины липидных бислоев для

везикул, приготовленных в присутствии 60 мМ CaCl₂, и экстудированных ОСВ ДПФХ без кальция с точностью экспериментальной ошибки одинаковы.

Неразрешенные вопросы

Как можно заметить, большинство работ по данной тематике выполнено для концентраций кальция $C_{Ca^{2+}} \geq 1$ мМ, когда МСВ находятся в так называемом «несвязанном» состоянии. До настоящего времени ***нет данных об изменении структуры ФХ мембран в области перехода МСВ из «связанного» состояния в «несвязанное»*** (I → II на Рис.1.15). К тому же ***характер самого этого перехода до сих пор является предметом обсуждения***. С одной стороны, ряд экспериментальных работ говорит в пользу резкого (скачкообразного) перехода, как, например, в МСВ 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолине (ДПФХ) [114]. С другой стороны, в результате анализа ренорм-групп [51] методом Монте-Карло [119] и в приближении среднего поля [120] показано, что обсуждаемый переход должен иметь непрерывный характер. Однако предсказываемый теоретический эффект непрерывного перехода может иметь место только в жидкокристаллической фазе, в которой кроме сил притяжения Ван-дер-Ваальса и электростатических сил отталкивания существенный вклад в баланс сил межмембранного взаимодействия вносят и ондуляционные силы [121]. Кроме того, до настоящего времени ***не определена критическая концентрация этого перехода и ряд важных физико-химических параметров в этой области: константа связывания, поверхностная плотность заряда и другие***.

Решению этих вопросов посвящена глава 3, где представлены результаты исследования влияния ионов кальция на структуру МСВ ДМФХ (0.5 и 1 мас.%) в избытке растворителя CaCl₂•2H₂O/D₂O как в ЖК, так и в гелевой фазах, полученные с помощью метода МУРН.

1.4. Обзор межмембранных взаимодействий ФХ мембран в присутствии сульфоксидов

Как отмечалось ранее, липидный бислои является структурной основой биологических мембран. Прежде всего, липидный бислои влияет и/или определяет многие свойства как самих мембран, так и белков, встроенных в него [1]. С этим и связано интенсивное изучение влияния различных растворителей, в том числе и сульфоксидов, особенно диметилсульфоксида, ДМСО (C₂H₆SO), на структуру и свойства липидных мембран [122-128]. ДМСО – биполярный апротонный растворитель, обладающий высокой проникающей способностью, – широко используется в таких областях как клеточная биология, криобиология, фармакология, медицина и сельское хозяйство [129,130]. Исследованию

влияния ДМСО в качестве растворителя на структуру липидных мембран были посвящены работы [126,127]. Кроме того, ДМСО широко используется в качестве криопротектора. Криозащитные агенты являются важным инструментом для многочисленных биологических, биофизических и медицинских исследований. Механизм взаимодействия криопротекторов разный. Так, природные сахара обеспечивают защиту без проникновения в клетку, многоатомные спирты и глицерин, проникая внутрь клетки, уменьшают вероятность образования кристаллов льда. Наибольший интерес представляют криопротекторы, такие как диметилсульфоксид, которые могут заменять молекулы воды, связанные с клеточными элементами, а также влиять на структуру воды.

Важно заметить, что применение ДМСО в различных областях в качестве растворителя, агента слияния или криопротектора определяется его концентрацией в растворе. Это связано с особенностями взаимодействия липид-ДМСО при малых или больших долях ДМСО в растворителе, а это в свою очередь приводит к различным изменениям структуры липидных мембран в присутствии ДМСО.

ДМСО изменяет фазовые состояния липидных мембран

Влияние растворителей на липидный бислой различно. Например, температура основного фазового перехода (T_m) ДПФХ фосфолипидов, диспергированных в трегалозе уменьшается с 42 до 24 °С [131]. Глицерин значительно снижает T_m с ростом концентрации [132]. В отличие от указанных выше растворителей, ДМСО повышает T_m мультислойных ДПФХ и ДМФХ [125,127,133]. Так, в работе [134] проведено комплексное изучение влияния ДМСО в диапазоне $X_{\text{ДМСО}}$ от 0 до 1 ($X_{\text{ДМСО}}$ – мольная доля ДМСО в растворе вода/ДМСО) для липосом ДМФХ (20 мас.%) в $\text{H}_2\text{O}/\text{ДМСО}$, полученных с помощью ультразвука, методом ДСК. В этой работе показано, что температуры предперехода ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) и основного фазового перехода ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) возрастают линейно с увеличением $X_{\text{ДМСО}}$ от 0 до 0.2. При $X_{\text{ДМСО}} \geq 0.2$ ($X_{\text{ДМСО}} = 0.16$ в [125]) риппл фаза исчезает, что подтверждает ранее опубликованные данные для ФХ мембран [135], в которой основной причиной подобного явления называется уменьшение стерического отталкивания между головами липидных молекул и, как следствие, стабилизация гель фазы в присутствии ДМСО ($X_{\text{ДМСО}} \geq 0.2$). Стоит отметить, что чем длиннее углеводородная часть липида, тем при меньшем содержании ДМСО в растворе вода/ДМСО происходит исчезновение риппл фазы как при нагревании, так и при охлаждении [135]. Кроме этого Тристрам-Наджел (*Tristram-Nagle*) с коллегами обнаружили

методом ДСК наличие новой, так называемой саб-гель, фазы для ДПФХ мембран в растворе вода/ДМСО при $X_{\text{ДМСО}} \leq 0.2$ [125]. Формирование этой фазы связывают с эффектом дегидратации. В диапазоне $0.3 \leq X_{\text{ДМСО}} \leq 0.9$ влияние ДМСО на величину T_m для ДПФХ мембран несущественно, как было показано методом рентгеновской дифракции в [127]. Значение температуры основного фазового перехода значительно возрастает при полной замене воды на ДМСО: 82.2 °С для ДМФХ [134], 77 °С для ДПФХ [127].

Структура липидных мембран в присутствии ДМСО

Структурные исследования липидных мембран ДПФХ в присутствии ДМСО, проведенные методом рентгеновской дифракции показали, что увеличение мольной доли ДМСО в растворе вода/ДМСО приводит к уменьшению периода повторяемости ФХ мембран. Наиболее существенные изменения величины d для ДПФХ при $T = 20$ °С были обнаружены в диапазоне $0 \leq X_{\text{ДМСО}} \leq 0.133$, незначительное уменьшение d при увеличении $X_{\text{ДМСО}}$ до 0.3, в интервале от 0.3 до 0.9 не было выявлено влияния увеличения концентрации ДМСО на период повторяемости. Значительные изменения наблюдаются при мольной доли ДМСО более 0.9. Этот участок характеризуется резким уменьшением величины d , что соответствует переходу мембран в фазу с взаимным проникновением цепей (*interdigitated phase*) [127]. Проведенные детальные исследования для ДПФХ в присутствии ДМСО от 0 до 0.2 в диапазоне температур 10÷51 °С указывают на уменьшение периода повторяемости во всех фазах [125]. Так же в этих работах сделан вывод об уменьшении межмембранного расстояния с увеличением $X_{\text{ДМСО}}$.

Причиной описанных выше эффектов влияния ДМСО на структуру липидных мембран является способность ДМСО даже при малых мольных долях ($X_{\text{ДМСО}} < 0.1$): изменять свойства «несвязанной» воды (увеличение вязкости, уменьшение диффузии), а так же разрушать водородные связи «связанной» воды, вызывая дегидратацию молекул воды с мембраной поверхности [136]. Очевидно, что ДМСО при $X_{\text{ДМСО}} < 0.1$ существенным образом влияет на структуру воды, окружающую мембрану, а не на структуру и динамику самой мембраны. Именно этот факт делает ДМСО привлекательным для применения его в качестве криопротектора. При $X_{\text{ДМСО}} > 0.1$ наблюдается уменьшение подвижности PO_4^- и $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ групп липидных молекул МСВ и ОСВ, что может быть связано с притяжением липидных молекул в латеральной плоскости в присутствии ДМСО [136]. Вопрос относительно изменения структуры ФХ мембран при большом содержании ДМСО в растворе ($X_{\text{ДМСО}} > 0.3$) до сих пор остается открытым. С одной стороны, Ю и Куин (*Yu and Quinn*) в [126]

определи, что толщина липидного бислоя уменьшается с увеличением ДМСО в растворителе, предполагая, что вместе с этим возрастает площадь липидных молекул. С другой стороны, методом МД показано, что при полной замене воды на ДМСО площадь липидных молекул практически не изменяется [128]. Так же нет однозначного мнения относительно глубокого проникновения молекул ДМСО внутрь липидного бислоя, о котором было упомянуто в работе [135]. Методом МД, например, напротив, было показано отсутствие интенсивного проникновения молекул ДМСО в область углеводородных хвостов ДПФХ мембран [128].

Межмембранные взаимодействия липидных мембран

Межмембранные взаимодействия определяются балансом сил притяжения Ван-дер-Ваальса и сил отталкивания. В работе [127] сделан вывод о доминирующей роли изменения сил отталкивания в балансе сил межмембранного взаимодействия при увеличении концентрации ДМСО, поскольку константа Гамакера (1.11) значительно уменьшается только до $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ (0.8 kT по сравнению с 1.6 kT для ДПФХ в воде), и при дальнейшем увеличении ДМСО незначительно изменяется до 0.7 kT (минимальное значение $H = 0.65 \text{ kT}$ при $X_{\text{ДМСО}} = 0.5$). Аналогичный вывод о том, что уменьшение межмембранного расстояния с ростом мольной доли ДМСО в растворе вода/ДМСО – результат ослабления сил отталкивания, сделан и в работе [128]. Горделий с коллегами обсуждают роль и природу (сольватационную или энтропийную) короткодействующей гидратационной отталкивающей силы, определяемую формулой (1.9), для ДПФХ в гелевой фазе [127], в которой, как известно, жесткость изгиба липидных бислоев больше, чем в ЖК фазе, вследствие чего считается, что ондуляции Хельфрига в гелевой фазе подавлены. Смондырев и Берковиц (*Smondyrev and Berkowitz*) анализируют как короткодействующие, так и дальнедействующую силы отталкивания для ДПФХ в ДМСО для ДПФХ в ЖК фазе на основе данных молекулярной динамики (МД) [128]. Как показали Макинтош и Саймон (*McIntosh and Simon*) [42], силы отталкивания, действующие между фосфолипидными мембранами в воде, можно разделить на три составляющие: (1) ондуляционные ($d_w \sim 1 \text{ нм}$), возникающие в результате коллективных колебаний липидных молекул; (2) гидратационные ($d_w \sim 0.4\div 0.8 \text{ нм}$) – эффект сольватации головных групп водой; (3) стерические ($d_w < 0.4 \text{ нм}$), обусловленные выступами отдельных молекул вдоль нормали к мембранной поверхности или конформационными изменениями головных групп. Не вдаваясь в глубокий анализ МД, здесь сформулированы основные выводы работы [128] относительно ослабления всех трех вышеперечисленных компонент силы отталкивания: полная замена воды на ДМСО приводит к увеличению

порядка между головными группами, взаимодействия между ними усиливаются (возрастание T_m с ростом $X_{\text{ДМСО}}$ так же свидетельствуют в пользу этого утверждения), в результате чего увеличивается жесткость мембраны и, как следствие, ондуляции фосфолипидных мембран ослабевают; гидратационная составляющая так же уменьшается, поскольку ДМСО разрушает водородные связи «связанной» воды; МД расчеты показали, что вектор P^-N^+ ДПФХ в ДМСО направлен в сторону бислоя, что должно приводить к уменьшению высккивания отдельных молекул из липидного бислоя, а это в свою очередь свидетельствует об уменьшении стерического отталкивания, когда соседние мембраны сближаются.

Модель взаимодействия ДМСО с липидными молекулами

Все процессы, наблюдаемые при взаимодействии ДМСО с липидными мембранами: возникновение/исчезновение фаз, увеличение температуры основного фазового перехода ФХ мембран, уменьшение межмембранного расстояния МСВ с увеличением мольной доли ДМСО связаны, в первую очередь, с эффектом дегидратации. Основываясь на данных нейтронной и рентгеновской дифракции, в работе [136] предложена модель, описывающая механизм связи молекул ДМСО с полярной головой липидных молекул при малых концентрациях ДМСО ($X_{\text{ДМСО}} < 0.1$).

Молекулы ДМСО предположительно имеют анизотропную ориентацию относительно мембранной поверхности (Рис. 1.16). Принимая во внимание эффект дегидратации, одним из сценариев взаимодействия ДМСО-липид является возможность ДМСО динамически замещать гидратационную воду фосфатной группы (1). При этом ДМСО ориентируется таким образом, что атом серы притягивается к отрицательно заряженной фосфатной группе PO_4^- , а обе CH_3 группы направлены наружу от фосфора. Так же возможна ситуация, когда ДМСО динамически замещает гидратационную воду, расположенную вблизи положительно заряженного азота холиновой части, что облегчается притяжением между азотом холина и кислородом ДМСО (2). Взаимодействие между метильными (гидрофобными) группами и водой в обеих представленных конфигурациях будет очень слабым или отсутствовать совсем, в результате чего и происходит ослабление водородных связей связанной воды.

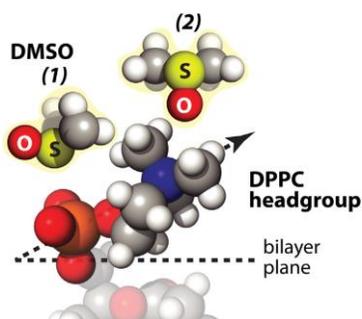


Рис. 1.16. Схема предположительных ориентаций ДМСО на поверхности ОСВ ДПФХ в условии динамического равновесия; ДМСО не постоянно замещает (т.к. не сильно адсорбируется на головных группах ФХ) связанную воду головных групп ФХ [136].

Авторы обсуждаемой работы утверждают, что эффект дегидратации доминирует над эффектом регидратации (эффект возможен при конфигурации (1): атом кислорода – сильный акцептор водорода) на поверхности липидной мембраны, так как отношение коэффициентов диффузии для связанной и свободной воды увеличивается с концентрацией ДМСО. Кроме этого отмечается, что подобные ориентации ДМСО на поверхности липидной мембраны приводят к ограниченному движению липидных головных групп (ДПФХ > ДОФХ).

Таким образом, динамические конфигурации липид-ДМСО (1) и (2), представленные на Рис.1.16, являются наиболее вероятными, однако нельзя исключать и возможность взаимодействия ДМСО-ДМСО или формирование «неидеальной водородной связи на поверхности липидной мембраны», что может дополнительно влиять на взаимодействие ДМСО с мембранной поверхностью.

Стоит отметить, что подобные конфигурации ДПФХ-ДМСО были обнаружены ранее и при $X_{\text{ДМСО}} = 1$ методом МД [128]. Оказалось, что на ориентацию молекул ДМСО сильное влияние оказывают атомы кислорода, связанные с фосфором двойной связью, в то время как односвязные кислороды не налагают никакой предпочтительной ориентации. Кроме того, в этой же работе показано, что направление P^--N^+ диполя ДПФХ изменяется от $+9^\circ$ до -4° относительно мембранной поверхности при полной замене воды на ДМСО.

ДМСО индуцирует слияние мембран

Диметилсульфоксид является и одним из наиболее востребованных фьюжен агентов. Уменьшение периода повторяемости МСВ с увеличением ДМСО [125,127] указывает на тот факт, что соседние мембраны могут находиться на достаточно близком расстоянии друг от друга, а это является необходимым условием для I-ой стадии слияния мембран. В присутствии ДМСО происходит образование пор в мембранах, в результате чего увеличивается их проницаемость [137]. Другим важным моментом является тот факт, что при добавлении этого сульфоксида наблюдается уменьшение жесткости мембран [138]. Это в свою очередь инициирует процесс слияния.

ДЭСО vs. ДМСО

Диэтилсульфоксид, ДЭСО ((C₂H₅)₂SO), – растворитель, который по структуре отличается от хорошо изученного ДМСО на две CH₂ группы (Рис. 1.17), что делает возможным предположить, что гидрофобные взаимодействия будут вносить существенный вклад в межмембранные взаимодействия в присутствии ДЭСО.

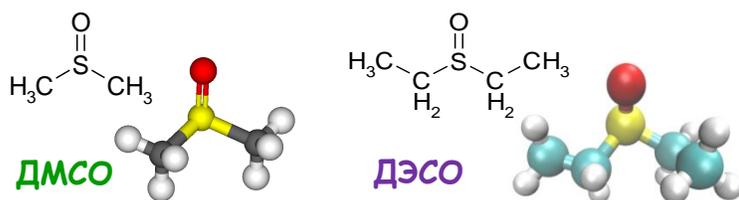


Рис. 1.17. Структура ДМСО (слева) и ДЭСО (справа)

Первые результаты, полученные с ДЭСО, являются весьма обнадеживающими. Исследования чистых растворителей методом МД указывает на тот факт, что добавление CH₂ групп уменьшает мобильность молекул и увеличивает вязкость жидкостей, переориентация диполей в ДЭСО происходит медленнее чем в ДМСО [139]. Изучение растворов сульфоксид-вода методом спектроскопии (рамановской и ИК) показало сильное взаимодействие ДЭСО с водой, даже сильнее, чем ДМСО-вода [140]. Исследование способности ДЭСО действовать, как эффективный криопротектор на выживание кишечной палочки подтверждает, что ДЭСО более чем ДМСО, способен проникать в живые ткани, не причиняя тем самым им значительный ущерб [141]. Было показано, что температура тепловой денатурации сывороточного альбумина человека уменьшается в присутствии ДЭСО. Гидрофобные взаимодействия сульфоксидов с поверхностью белка является одной из вероятных причин этого. Электронно-спектроскопические исследования показывают, что для ДЭСО этот эффект наблюдается при более низких концентрациях по сравнению с ДМСО [142]. Флуоресцентные измерения свидетельствуют о том, что формирование гидрофобного слоя защищает белок от необратимых структурных изменений при низких температурах.

Взаимодействия ДЭСО и ДМСО с биологическими мембранами, вероятно, идентичны. Было показано, что ДЭСО как и ДМСО увеличивает температуру основного фазового перехода ФХ мембран методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [134] и с помощью рентгеновской дифракции [143], при $X_{\text{ДЭСО}} \geq 0.2$ риппл фаза исчезает [134]. В последней работе так же определено, что частичная дегидратация липидного бислоя липосом ДПФХ и одновременное изменение структуры воды имеет место при низких концентрациях сульфоксидов (20 мас. %), в то время как сульфоксиды взаимодействуют непосредственно с поверхностью липидной мембраны при высоких концентрациях ДЭСО и ДМСО

(≥ 40 мас.%). Таким образом, можно предположить, что гидрофобные взаимодействия действительно играют решающую роль в межмембранных взаимодействиях в присутствии сульфоксидов.

Аспекты влияния сульфоксидов на межмембранные взаимодействия и структуру ФХ мембран, требующие дополнительных исследований

Подводя итог этого раздела нельзя не отметить, что, несмотря на всю важность и широкий спектр применения ДМСО в различных областях, ряд существенных вопросов остается открытым и требует дополнительных исследований.

Так, например, до сих пор нет однозначного мнения относительно изменения толщины мембран в присутствии ДМСО, и, что более важно, ***не получено прямой информации о влиянии ДМСО на толщину мембран и межмембранное расстояние (межмембранные взаимодействия) в избытке растворителя вода/ДМСО. Чрезвычайно важным было бы получить прямую информацию о взаимодействии ДМСО с мембранной поверхностью.***

Кроме того, первые исследования с ДЭСО позволяют говорить о перспективах его применения как растворителя в фармакологии, медицине, сельском хозяйстве, так и в качестве криопротектора в клеточной биологии и криобиологии. Важно заметить, что ДМСО, как и большинство используемых в настоящее время криопротекторов (глицерин, этиленгликоль, метанол, пропиленгликоль и т. д.) токсичен для живых клеток. Степень токсичности зависит от концентрации криопротектора, используемой для замораживания растительных или животных клеток. Эта проблема широко обсуждалась ранее в работах [144]. DESO менее токсичен, чем ДМСО, и глицерин, например, для *E.coli* [141]. С другой стороны, предположение о важной роли гидрофобных взаимодействий в межмембранных взаимодействиях, которые в присутствии ДЭСО более выражены, чем в присутствии ДМСО, делают привлекательным использование ДЭСО в качестве растворителя, усиливающего проницаемость мембран или в роли агента для целенаправленного слияния клеток. С этой точки зрения ***весьма актуальной была бы информация о взаимодействии ДЭСО-липид и влиянии этого сульфоксида на структуру ФХ мембран как при малых, так и при больших мольных долях ДЭСО в растворе ДЭСО/вода.***

Сравнительному анализу влияния сульфоксидов на фазовые переходы, структуру ФХ мембран (в избытке растворителя) и их взаимодействия методом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) и будет посвящена глава 4 диссертационной работы.

1.5. Методы исследования структуры липидных мембран

Наиболее доступным методом исследования структуры биологических мембран является микроскопия: оптическая, электронная (сканирующая и просвечивающая) или атомно-силовая (Рис.1.18). Несмотря на бурное развитие приборной базы, направленное на улучшение разрешающей способности микроскопов, возможности проведения экспериментов в режиме реального времени и т.д., микроскопия по прежнему имеет один существенный недостаток – локальное изучение поверхности объекта.



Рис.1.18. Сравнение характерных размеров исследуемых объектов и методы исследования конденсированных сред

Однослойные или многослойные везикулы, образованные из ФХ в избытке растворителя, имеют характерные размеры от сотни до тысячи ангстрем, что соответствует допустимому диапазону исследуемых объектов (10 – 1000 \AA) методами малоуглового нейтронного (МУРН) и рентгеновского (МУРР) рассеяния. Бесспорным преимуществом малоуглового рассеяния (МУР) в отличие от микроскопии является получение интегральной информации об исследуемой системе. Конечно, среди явных недостатков МУР можно упомянуть о сложности метода, получение информации в обратном пространстве или, что на первый взгляд, кажется более существенным – неоднозначная интерпретация экспериментальных данных. Подобный вопрос актуален в том случае, если нет никакой

первоначальной информации о внутренней структуре исследуемого объекта или она является достаточно сложной. Что касается ФХ мембран, то липидный полиморфизм достаточно хорошо известен, как подробно было описано в разделе 1.1. настоящей главы, и даже при усложнении системы (например, исследование двухкомпонентных липидов или добавление в растворитель дополнительных компонент) их внутреннюю структуру можно предсказать заранее.

Различия между МУРН и МУРР также являются определяющими в выборе метода исследования структуры вещества. Рентгеновские лучи и нейтроны имеют разную природу взаимодействия с веществом: рентгеновские лучи рассеиваются на электронной оболочке атома, в то время как нейтроны взаимодействуют с атомным ядром и, как следствие, обладают большей глубиной проникновения в вещество.

Основным достоинством рентгеноструктурного анализа является его относительная доступность, высокая скорость накопления экспериментальной информации и хорошее разрешение. Серьезной же проблемой для метода рассеяния рентгеновских лучей является изучение распределение воды в мембранах, что связано с низкой рассеивающей плотностью воды. Другим недостатком является низкая пропускаемая способность рентгеновских лучей через вещество. Оптимальная толщина для изучения водных дисперсий биологических объектов равна 1мм. Вследствие того, что плотность рассеяния многих исследуемых объектов близка к плотности рассеяния воды, как например, для большинства полимеров, не возникает контраста между изучаемым объектом и водой, в которой он находится.

На сегодняшний день МУРН является одним из эффективных методов исследования как структуры ОСВ И МСВ в избытке воды в частности, так и структуры биологических объектов, в общем. Связано это с тем, что рассеяние нейтронов имеет ряд уникальных свойств:

- глубокое проникновение в вещество в отличие от рентгеновских лучей;
- возможность изотопного замещения (полная или частичная замена водорода на дейтерий) – различие нейтронных амплитуд рассеяния для водорода и дейтерия по величине и знаку позволяет (практически не меняя свойств изотоп-меченного объекта от обычного) изучать положение дейтерированной метки или распределение воды в объекте, замещая простую воду на дейтерированную;
- некогерентное сечение рассеяния мало по сравнению с когерентным, за единственным исключением атома водорода.

1.6. Заключение к главе 1

В данной главе кратко приведены основные свойства фосфолипидных мембран и рассмотрен молекулярный базис липидного полиморфизма. В литературном обзоре обсуждены общие положения межмембранных взаимодействий в воде. Особое внимание уделено рассмотрению влияния электростатики и водородных связей на фазовые переходы, структуру и межмембранные взаимодействия липидных мембран. Кроме того, рассмотрен вопрос о спонтанных процессах в липидных мембранах в присутствии ионов и полярных молекул. Представлены современное состояние изучения взаимодействия ионов кальция с липидными мембранами и дан обзор межмембранных взаимодействий ФХ мембран в присутствии сульфоксидов.

В литературном обзоре приведен сравнительный анализ методов исследования в области межмембранных взаимодействий, являющиеся предметом диссертации. Показано, что малоугловое рассеяние, а особенно МУРН, являются приоритетными методами для точного определения структурных параметров бислоя, что в свою очередь крайне важно для понимания вопросов, обсуждаемых в диссертации.

ГЛАВА 2 . МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Приготовление образцов

Для изучения задач, поставленных в диссертационной работе, были использованы мультислойные (МСВ) и однослойные (ОСВ) фосфолипидные везикулы. Конечная концентрация липида составляла от 0.5 до 2 весовых процентов (мас.%) для исследований, проводимых методом МУРН.

Вещества

Синтетические глицерофосфолипиды с двумя углеводородными цепями R₁ и R₂ (Таблица 2.1.) получены из фирм Avanti (England) и Sigma-Aldrich (Germany), использованы без дополнительной очистки.

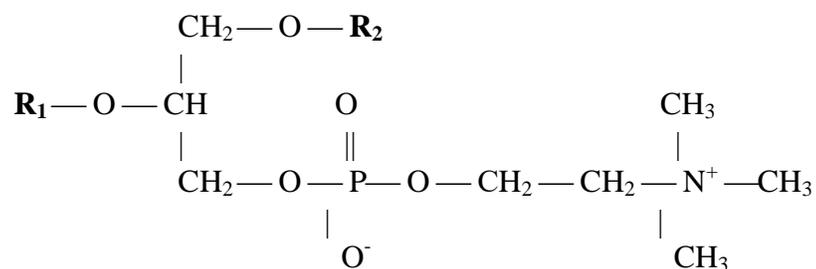


Таблица 2.1.

Название	Акроним	Молекулярная формула	Углеводородные цепи
1,2-Димиристоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфадилхолин	14:0 PC ДМФХ	C ₃₆ H ₇₂ NO ₈ P	R ₁ =R ₂ =CO(CH ₂) ₁₂ CH ₃
1,2-Димиристоил(d54)- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфадилхолин	14:0 PC-d54 ДМФХ-d54	C ₃₆ H ₁₈ NO ₈ PD ₅₄	R ₁ =R ₂ =CO(CD ₂) ₁₂ CD ₃
1,2-Дипалмитоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфадилхолин	16:0 PC ДПФХ	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	R ₁ =R ₂ =CO(CH ₂) ₁₄ CH ₃

Для приготовления образцов использовалась деионизированная вода, очищенная на установке Millipore до 18 МОм·см, сульфоксиды, дигидрат хлорида кальция и тяжелая вода, данные, о которых приведены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2.

Название	Акроним	Молекулярная формула	Фирма, страна
диметилсульфоксид	DMCO DMCO-d6	(CH ₃) ₂ SO (CD ₃) ₂ SO	Fluka (Buchs, Switzerland)
диэтилсульфоксид	DECO	(C ₂ H ₅) ₂ SO	Реахим (Москва, Россия)
дигидрат хлорида кальция		CaCl ₂ •2H ₂ O	Serva(Heidelberg, Germany)/ Сигма (Москва, Россия)
тяжелая вода		D ₂ O (99,8 %)	Изотоп (Санкт-Петербург, Россия)
деионизированная вода		H ₂ O	Система очистки воды MILLI-Q (Millipore, Франция)

Приготовление мультислойных везикул (МСВ)

Для исследуемых задач применялся традиционный метод приготовления МСВ:

- Готовился буфер (а) 10 мМ (ммоль/л) раствор CaCl₂•2H₂O/D₂O с его дальнейшим добавлением к D₂O для получения необходимой молярной концентрации ионов Ca²⁺ ($C_{Ca^{2+}}$) от 0 до 10 мМ, (б) раствор сульфоксид/вода с заданным значением X от 0 до 1, где X - мольная доля сульфоксида в смеси сульфоксид/вода;
- Липид добавлялся к воде, к растворам CaCl₂•2H₂O/D₂O или сульфоксид/вода в заданной концентрации;
- Для равномерного распределения органического растворителя или ионов кальция, связанных с липидными молекулами, использовался шейкер. Однородный раствор был получен методом замораживания – оттаивания в диапазоне $T = \pm 20$ °С от температуры главного фазового перехода используемого липида. Процедура повторялась 6 раз.
- Полностью гидратированные многослойные везикулы выдерживались в течение суток при комнатной температуре для получения равновесной системы.

Приготовление однослойных везикул (ОСВ)

Большие однослойные везикулы для исследований методом МУРН были приготовлены путем пропускания приготовленного раствора МСВ через поликарбонатные фильтры диаметром 100 нм с помощью экструдера (Hamilton Co., Reno, Nevada, USA) при температуре выше T_m . После 25 повторений получался раствор ОСВ с размерами не более диаметра пор

фильтра [145,146]. Везикулы оставались стабильными в течение достаточно длительного времени, слипание везикул не происходило нескольких суток.

Конечная концентрация липида составляла 0.5–2 мас. % для малоугловых нейтронных исследований. Подобный метод приготовления образцов применялся для исследования, как структуры, фазовых переходов МСВ, так и спонтанных процессов (например, слияние мембран или формирование ОСВ из МСВ) методом МУРН.

2.2. Малоугловое рассеяние нейтронов

Малоугловым называется упругое рассеяние на неоднородностях вещества, размеры которых существенно превышают длину волны излучения. Этот метод эффективно используется для исследований в области физики конденсированных сред. В большинстве исследовательских реакторов, нейтронные пучки из источника попадают в замедлитель (обычно водяной), и теряют свою энергию. Энергия нейтронов становится равной $0.5\text{--}5\cdot 10^{-3}$ эВ ($\lambda \sim 0.41\text{--}4.05$ Å), в зависимости от свойств замедлителя.

Для исследований, как правило, применяются нейтроны с длинами волн в интервале 1–10 Å. Межатомные расстояния в конденсированной фазе вещества имеют такой же порядок величины, поэтому для исследования надатомной структуры достаточно регистрировать дифракционную картину в области малых углов рассеяния. Отсюда и сам метод исследований получил название «малоуглового». Важнейшей особенностью метода МУРН является возможность анализа внутренней структуры разупорядоченных систем, и зачастую его применение - единственный способ получения прямой структурной информации о системах с хаотическим расположением неоднородностей плотности коллоидного размера (порядка 10^{-7} - 10^{-4} см).

В 50-х годах прошлого столетия, в работах Г. Порода, П. Дебая и О. Кратки были развиты основные принципы и подходы, лежащие в основе метода. Новый этап развития малоуглового рассеяния начался в конце 60-х годов и продолжается до сих пор. Этот этап характеризуется принципиально новыми возможностями как в эксперименте (мощные нейтронные пучки, синхротронное излучение, координатные детекторы), так и в методах структурной интерпретации (вариация контраста и изоморфные замещения, прямые методы, анализ характеристических функций) [147].

2.2.1. Основные принципы МУРН

Информацию о структуре, форме и свойствах изучаемых объектов получают из анализа интенсивности или амплитуды падающих и рассеянных пучков. Падающая волна – плоская, в то время как рассеянная волна – сферическая [147]:

$$A_0 e^{ik_0 r} + \frac{A_0 b}{|r|} e^{ik_1 r}, \quad (2.1)$$

где k_0 и k_1 - волновые векторы падающей и рассеянной волн, модуль которых связан с длиной волны (λ) соотношением $|k_0| = |k_1| = 2\pi/\lambda$; A_0 и $(A_0 b)/|r|$ – амплитуды соответствующих волн.

Для учета рассеяния на множестве центров введено понятие пространственное распределение плотности когерентной амплитуды рассеяния $\rho(\vec{r}) = \bar{b} N_a(\vec{r})$, где \bar{b} – средняя когерентная амплитуда рассеяния нейтронов для частицы (или растворителя), а $N_a(\vec{r})$ – распределение атомной плотности в частице (или растворителе). Тогда, амплитуду рассеяния можно записать в виде:

$$A(q) = \int \rho(r) e^{2\pi i q r} dr, \quad (2.2)$$

где $\rho(r)$ – распределение плотности длины рассеяния рассеивающих центров, q – вектор рассеяния. Квадрат модуля амплитуды рассеяния волны пропорционален интенсивности рассеяния волн и равен дифференциальному сечению рассеяния:

$$I(q) \sim \frac{d\sigma}{d\Omega} = |A(q)|^2 \quad (2.3)$$

Если рассеяние происходит на объектах с изотропной плотностью рассеяния, то можно усреднить сечение рассеяния по всем возможным пространственным ориентациям частиц относительно вектора рассеяния q и получить сечение рассеяния в виде формулы Дебая:

$$\left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle = \int_{V_1} \int_{V_2} \rho(r_1) \rho(r_2) \frac{\sin qr_{12}}{qr_{12}} dr_1 dr_2 \quad (2.4)$$

Из этого уравнения следует ряд важнейших свойств малоуглового рассеяния:

- $qr_{12} \ll 1$ – интенсивность рассеяния не зависит от формы исследуемых частиц так как $I(q) \sim \rho^2 V^2$;
- $qr_{12} \approx 1$ – интенсивность определяется формой и структурой частиц;
- $qr_{12} \gg 1$ – возникает чувствительность к деталям внутренней структуры частицы, осциллирующий характер $(\sin x)/x$ приводит к быстрому затуханию интенсивности с ростом q , в общем случае $I \sim 1/(qr)^4$.

Наиболее высокая интенсивность рассеяния наблюдается в области МУРН ($qr \leq 1$).

Одним из важных понятий в малоугловом рассеянии нейтронов является контраст $\Delta\rho$, определяемый как разность между плотностями длин рассеяния изучаемого объекта ($\bar{\rho}$) и средой (ρ_s) – «матрицей», в качестве которой служит вода или органический растворитель при изучении коллоидных систем:

$$\Delta\rho = \langle \rho(\vec{r}) - \rho_s \rangle = \frac{1}{V} \int_V (\rho(\vec{r}) - \rho_s) d\vec{r} = \bar{\rho} - \rho_s \quad (2.5)$$

Важно отметить, что только при «правильном» подборе контраста можно получить качественную информацию об исследуемых объектах.

Приближение однородной частицы

Для получения приближения однородной частицы, средняя плотность рассеяния принимается в упрощенном виде: $\rho(r) = \text{const} = \bar{\rho}$. Тогда формула рассеяния преобразуется следующим образом:

$$\left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle = (\bar{\rho} - \rho_s) \langle |\int_V e^{i\vec{q}\vec{r}}|^2 \rangle = (\bar{\rho} - \rho_s) V^2 F^2(q), \quad (2.6)$$

где $F^2(q)$ – форм-фактор частиц, который определяет закон рассеяния. Для частиц, имеющих форму сферы с радиусом R , форм-фактор задается аналитическим выражением [147]:

$$F^2(q) = 3 \left(\frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right). \quad (2.7)$$

Приближение Гинье

В 1939 году А. Гинье рассмотрел приближение в уравнении Дебая (2.4) для диапазона $qr_{12} \ll 1$:

$$\frac{\sin x}{x} = 1 - \frac{x^2}{3!} + \frac{x^4}{5!} - \dots \quad (2.8)$$

$$\begin{aligned} I(q) \sim \left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle &= \left(\int_V \rho(\vec{r}) d\vec{r} \right)^2 \left(1 - \frac{1}{3} q^2 \frac{\int_V \rho(\vec{r}) r^2 d\vec{r}}{\int_V \rho(\vec{r}) d\vec{r}} + \dots \right) = \\ &= \left(\int_V \rho(\vec{r}) d\vec{r} \right)^2 \left(1 - q^2 \frac{R_g^2}{3} + \dots \right), \end{aligned} \quad (2.9)$$

где R_g – радиус инерции частиц. Если в этом выражении отбросить все члены старшего порядка, то получится закон рассеяния, известный как приближение Гинье, в области малых q ($qR_g < 1$), являющимся определяющим методом для вычисления размеров рассеивающих объектов любой формы:

$$I(q) \sim \left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle = I_0 \exp \left(-\frac{R_g^2 q^2}{3} \right). \quad (2.10)$$

Инвариант Порода

Важнейшей интегральной характеристикой интенсивности рассеяния в области $q \rightarrow \infty$ является инвариант Порода:

$$A = \int_0^\infty q^2 I(q) dq = 2 \pi^2 \int_V (\rho(\vec{r}) - \rho_s)^2 d\vec{r} \quad (2.11)$$

Инвариант Порода является характеристикой полной рассеивающей способности исследуемого объекта и пропорционален квадрату контраста частицы относительно растворителя, а в более общем случае характеризует среднеквадратичную флуктуацию плотности по всей исследуемой системе. Инвариант Порода широко используется при расчете целого ряда структурных параметров: объем (V) и площадь поверхности (S) рассеивающих частиц. Так для однородной по плотности частицы значение A связано с объемом и частицы площадью поверхности соотношениями:

$$A = 2 \pi^2 (\bar{\rho} - \rho_s)^2 V \quad (2.12)$$

$$I(q) = \frac{2\pi}{q^4} (\bar{\rho} - \rho_s)^2 V \quad (2.13)$$

Таким образом, для однородной частицы возможно определить площадь ее поверхности по асимптотическому поведению интенсивности малоуглового рассеяния. График зависимости $I(q^2)$ в области больших значений q принято называть кривой Порода.

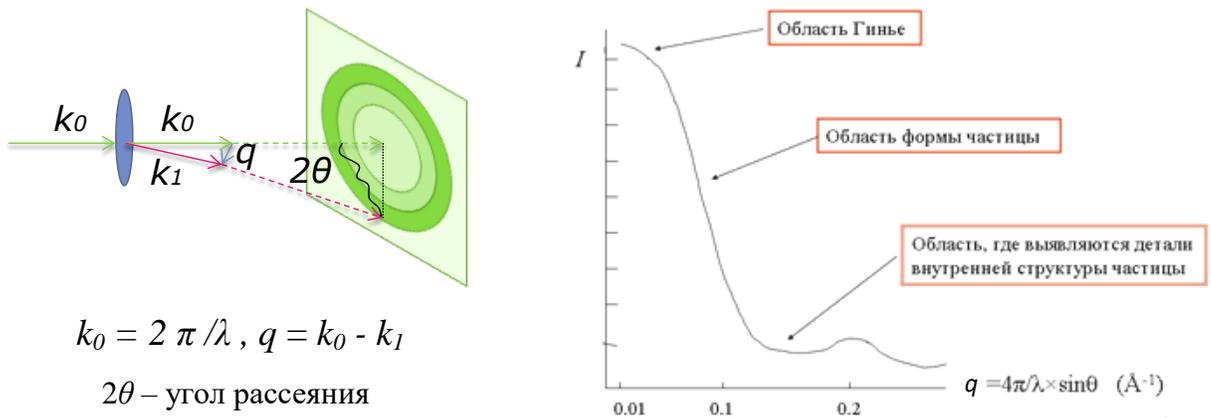
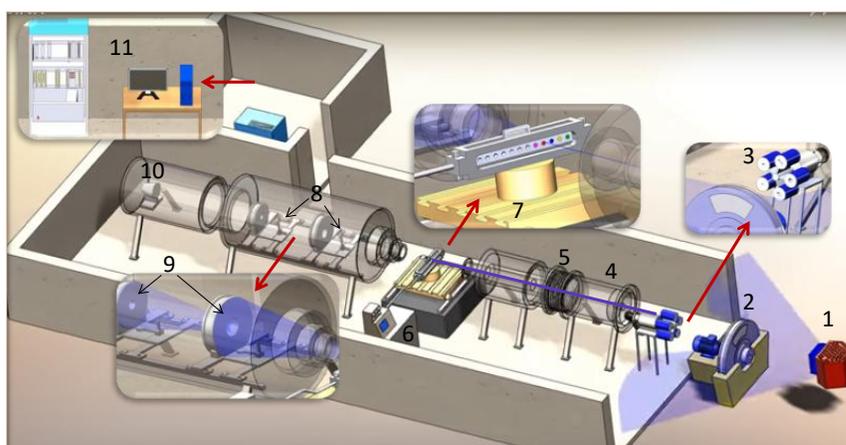


Рис.2.2. Принципиальная схема метода малоуглового рассеяния (слева) и общий вид кривой МУРН (справа)

2.2.2. Малоугловой нейтронный спектрометр ЮМО

Эксперименты проводились на спектрометре ЮМО на импульсном реакторе ИБР-2 (Дубна). Установка малоуглового рассеяния ЮМО схематически представлена на Рис.2.2. За защитой, находящейся после зоны реактора с водяным замедлителем (1), термализующим

поток нейтронов, расположен прерыватель (2), подавляющий фон и импульсы, сформированные дополнительным отражателем.



- 1 – зона реактора с водяным замедлителем;
- 2 – прерыватель;
- 3 – первый коллиматор;
- 4 – вакуумная труба;
- 5 – второй коллиматор;
- 6 – термостат;
- 7 – стол образцов;
- 8 – Vn-стандарт;
- 9 – кольцевой детектор;
- 10 – детектор прямого пучка;
- 11 – домик экспериментатора.

Параметры	Значения
Поток на образце	$10^7 - 4 \cdot 10^7$ n/(s cm ²)
Диапазон длин волн	от 0.5 Å до 8 Å
q-диапазон	$8 \cdot 10^{-3} - 0.5$ Å ⁻¹
Диапазон масштабов исследуемых объектов	10 – 500 Å
Измеряемое сечение рассеяния	0.01 cm ⁻¹
Система калибровки (нормировка)	Vn- стандарт во время эксперимента
Тип коллимации	Аксиальный
Детекторная система	2 детектора рассеянных нейтронов, детектор прямого пучка
Автоматический контроль за образцами	25 образцов в термостатируемом боксе
Температурный диапазон	от –20°C до +130°C
Разрешение по переданному импульсу	5 – 20%
Контролируемые параметры	Старты, температура, Vn-стандарт, позиция образца

Рис.2.2. Схема малоугловой установки ЮМО в двух детекторной конфигурации [148] по методу времени пролета, расположенной на 4-м канале импульсного реактора ИБР-2 ЛНФ ОИЯИ (адаптировано с <http://flnph.jinr.ru/ru/facilities/ibr-2/instruments/yumo>) с основными параметрами

Поток тепловых нейтронов формируется системой коллиматоров (3,5). На образце попадающие нейтроны образуют пучок до 22 мм с интенсивностью до 3×10^7 нейтронов. Образцы, как правило, помещаются в специальный бокс, температура которого задается

термостатом Lauda (6) с рабочим диапазоном температур от $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+130\text{ }^{\circ}\text{C}$, что позволяет исследовать образцы при температуре от $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+130\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Одновременно в бокс может помещаться до 25 кювет (Hellma, Germany) толщиной 1-5 мм. Характерное время измерения для коллоидных систем составляет, как правило, не более одного часа. Узел смены образцов находится в воздушном промежутке. Существуют широкие возможности по управлению сменным коллиматором, перемещением детектора для разного размера образцов.

Поток нейтронов, рассеянный на образце (7) попадает в ступенчатый нейтронотвод, где расположены кольцевые детекторы нейтронов (9), а также детектор прямого пучка (10). Расположенный непосредственно перед детектором ванадиевый стандарт (8) периодически вводится и выводится из пучка нейтронов, что позволяет избежать нежелательных эффектов длиннопериодических колебаний мощности и получать результат в абсолютных единицах. Управление и слежение за экспериментом может производиться с удаленного терминала.

Детектор прямого пучка, расположенный за детектором рассеяния, может измерять трансмиссию, и используется в случае сильно рассеивающих и сильно поглощающих образцов, когда стандартная процедура работает с недостаточной точностью.

Регистрируемая зависимость $I(\lambda, \theta)$ связана с сечением малоуглового рассеяния [149]:

$$I(\lambda, \theta) = I_0(\lambda) \cdot \frac{d\Sigma_s(q)}{d\Omega} \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot T(\lambda) \cdot d_s \cdot \Omega_s + B_s(\lambda, \theta) \quad (2.14)$$

где $I_0(\lambda)$ – интенсивность прямого пучка; $d\Sigma_s(q)/d\Omega$ – искомое сечение малоуглового рассеяния, отнесенное к единичному объему образца; $\varepsilon(\lambda)$ – эффективность детектора; $T(\lambda) = \exp(-\Sigma_t(\lambda)d_s)$ – пропускание образца; $\Sigma_t(\lambda)$ – полное сечение ослабления пучка единицей толщины образца; d_s – толщина образца; Ω_s – телесный угол, под которым виден угол детектора с образца; $B_s(\lambda, \theta)$ – интенсивность фона, включающая некогерентный фон образца; $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ – длина вектора рассеяния; θ – половина угла рассеяния и λ – длина волны нейтрона.

Из уравнения (2.13) следует, что для нахождения $d\Sigma_s(q)/d\Omega$ необходимы две операции: вычитание фона $B_s(\lambda, \theta)$ и нормировка, исключаяющая функции $I_0(\lambda)$, $\varepsilon(\lambda)$ и $T(\lambda)$. Измерения фона производятся с помощью подходящего фонового образца, свободного от исследуемых структурных неоднородностей, но обладающего таким же фоновым сечением рассеяния, как и исследуемый объект. Как правило, при исследовании растворов макромолекул в качестве

фонового образца используют чистый растворитель с скорректированным изотопным составом.

Для абсолютной калибровки сечения рассеяния используется рассеяние на чистом ванадии, помещенном на расстоянии 1.5 м от детектора. В калибровочном измерении, таким образом, в пучке находятся одновременно и исследуемый образец, и ванадиевый рассеиватель. Если I_S – регистрируемая интенсивность пучка от исследуемого образца и I_{SV} – рассеиватель с ванадием в пучке, то сечение малоуглового рассеяния будет определяться соотношения:

$$\frac{t_{SV}}{t_S} = \left[\frac{I_S}{I_{SV}} \right]^{1/2} \leq 1 \quad (2.15)$$

где индексы «v» относятся к соответствующим характеристикам ванадиевого рассеивателя. Длительность цикла в серии экспозиций (I_S , I_{SV}) может быть достаточно малой, несколько минут, что обеспечивает нечувствительность результата к медленному дрейфу условий измерения, долговременную стабильность и повторяемость результатов. Этот метод оказывается весьма эффективным при исследовании не слишком больших сечений рассеяния, $\leq 10 \text{ см}^{-1} \text{ ср}^{-1}$. В этом случае выполняется неравенство $I_S \leq I_{SV}$ и элементарные выкладки показывают, что оптимальной стратегии соответствует соотношение продолжительностей экспозиции:

$$\frac{d\Sigma_S(\lambda, \theta)}{d\Omega} = \frac{I_S}{I_{SV} - I_S} \cdot \frac{d\Sigma_V(\lambda, \theta)}{d\Omega} \cdot \frac{d_V \cdot \Omega_V \cdot T_V}{d_S \cdot \Omega_S} \quad (2.16)$$

Если сечение рассеяния много больше указанного предела, то рассеяние от образца становится преобладающим, и погрешность нормировочной разности ($I_{SV} - I_S$) является фактором, ограничивающим точность результата. В связи с этим для сильно рассеивающих объектов используют несколько модифицированную процедуру: I_S и T_S измеряются без ванадия, а I_V во время измерения фона. Пропускание образца при этом находится независимо с помощью детектора прямого пучка.

Экспериментальные данные, представленные в диссертационной работе, были получены в период 1999-2000 гг. с использованием криогенного замедлителя и с 2012 г. по настоящее время с тепловым замедлителем. В работе [150] сравниваются спектры при различных условиях работы замедлителей, проведен расчет отношений потоков для метанового и гребенчатого замедлителей, рассчитаны потери нейтронов на воздушных зазорах в процессе движения нейтронного пучка к образцу. Сравнительный анализ кривых

МУРН от стандартного образца – белка апоферритина – при использовании метанового и гребенчатого замедлителей показал преимущество использования гребенчатого замедлителя нейтронов на спектрометре ЮМО. Проведенная важная методическая работа позволила, в частности, извлечь более качественную информацию из спектров МУРН, полученных для МСВ ДМФХ при использовании метода вариации контраста за счет расширения диапазона в область малых значений вектора рассеяния q до 0.004 \AA^{-1} .

Первичная обработка экспериментальных данных проводится программой SAS [151], позволяющей проводить нормировку полученного спектра на независимый ванадиевый рассеиватель, вычитать данные фонового образца [152].

2.2.3. Рассеяние нейтронов на липидных мембранах. Анализ данных МУРН

В общем случае рассеяние от монодисперсных центросимметричных частиц имеет вид:

$$I(q) = I_0 P(q) S(q) + bkg \quad (2.17)$$

где $I_0 = n V^2 (\Delta\rho)^2$ – интенсивность рассеяния в нулевой угол, n – объемная концентрация частиц с объемом V , $\Delta\rho$ – контраст (2.5), $P(q) \equiv F^2(q)$ – квадрат форм-фактора, $S(q)$ – структурный фактор, описывающий взаимодействие между частицами, и bkg – остаточный некогерентный фон, имеющий место в эксперименте по рассеянию нейтронов. Здесь необходимо сделать два важных замечания: (1) для сильно разбавленных и слабо взаимодействующих между собой частиц, какими являются фосфолипидные ОСВ с массовой долей ≤ 2 мас.%, $S(q) = 1$ [153,154]; (2) в первом приближении однослойные везикулы представляют собой полые сферы с оболочкой (липидный бислои), разделяющей внутреннюю и внешнюю среду. Учитывая оба факта, рассеяние на ОСВ будет описываться форм-фактором, нормированным на объем оболочки, сформированной липидным бислоем, (V_b) [155]:

$$P(q) = \frac{\phi}{V_b} \left[\frac{3V_{in}(\rho_s - \bar{\rho}_m)J_1(qR_{in})}{qR_{in}} + \frac{3V_v(\bar{\rho}_m - \rho_s)J_1(qR_v)}{qR_v} \right]^2 + bkg, \quad (2.18)$$

где ϕ – объемная доля липидного бислоя, V_{in} и R_{in} – объем и радиус сферы, образованной растворителем внутри мембраны, соответственно, V_v и R_v – объем и радиус ОСВ, соответственно, J_1 – сферическая функция Бесселя первого порядка ($J_1 = (\sin(x) - x\cos(x))/x^2$).

Закон рассеяния для 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:

$$I(q) = I_0 q^{-2} \exp [-R_t^2 q^2]. \quad (2.19)$$

Для n_i мембран с объемом V_i значения I_0 и R_t^2 связаны с плотностями длин рассеяния нейтронов $\rho_m(x)$ – для мембран вдоль направления x (нормаль к поверхности мембраны) и ρ_s – для растворителя соотношениями:

$$R_t^2 = \int (\rho_m(x) - \rho_s) x^2 dx / \int (\rho_m(x) - \rho_s) dx, \quad (2.20)$$

$$I_0 = \sum n_i (\bar{\rho}_m - \rho_s)^2 V_i^2, \quad (2.21)$$

Используя зависимость $\ln(Iq^2)$ от q^2 из радиуса гирации R_t можно определить толщину мембран d_b с точностью 1 Å [147]:

$$d_b = \sqrt{12} R_t. \quad (2.22)$$

Точное значение d_b может быть определено в соответствии с работой [40].

В настоящее время методика приготовления ОСВ развита на достаточно высоком уровне, что позволяет сохранять однослойную структуру мембран достаточно длительное время. Однако, добавление различных органических растворителей, способствует частичному слиянию ОСВ, в результате чего могут образовываться МСВ. В этом случае структурный фактор в уравнение (2.17) не равен единице и интенсивность рассеяния принимает вид:

$$I(q) = I_0 q^{-2} \exp [-R_t^2 q^2] \cdot \left(1 + A \exp \left[-\frac{(q-q_0)^2}{2w^2} \right] \right) + bkg. \quad (2.23)$$

Рассеяние от 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:

$$d = 2\pi/q_0. \quad (2.24)$$

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

$$I(q) = Bq^{-\alpha} + A \cdot \exp[-(q - q_0)^2/2w^2] + bkg, \quad (2.25)$$

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

Температура основного фазового перехода (T_m) для ФХ мембран может быть определена из аппроксимации зависимости периода повторяемости МСВ от температуры функцией Больцмана в виде:

$$d = d_{min} + (d_{max} - d_{min}) / (1 + e^{(T-T_m)/dT}), \quad (2.26)$$

где d_{max} и d_{min} - максимальное и минимальное значения периода повторяемости в заданном диапазоне температур (T), T_m - координата абсциссы, которой соответствует значение ординаты $(d_{max} + d_{min})/2$.

2.3. Заключение к главе 2

В данной главе описаны вещества и методы приготовления мультислойных и однослойных везикул; представлены основные принципы малоуглового рассеяния нейтронов; описана установка ЮМО (Дубна, Россия) и сделан акцент на специфику первичной обработки экспериментальных данных.

Описаны модели для аппроксимации кривых МУРН при рассеянии на однослойных или многослойных везикулах. Для дальнейшей интерпретации экспериментальных данных обсуждается подход, который будет применен к данным, представленным в главах 3 и 4, как для описания процесса слияния ОСВ, индуцируемого действием фьюжн агентов: ионов Ca^{2+} , сульфоксидов, так и для описания формирования ОСВ из МСВ, вызванного присутствием ионов Ca^{2+} в растворителе, то есть во всех случаях, где нельзя исключить сосуществование однослойных и многослойных везикул.

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА СТРУКТУРУ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ

Мембранный бислоем, отделяющий внутреннюю среду клетки от внешнего окружения, как известно, обладает избирательной способностью пропускать через себя одни вещества, и задерживать другие. Так, молекулы воды способны легко перемещаться внутрь клетки путем простой диффузии в отличие от ионов кальция. При взаимодействии с липидным бислоем, состоящим из электрически нейтральных фосфодитилхолиновых молекул, ионы Ca^{2+} связываются с отрицательно заряженной группой PO_4^- гидрофильной головы ФХ молекул, проникая в полярную область бислоя. Этот процесс сопровождается частичной дегидратацией головных групп ФХ молекул, как было показано методом ИК-спектроскопии [91].

Используя свойство полупроницаемости мембран, смоделировано два типа мультислойных везикул (МСВ): А – ионы кальция находятся в растворителе, окружающем мембраны и в межмембранном пространстве ($C_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in}} = C_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{out}}$); Б - ионы кальция находятся только в растворителе ($C_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in}} = 0$). Для этих целей использованы различные протоколы приготовления МСВ (Таблица 3.1.). Приготовление образцов серии А является наиболее распространенным и применяется для равномерного распределения ионов кальция по поверхности липидного бислоя. Для этих образцов детально исследован процесс перехода МСВ из «связанного» состояния в «несвязанное», изучен структурный переход МСВ → ОСВ, проведен анализ влияния условий приготовления образцов (температура стабилизации, концентрация липида) и различных температурных режимов измерения на структуру МСВ. Кроме того, проведен сравнительный анализ влияния ионов Ca^{2+} на структуру и взаимодействие липидных слоев для двух серий образцов. Следует отметить, что для образцов серии Б в отличие от образцов серии А существует градиент по концентрации растворителя, в результате чего наблюдаются различия в структуре мультислойных мембран при одинаковых концентрациях ионов кальция.

Важно отметить, что в данной работе не использован хлорид натрия NaCl , который часто добавляют к воде для воссоздания среды нативных мембран (NaCl содержится в плазме крови и тканевых жидкостях организма с концентрацией около 0.9 %, водный раствор NaCl с $\text{pH} \sim 7$ является изотоническим, поддерживает соответствующее осмотическое давление плазмы крови и внеклеточной жидкости). Однако ионы Na^+ так же как и ионы Ca^{2+} , но в меньшей степени [91], способны тесно связываться с поверхностью бислоя, что приводит к

незначительному увеличению хвостового упорядочения и к небольшому уменьшению площади головной группы по сравнению с ФХ мембранами без добавления соли, как было показано, например, в работе [60] методом молекулярной динамики. Чтобы исключить конкуренцию между связыванием ионов Na^+ и Ca^{2+} с мембранной поверхностью в качестве растворителя были использованы вода или водный раствор дигидрата хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) с заданной концентрацией [156].

Таблица 3.1. Условия приготовления МСВ и проведения эксперимента.

приготовление МСВ		проведение эксперимента
Серия А	А-I	15 °C → 55 °C
	А-II	55 °C → 15 °C → 10 °C
Серия Б	МСВ (ДМФХ + D_2O) + $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	55 °C → 15 °C → 10 °C

3.1. Фазовые переходы

Как было упомянуто в литературном обзоре, ионы кальция увеличивают температуру основного фазового перехода липидных мембран. Следует отметить, что присутствие в системе незначительного количества ионов кальция (порядка нескольких мМ) уже приводит к росту T_m на несколько градусов. Для определения этого значения были проведены температурные измерения для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ при концентрации ионов кальция $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.1$ мМ в диапазоне температур от 10 до 55 °C. Кривые малоуглового рассеяния представлены на Рис. 3.1.(а). Для аппроксимации экспериментальных данных использовалась функция (2.23), как представлено на Рис. 3.1.(б) для гелевой фазы при $T = 10$ °C и на Рис. 3.1.(в) для ЖК фазы при $T = 55$ °C.

Зависимость периода повторяемости от температуры (Рис. 3.2.) для процесса нагревания в исследуемом диапазоне температур можно условно разделить на четыре участка. Резкое увеличение d от 61.7(1) до 68.8(1) Å имеет место в диапазоне температур 10–17 °C, что соответствует переходу системы из гелевой в риппл-фазу ($L_{\beta} \rightarrow P_{\beta}$), где углеводородные хвосты ансамбля липидных молекул ориентированы под углом к плоскости мембраны, и знак этого угла периодически изменяется на противоположный. В результате образуется волнистая форма мембранного слоя, как схематически представлено на Рис. 3.2. Небольшой температурный интервал 17–22 °C характеризуется постоянной величиной d ,

среднее значение которой равно $68.8(1) \text{ \AA}$. На указанном участке мультислойные везикулы находятся в риппл-фазе. На третьем участке ($22\text{--}33 \text{ }^\circ\text{C}$) период повторяемости монотонно уменьшается от $68.6(1)$ до $62.2(1) \text{ \AA}$. В указанном интервале реализуется основной фазовый переход из гелевой в жидкокристаллическую фазу ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$), который вызывает структурные изменения молекул ДМФХ, связанные, в первую очередь, с постепенным плавлением углеводородных хвостов при повышении температуры и с формированием доменов «твердое–жидкое». Величина d не изменяется в области температур $33\text{--}55 \text{ }^\circ\text{C}$, и ее значение равно $62.2(1) \text{ \AA}$. Этот интервал соответствует жидкокристаллической фазе МСВ ДМФХ.

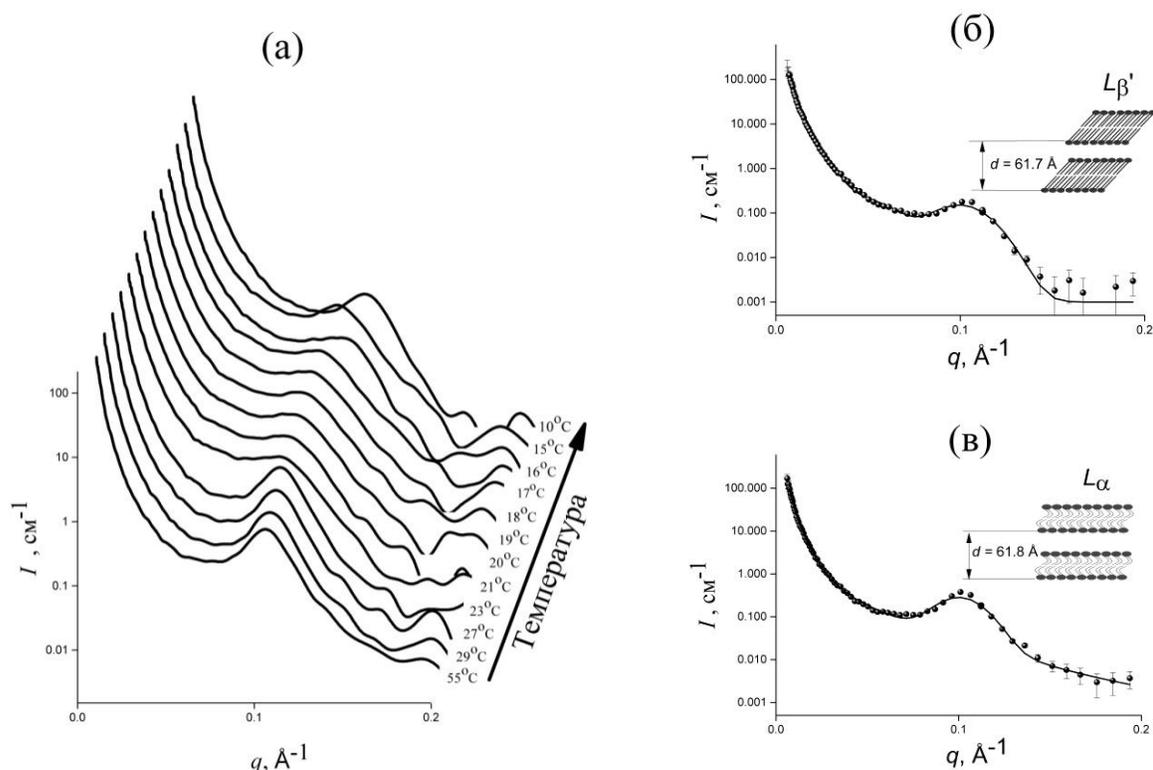


Рис. 3.1. (а) Зависимость интенсивности малоуглового рассеяния от вектора рассеяния для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ при концентрации ионов кальция $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.1 \text{ мМ}$ в диапазоне температур от $10 \text{ }^\circ\text{C}$ до $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Кривые МУРН (круги) с модельными фитами (линии) для (б) гель фазы при $T = 10 \text{ }^\circ\text{C}$ и (в) жидкокристаллической фазы при $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$.

Более детальный анализ проведен для третьего участка – области основного фазового перехода $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ – для мультислойных везикул ДМФХ (1 мас.%) в присутствии 0.1 мМ ионов Ca^{2+} в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. Для определения значения T_m были использованы два метода: аппроксимация экспериментальных данных функцией Больцмана (уравнение

(2.26), сплошная линия на Рис. 3.2) и анализ зависимости первой производной периода повторяемости d по температуре (dd/dT) от T . Показано, что dd/dT имеет минимум при $T = 24.8(4)^\circ\text{C}$ (вставка на Рис. 3.2). Аппроксимация зависимости периода повторяемости от температуры функцией Больцмана позволяет определить как температуру фазового перехода $T_m = 24.9(3)^\circ\text{C}$, так и его границы по пересечению пунктирных линий, как показано на Рис. 3.2. Было установлено, что переход $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в присутствии 0.1 мМ ионов Ca^{2+} в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ при нагревании начинается при 22.1°C и заканчивается при 27.7°C [156].

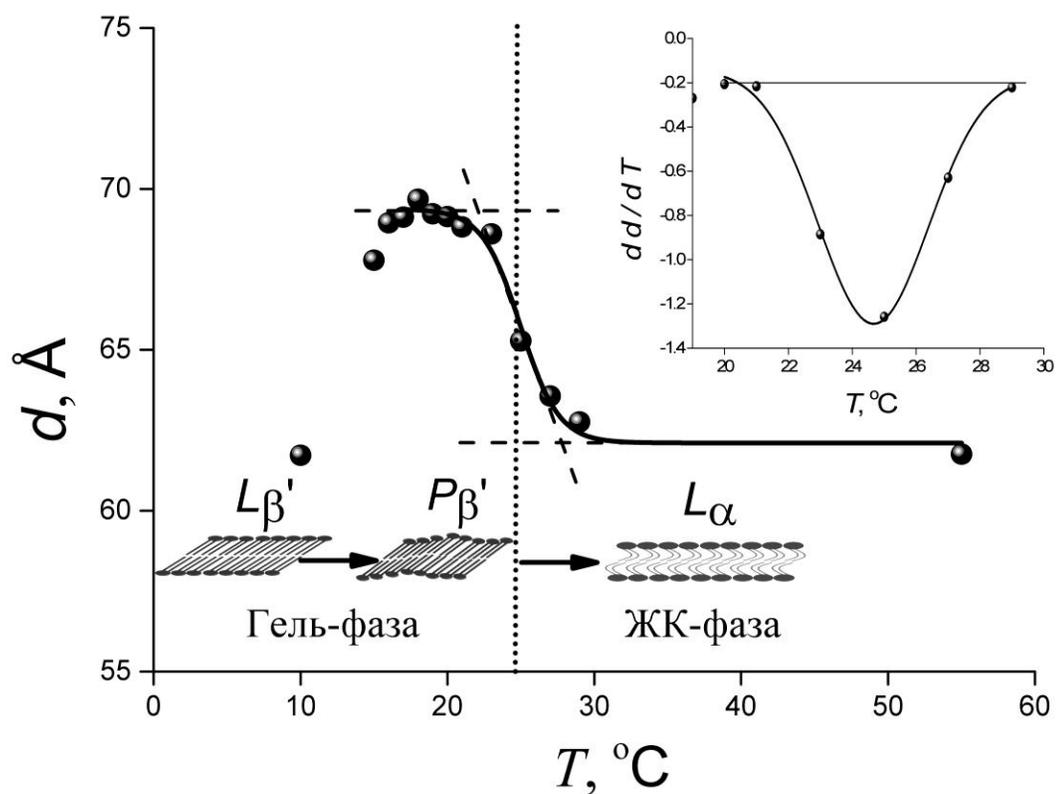


Рис. 3.2. Зависимость периода повторяемости (d) от температуры (T) для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ при концентрации ионов кальция $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.1$ мМ в диапазоне температур от 10°C до 55°C со схематическим представлением фазовых переходов $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$.

Вертикальная линия – область перехода $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$. Сплошная линия – аппроксимация экспериментальных данных (круги) функцией Больцмана (2.26), пересечения пунктирных линий соответствуют границам основного фазового перехода. На вставке представлена зависимость первой производной dd/dT от температуры (круги) с аппроксимацией функцией Гаусса (прямая линия).

3.2. Структура МСВ и ОСВ: $0 \text{ мМ} \leq C_{\text{Ca}^{2+}} \leq 10 \text{ мМ}$

Исследование влияния ионов кальция на структуру мультислойных везикул проводилось в гелевой и жидкокристаллической фазах. Зависимости периода повторяемости мультислойных везикул ДМФХ (1 мас.%) от концентрации ионов Ca^{2+} в диапазоне $C_{\text{Ca}^{2+}}$ 0–10 мМ представлены на Рис. 3.3.(а) при температурах 15 (квадраты) и 55°C (круги). Существенное увеличение периода повторяемости наблюдается при $C_{\text{Ca}^{2+}} = 1 \text{ мМ}$ в обеих фазах. Данные представлены в Таблице 3.1. При этой концентрации значительно изменяются кривые малоуглового нейтронного рассеяния. Дифракционный пик смещается в область меньших q , как показано, например, для МСВ ДМФХ в жидкокристаллической фазе при $C_{\text{Ca}^{2+}} = 2 \text{ мМ}$ (Рис. 3.3.(а), вставка). Кроме того, при концентраций ионов $\text{Ca}^{2+} \geq 1 \text{ мМ}$ характер зависимости интенсивности $I(q)$ от вектора рассеяния q в двойном логарифмическом масштабе имеет линейный вид, как представлено для $C_{\text{Ca}^{2+}} = 1 \text{ мМ}$ на Рис. 3.3.(б,в) для фаз P_{β} и L_{α} соответственно, что свидетельствует о переходе мультислойных везикул в однослойные (схематически представлено на Рис. 3.3.). Подобное поведение мультислойных везикул с увеличением концентрации ионов Ca^{2+} ранее наблюдалось и для системы ДПФХ/ $\text{CaCl}_2/\text{D}_2\text{O}$ [50,118], но не было охарактеризовано в деталях. Одной из главных причин разрушения ламеллярной структуры МСВ ДПФХ и формирования ОСВ является возрастание роли электростатического отталкивания в балансе сил межмембранного взаимодействия, как предполагалось в [77]. Теоретический анализ электростатического катион-дипольного взаимодействия в системе ДПФХ/ Ca^{2+} был дан в [109,112].

Исследование зависимости толщины сформированных однослойных везикул (d_{bm}) от концентрации ионов Ca^{2+} в диапазоне $C_{\text{Ca}^{2+}}$ 1–10 мМ показало, что увеличение толщины липидного бислоя имеет место только до $C_{\text{Ca}^{2+}} \leq 2 \text{ мМ}$ как в гелевой, так и в жидкокристаллической фазе. В Таблице 3.2 приведены данные, полученные согласно соотношению (2.19), где R_t определялся из построения Кратки–Порода (Рис. 3.4.). Так, величина d_{bm} изменяется на 2.3(1) Å в гелевой и на 1.4(2) Å в ЖК фазе при увеличении $C_{\text{Ca}^{2+}}$ от 1 до 2 мМ. Дальнейшее добавление ионов Ca^{2+} не приводит к существенному изменению d_{bm} в исследуемом диапазоне концентраций. С учетом экспериментальных ошибок средние значения толщин можно считать равными 46 Å в фазе P_{β} и 40 Å в фазе L_{α} .

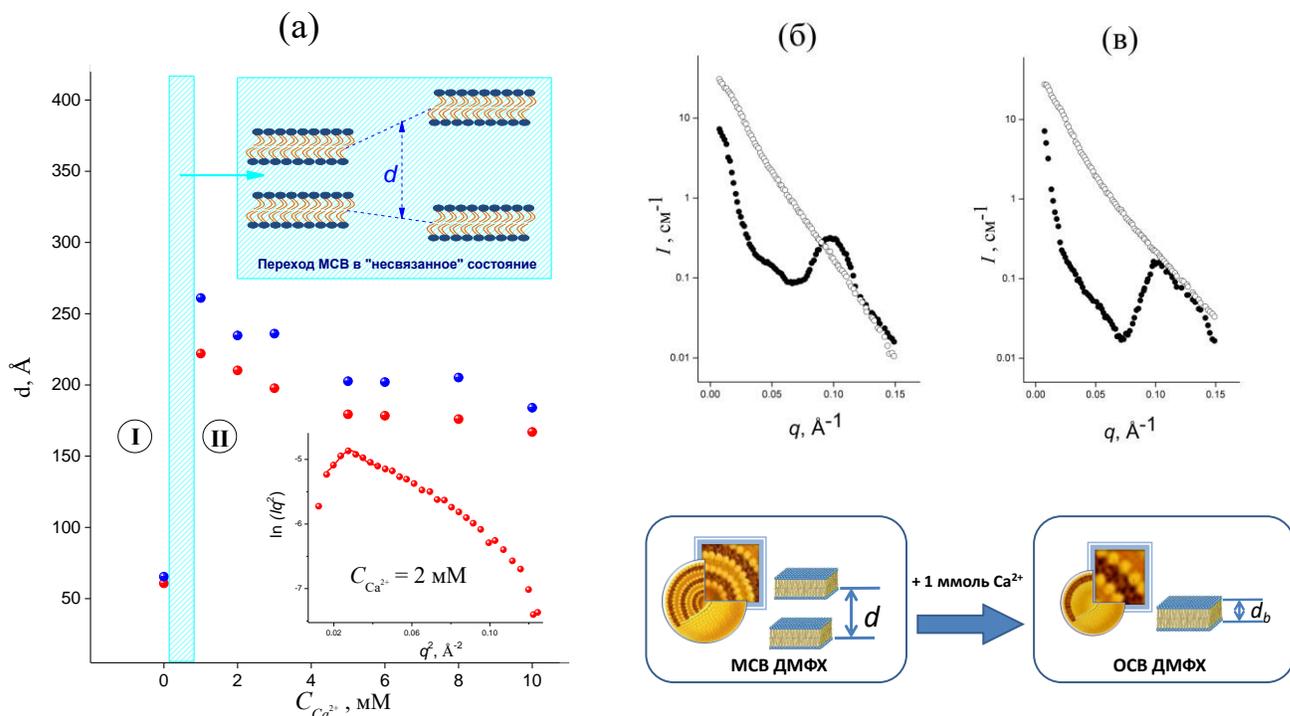


Рис. 3.3. (а) Зависимость периода повторяемости d от концентрации ионов кальция для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в смеси $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ в ● гель ($T = 15^\circ\text{C}$) и ● ЖК ($T = 55^\circ\text{C}$) фазах для $0\text{ mM} \leq C_{Ca^{2+}} \leq 10\text{ mM}$, схематически представлен переход МСВ в «несвязанное» состояние $I \rightarrow II$. Экспериментальные ошибки меньше чем размер символов. На вставке представлена кривая малоуглового рассеяния для $C_{Ca^{2+}} = 2\text{ mM}$ в ЖК фазе. Экспериментальные кривые МУРН для МСВ ДМФХ 1 мас.% в смеси $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ при $C_{Ca^{2+}}$ ● - 0 mM и ○ - 1 mM в (б) гель и (в) ЖК фазах.

Аналогичный эффект влияния ионов кальция на толщину однослойных везикул (d_{bu}), приготовленных методом экструдирования, обнаружен не был. Анализ значений d_{bu} , приведенных в Табл. 3.2, позволил сделать вывод о независимости толщин ОСВ ДМФХ (1 мас.%) от $C_{Ca^{2+}}$ в исследуемом диапазоне концентраций в гелевой и жидкокристаллических фазах.

Кроме того, сравнение величин d_{bm} и d_{bu} указывает на тот факт, что однослойные везикулы, сформированные из МСВ, имеют толщины больше, чем ОСВ, приготовленные методом экструдирования (Табл. 3.2).

Следует также отметить, что процесс перехода в «несвязанное» состояние мультислойных везикул ДМФХ в избытке растворителя в районе перехода $C_{Ca^{2+}} 0 - 1\text{ mM}$ детально не был ранее изучен. В упомянутых выше работах шаг изменения концентрации ионов кальция составлял 1 mM, что не позволило определить ни характер перехода (резкий или непрерывный), ни критическую концентрацию перехода МСВ из «связанного» состояния в «несвязанное». С этой целью был исследован указанный интервал концентраций с шагом 0.1 mM в гелевой и жидкокристаллической фазах.

Таблица 3.2. Структурные параметры для мультислойных везикул (МСВ) и однослойных везикул (ОСВ) ДМФХ (1 мас.%). $C_{Ca^{2+}}$ – концентрация ионов кальция, d – период повторяемости МСВ, d_{bm} – толщина ОСВ, образованных из МСВ, d_{bu} – толщина ОСВ, приготовленные методом экструдирования.

$C_{Ca^{2+}}$, мМ	Гель фаза			Жидкокристаллическая фаза		
	МСВ		ОСВ	МСВ		ОСВ
	d , Å	d_{bm} , Å	d_{bu} , Å	d , Å	d_{bm} , Å	d_{bu} , Å
0	64.4(2)		41.2(1)	60.6(1)		36.8(1)
1	261.2(1)	43.2(1)	41.2(1)	60.7(1)	38.8(1)	36.3(1)
2	234.7(1)	45.5(2)		222.0(2)	40.2(1)	
3	236.0(3)	45.7(1)		210.2(1)	40.6(3)	
5	202.6(1)	45.9(1)	41.8(2)	197.7(1)	39.4(2)	37.3(1)
6	202.0(2)	46.34(1)		179.4(1)	40.1(1)	
8	205.2(1)	46.57(2)		178.4(2)	40.05(2)	
10	184.0(1)	45.7(1)	42.2(1)	176.0(1)	39.6(1)	37.1(1)

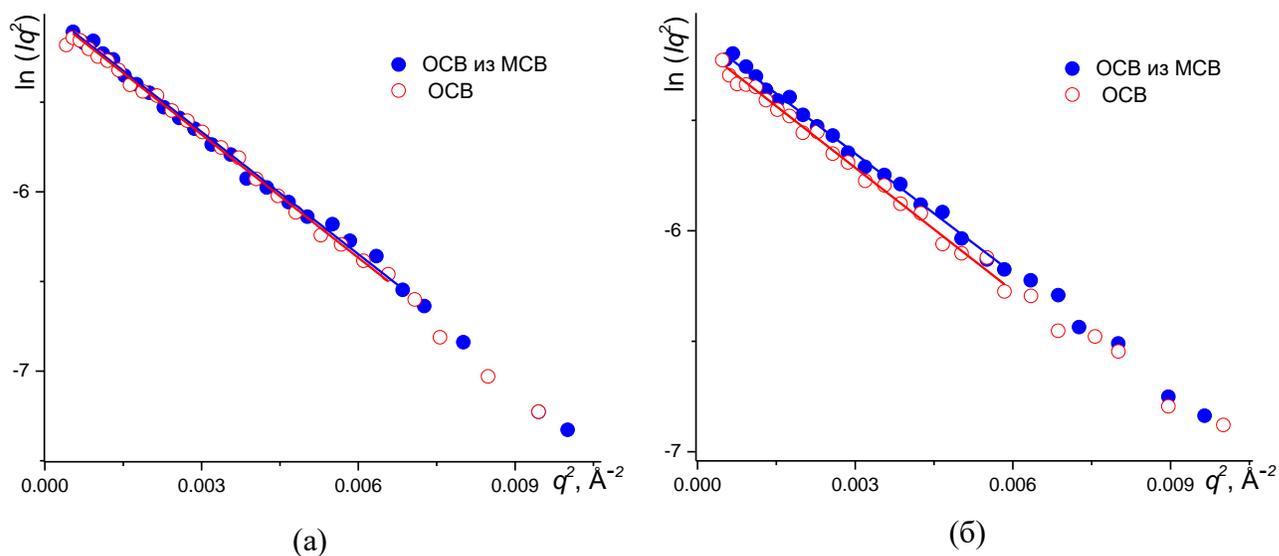


Рис. 3.4. Представление Кратки-Порода для ОСВ ДМФХ 1 мас.% (● - образованные из МСВ и ○ - приготовленные методом экструдирования) в смеси $CaCl_2 \cdot 2H_2O/D_2O$ при $C_{Ca^{2+}} = 1$ мМ в (а) гель и (б) ЖК фазах.

3.3. Переход в «несвязанное» состояние

ЖК фаза. Влияние ионов Ca^{2+} в жидкокристаллической фазе изучалось для двух серий образцов: после охлаждения до $T = 15$ °С и медленного нагревания (~2 град/мин) до 55 °С (Рис. 3.5.(а)); после нагрева от комнатной температуры до 55°С (Рис. 3.5.(б)) в течение

30 мин. В первом случае разрушение ламеллярной структуры везикул и спонтанное формирование однослойных везикул с толщиной бислоя $d_{bm} = 38.3(1) \text{ \AA}$ (Рис. 3.5.(а), вставка) происходит при $C_{Ca^{2+}} = 0.4 \text{ мМ}$. Анализ малоугловых данных для второй серии образцов показал, что вплоть до концентраций ионов кальция 0.4 мМ на кривых рассеяния наблюдается дифракционный пик (Рис. 3.5.(б)), что свидетельствует о сохранении ламеллярной структуры мембран ДМФХ до указанной концентрации. Исчезновение дифракционного пика при $C_{Ca^{2+}} = 0.5 \text{ мМ}$ в области $q \approx 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ говорит об отсутствии ближнего порядка в системе. Это означает, что при этой концентрации ионов Ca^{2+} реализуется переход МСВ в ОСВ с толщиной бислоя $d_{bm} = 38.6(2) \text{ \AA}$. Аппроксимация экспериментальных данных (линии на Рис. 3.5.) для МСВ ДМФХ $1 \text{ мас.}\%$ в смеси $CaCl_2 \bullet 2H_2O/D_2O$ выполнена с помощью уравнений (2.23) для двух серий образцов с концентрациями ионов Ca^{2+} $0.1\text{-}0.3 \text{ мМ}$ и для серии образцов А-П с $C_{Ca^{2+}} = 0.4 \text{ мМ}$ и (2.18) для систем, состоящих из однослойных везикул (А-I: $C_{Ca^{2+}} = 0.4 \text{ мМ}$, А-II: $C_{Ca^{2+}} = 0.5 \text{ мМ}$)

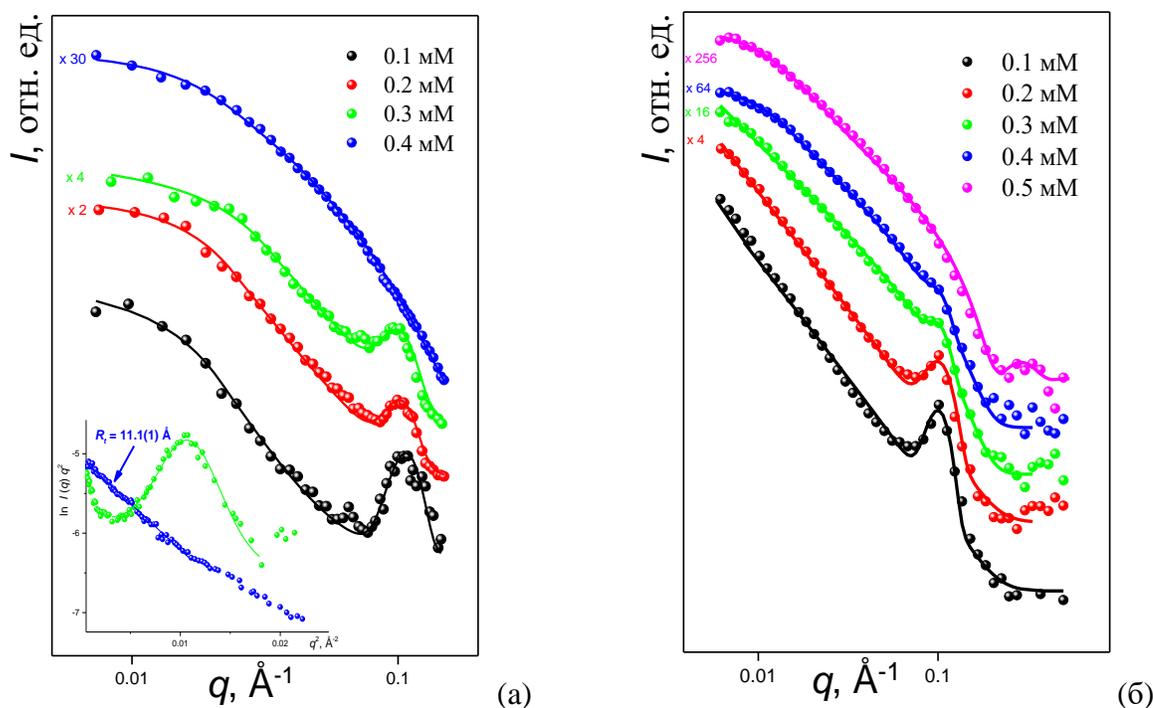


Рис. 3.5. Кривые МУРН для МСВ ДМФХ $1 \text{ мас.}\%$ в смеси $CaCl_2 \bullet 2H_2O/D_2O$ в ЖК ($T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$) фазе для серий образцов (а) А-I и (б) А-II.

Таким образом, анализ малоугловых данных показывает, что переход МСВ ДМФХ из «связанного» состояния в «несвязанное» в ЖК фазе носит непрерывный характер, как и было предсказано в теоретических работах [51,119,120], а критическая концентрация ионов кальция, при которой наблюдается этот переход, зависит от скорости нагревания системы.

Гелевая фаза. Критическая концентрация $C_{Ca^{2+}}$ и характер перехода МСВ ДМФХ в «несвязанное» состояние в гелевой фазе были определены для образцов (I), охлажденных до 15 °С после их стабилизации при комнатной температуре в течение суток (Рис. 3.6.(а)), и для образцов (II), измеренных при 15 (Рис. 3.6.(б)) и 10 °С (Рис. 3.6.(в)) после их охлаждения от температуры 55 °С. Показано, что для обеих серий образцов переход имеет непрерывный характер. Определено, что в случае МСВ, которые подверглись фазовому переходу $L_{\alpha} \rightarrow P_{\beta}$, разрушение ламеллярной структуры везикул и формирование однослойных везикул происходит при $C_{Ca^{2+}} = 0.5$ мМ, в то время как в образцах первой серии уже при $C_{Ca^{2+}} = 0.3$ мМ формируются ОСВ. На это указывает кривая рассеяния на Рис. 3.6.(а), изображенная линией. Полученное значение 0.5 мМ для второй серии образцов (Рис. 3.6.(б), (в), вставки) соответствует концентрации ионов кальция в фазе L_{α} , при которой наблюдался переход МСВ в «несвязанное» состояние. Это означает, что система, образованная в ЖК фазе, при данной концентрации сохраняет свою морфологию и в гелевой фазе.

Следует отметить, что общим для всех кривых малоуглового рассеяния для двух серий образцов, как в гелевой, так и в жидкокристаллической фазе, является постепенное уменьшение амплитуды дифракционного пика с одновременным ростом интенсивности рассеяния в области малых q ($q \leq 0.1 \text{ \AA}^{-1}$) при увеличении концентрации ионов кальция в исследуемых образцах. Согласно общей теории дифракции в упорядоченных системах, большая часть интенсивности рассеяния приходится на дифракционный пик, соответствующий рассеивающему углу, который определяется уравнением Брэгга $\sin\theta = \lambda/2d$, где d – период повторяемости в случае мультислоев. При исчезновении упорядоченности системы рассеяние происходит в углы, определяемые размером везикул (угол определяется тем же самым уравнением, но вместо d используется размер везикул). Размер везикул больше, чем период повторяемости, и, следовательно, соответствующие углы рассеяния меньше, пик смещается в область меньших q , как это было продемонстрировано на Рис. 3.3.(а), вставка.

Подобное изменение характера кривых рассеяния свидетельствует о перераспределении сил притяжения Ван-дер-Ваальса и электростатических сил отталкивания в балансе сил межмембранного взаимодействия. Очевидно, что разрушение мультислойной структуры и формирование однослойных везикул происходит за счет возрастающей роли электростатического отталкивания с увеличением концентрации ионов Ca^{2+} , как например, предполагалось в [77]. Подобный феномен наблюдался в инвертированном фазово-

контрастном микроскопе для ПОФХ мембран при 0.12 мг/мл в диапазоне $C_{Ca^{2+}}$ 1–100 мМ [113].

Таким образом, из экспериментальных данных следует, что переход из «связанного» состояния в «несвязанное» реализуется непрерывно в обеих фазах. Если подобный характер в жидкокристаллической фазе был предсказан теоретически, 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.

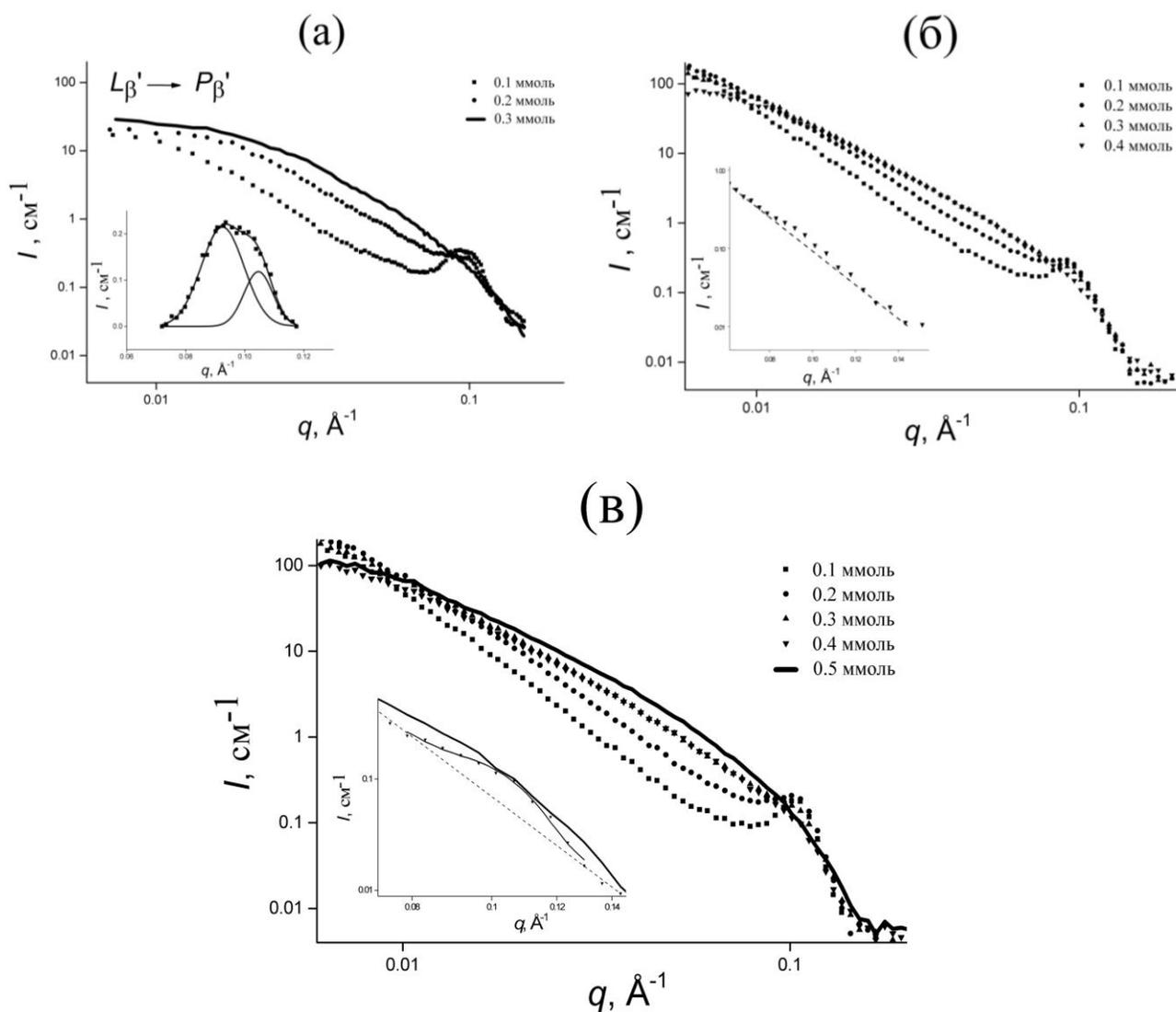


Рис. 3.6. Зависимости интенсивности малоуглового рассеяния от вектора рассеяния для МСВ ДМФХ 1 мас.% в смеси $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ в гель фазе при $T = 15^\circ\text{C}$ для серий образцов (а) А-I, (б) А-II и при $T = 10^\circ\text{C}$ для (в) серии образцов А-II. На вставках представлены области дифракционных пиков для соответствующих концентраций.

3.4. Критическая концентрация перехода

Как видно из экспериментальных данных, представленных в разделе 3.3., разрушение ламеллярной структуры МСВ и формирование ОСВ сопровождается исчезновением дифракционного пика. Для определения истинных значений концентраций ионов кальция ($C_{Ca^{2+}}^*$), при которых происходит исследуемый переход, проведен детальный анализ дифракционных пиков для систем ДМФХ/ $CaCl_2 \cdot 2H_2O/D_2O$ в области предперехода. Так, для серии А-II исследовались МСВ ДМФХ (1 мас.%) с содержанием ионов Ca^{2+} от 0.2 до 0.5 мМ с шагом по концентрации 0.05 мМ. Зависимости интегральной площади (S_{intg}) дифракционных пиков и их полной ширины на уровне половинной амплитуды (FWHM - w) от $C_{Ca^{2+}}$ представлены на Рис. 3.7. для серии образцов А-II при температурах 55 и 10 °С. В обоих случаях наблюдается линейное уменьшение величины S_{intg} и увеличение значения FWHM с ростом концентрации ионов кальция. Полученные зависимости $S_{intg}(C_{Ca^{2+}})$ и $w(C_{Ca^{2+}})$ профитированы прямыми (сплошные и пунктирные линии на Рис. 3.7.).

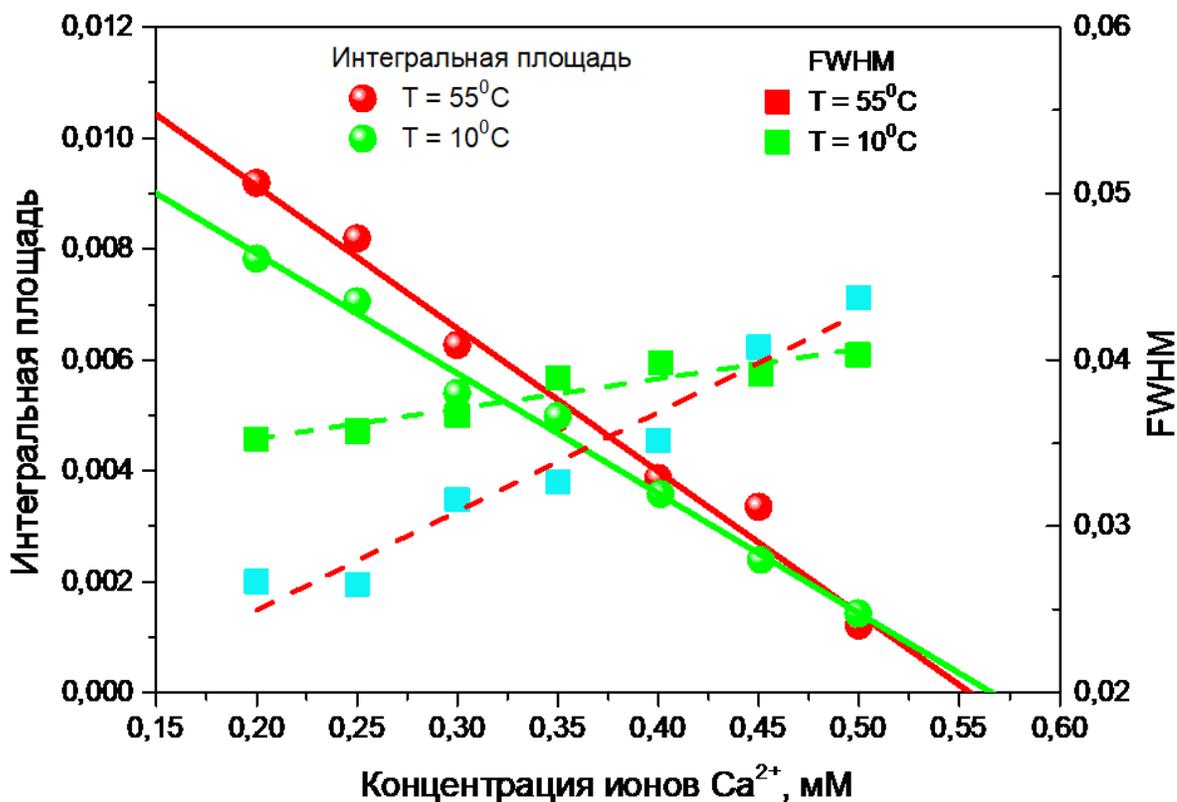


Рис. 3.7. Зависимость интегральной площади дифракционных пиков и их полной ширины на уровне половинной амплитуды (FWHM) от концентрации ионов кальция для серии образцов А-II при температурах 55 и 10 °С.

Увеличение значения FWHM с ростом $C_{Ca^{2+}}$ свидетельствует об ослаблении взаимодействия между соседними бислоями мультислойных мембран. Возрастание положительного заряда на поверхности мембраны приводит к росту электростатического отталкивания [97], в результате чего мембраны «разбегаются» на значительные расстояния. Так, например, добавление 1мМ Ca^{2+} увеличивает межмембранные расстояния МСВ ДМФХ (1 мас.%) в 3–4 раза (Табл. 3.2).

Предполагая, что значения $C_{Ca^{2+}}$, для которых $S_{intg}(C_{Ca^{2+}}) = 0$ и есть истинные концентрации перехода МСВ из «связанного» состояния в «несвязанное», для серии образцов А-II определено: $C_{Ca^{2+}}^* = 0.561(3)$ мМ при $T = 10$ °С и $C_{Ca^{2+}}^* = 0.558(2)$ мМ при $T = 55$ °С. Таким образом, можно считать, что для МСВ ДМФХ, подвергшихся переходу $L_\alpha \rightarrow L_\beta$, значение $C_{Ca^{2+}}^* = 0.56$ мМ с учетом экспериментальных ошибок в обеих фазах. Данный результат свидетельствует о том, что сформированные ОСВ достаточно стабильны, и перераспределение сил в балансе сил межмембранного взаимодействия с уменьшением температуры в данном случае не наблюдается.

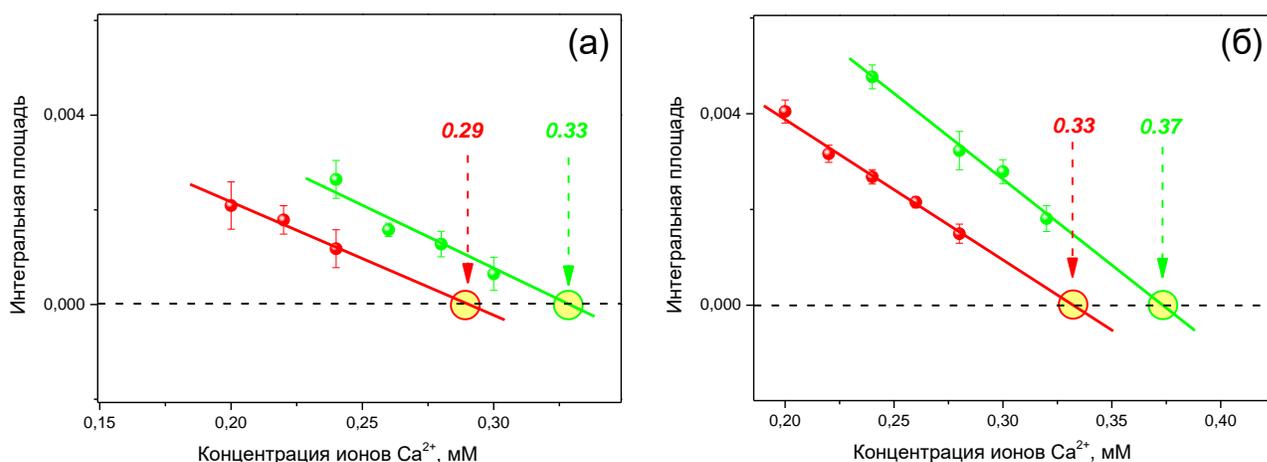


Рис. 3.8. Зависимость интегральной площади дифракционных пиков от концентрации ионов кальция для МСВ ДМФХ в растворе $CaCl_2 \cdot 2H_2O/D_2O$ (серия А-I) с массовой долей ● – 0.5 мас.% и ● – 1 мас.% при температурах 15°С (а) и 55°С (б).

Аналогичный анализ дифракционных пиков был проведен и для образцов МСВ ДМФХ с массовой долей 0.5 и 1 мас.% серии А-I в P_β (15 °С) и L_α (55 °С) фазах. Зависимость интегральной площади дифракционных пиков от концентрации ионов кальция, как и для образцов серии А-II, имеет линейный характер в предпереходной области для всех исследуемых систем (Рис. 3.8.). Линейная аппроксимация для S_{intg} от $C_{Ca^{2+}}$ дает следующие

значения: $C_{Ca^{2+}}^* = 0.29(2)$ мМ в гелевой фазе и $C_{Ca^{2+}}^* = 0.33(2)$ мМ в жидкокристаллической фазе для ДМФХ (0.5 мас.%); $C_{Ca^{2+}}^* = 0.33(3)$ мМ в гелевой фазе и $C_{Ca^{2+}}^* = 0.37(2)$ мМ в жидкокристаллической фазе для ДМФХ (1.0 мас.%).

Таким образом, определено, что значения критических концентраций ионов Ca^{2+} при исследуемом переходе зависят как от массовой доли липида в смеси, так и от условий проведения эксперимента. Так, для системы, подвергшейся нагреванию от 15 до 55 °С определено, что в жидкокристаллической фазе обсуждаемый переход имеет место при концентрации ионов кальция чуть больше, чем для гелевой фазы. Одним из возможных объяснений может служить тот факт, что площадь, приходящаяся на полярную группу липида, в жидкой фазе больше, чем в гелевой фазе [157], и, соответственно, плотность зарядов ионов кальция, связанных с поверхностью мембраны ниже, что и приводит к уменьшению электростатического отталкивания мембран. Поэтому наблюдаемый эффект происходит при меньших концентрациях ионов Ca^{2+} в фазе L_{β} , чем в L_{α} . На это указывают и значения константы связывания $K_{Ca^{2+}}$, которые зависят от фазового состояния мембран ($L_{\beta} > P_{\beta} > L_{\alpha}$), как было определено в [85,90].

Константа связывания ионов кальция

С точки зрения химии и биофизики константа связывания ионов с мембранами являются важными параметром, определение которого является не тривиальной задачей. Несмотря на множество работ, посвященных этому вопросу, значение константы связывания ионов кальция ($K_{Ca^{2+}}$) с ФХ мембранами варьируется от 1 до 100 M^{-1} [85]. Связано это с различными фактами, среди которых можно выделить:

- различные физико-химические методы [76-95];
- размеры ОСВ или МСВ, способ их приготовления;
- наличие в буфере ионов Na^+ и Cl^- и учет их связи с липидными молекулами [92];
- применение в расчетах соединения ионов кальция с липидными молекулами в стехиометрии 1:1 [76,90] или 1:2 [85].

В настоящей работе константа связывания ионов Ca^{2+} определена, основываясь на следующих рассуждениях. Анализ данных МУРН показал, что значение $C_{Ca^{2+}}^*$ зависит от концентрации липида. Этот факт можно объяснить тем, что при увеличении C_l возрастает количество возможных связей Ca^{2+} -липид. При этом количество несвязанных ионов кальция,

находящихся в межмембранном пространстве, должно уменьшаться. Но поскольку увеличивается и общее число ионов Ca^{2+} в растворе с увеличением C_l в области перехода ДМФХ мембран из «связанного» состояние в «несвязанное», то уместно предположить, что количество ионов Ca^{2+} , не связанных с липидными молекулами, будет одинаковым. Тогда можно оценить концентрацию ионов Ca^{2+} , связанных с липидными молекулами на 1 мас.% липида при общей концентрации ионов кальция $C_{\text{Ca}^{2+}} = C_{\text{Ca}^{2+}}^*$. Эта величина равна двойной разности концентрации ионов в буфере для липидов с массовыми долями 0.5 и 1.0 мас.%: 0.08 мМ в обеих фазах.

Константу связывания $K_{\text{Ca}^{2+}}$ можно определить, зная количество связанных ионов кальция с липидными молекулами (X_b , в моль/моль) и используя изотерму адсорбции Ленгмюра в виде:

$$\frac{X_b}{1-nX_b} = K_{\text{Ca}^{2+}}(C_{\text{Ca}^{2+}}^* - X_b C_l), \quad (3.1)$$

где n – число молекул липида, связанных с одним ионом кальция, C_l – концентрация ДМФХ в мМ. Для ДМФХ 1 мас.% использованы значения: масса липида $m_l = 5$ мг, молярная масса липида $M_l = 677.93$ г/моль. Значение n в расчетах взято 1 и 2, что соответствует стехиометрии связывания одного иона кальция с одной (1:1) или двумя (1:2) липидными молекулами. Как показывают вычисления, для предложенного способа определения константы связывания замена $n = 1$ на $n = 2$ не вносит существенных изменений в значения $K_{\text{Ca}^{2+}}$, которые определены как 22 M^{-1} в гелевой фазе и 19 M^{-1} в ЖК фазе. Эти значения находятся в хорошем соответствии с литературными данными. В работе [78] авторы получили $K_{\text{Ca}^{2+}} = 21(9) \text{ M}^{-1}$ при $5 \text{ }^\circ\text{C}$ для ДПФХ мембран, основываясь на анализе влияния концентрации CaCl_2 на период повторяемости МСВ, причем, как и для приведенной модели в данной работе, связывание ионов Cl^- не было учтено. Сделано это по двум причинам: (1) ионы Cl^- не конкурируют с ионами Ca^{2+} при связывании с липидными молекулами, (2) к тому же, константа связывания K_{Cl^-} существенно меньше $K_{\text{Ca}^{2+}}$. Например в работе [92] для ДПФХ мембран константы связывания определены как 37 M^{-1} и 0.28 M^{-1} для Ca^{2+} и Cl^- , соответственно, в гелевой фазе при $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. В жидкокристаллической фазе константа связывания $K_{\text{Ca}^{2+}}$ для ДПФХ мембран ранее была определена в диапазоне $10\text{--}20 \text{ M}^{-1}$ в стехиометрии 1:1 ($n = 1$) и 1:2 ($n = 2$) [84,85,90,92], что также находится в хорошем соответствии со значением 19 M^{-1} , полученным в данной работе в ЖК фазе для ДМФХ

мембран. Отношение количества связанных ионов кальция к количеству липидных молекул в переходной области составляет 1/198 в гелевой фазе и 1/185 в ЖК фазе.

Термодинамика перехода

Константа связывания – константа стабильности или, другими словами, константа равновесия образования комплекса Ca^{2+} -липид. 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 [158]

$$\ln K_{\text{Ca}^{2+}} = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}, \quad (3.2)$$

где R – газовая постоянная ($R = 8,3144598(48)$ Дж/(моль·К)), ΔH^0 – изменение энтальпии и ΔS^0 – изменение энтропии. В построении Вант-Гоффа ($\ln K_{\text{Ca}^{2+}}$ от $1/T$) наклон прямой равен $-\Delta H^0/R$, а пересечение прямой с осью $\ln K_{\text{Ca}^{2+}}$ есть величина $\Delta S^0/R$.

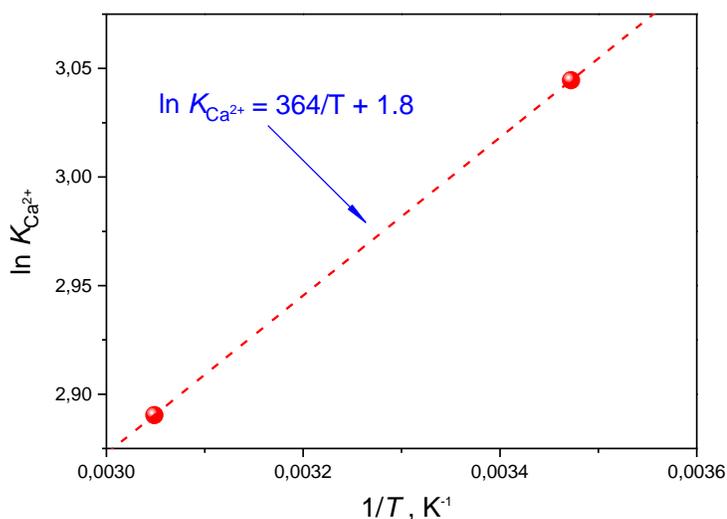


Рис. 3.9. Построение Вант-Гоффа для $K_{\text{Ca}^{2+}}$, полученных в соответствии с уравнением 3.1.

Линейная аппроксимация значений $K_{\text{Ca}^{2+}}$, полученных в соответствии с уравнением (3.1.) при температурах 15 и 55 °С, в зависимости $\ln K_{\text{Ca}^{2+}}$ от $1/T$ (Рис. 3.9) дает следующие значения для термодинамических величин: $\Delta H = -3$ кДж/моль, $\Delta S = 0.015$ кДж/(моль·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. Связывание ионов кальция с ФХ мембранами был ранее изучен методом изотермической калориметрией титрования (ИТК) для ПОФХ везикул с 10 мМ или 20 мМ CaCl_2 (100 М NaCl в буфере), полученных

экструдированием или с помощью ультразвука при $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ [82] и для ОСВ ДОФХ с 7 мМ CaCl_2 (10 мМ NaCl) в буфере при $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ [159]. В первой работе не удалось определить характер исследуемого процесса. Полученное значение $\Delta H \approx 0$ было объяснено следующими фактами: связывание/адсорбция Ca^{2+} с нейтральными ПОФХ везикулами слабое с константой связывания 10-20 M^{-1} ; энтальпия связывания/адсорбции Ca^{2+} также мала. Авторы второй работы пришли к заключению о слабом эндотермическом характере связывания/адсорбции ионов Ca^{2+} на поверхности мембраны, несмотря на то, что изменение энтальпии также было близко к нулю (ΔH для ФХ определено как 0.006(1) кДж/моль [159]). Следует заметить, что ИТК исследования проводились при не изменяемой температуре. Кроме того, процессы слияния ОСВ и фазовое разделение, в данном случае переход МСВ из «связанного» состояния в «несвязанное», которые будут описаны ниже, являются экзотермическими. Именно для концентраций ионов Ca^{2+} , при которых происходят указанные процессы, и определены значения $K_{\text{Ca}^{2+}}$ в данной работе.

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:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0. \quad (3.3)$$

Используя соотношения (3.2) и (3.3) для величины ΔG^0 можно получить следующее соотношение:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{\text{Ca}^{2+}}. \quad (3.4)$$

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.

Поверхностная плотность заряда

Справедливо заметить, что для всех исследуемых систем в работе получены значения критических концентраций перехода МСВ в «несвязанное» состояние меньше 1 мМ, соответствующей литературным данным. Это стало возможным благодаря уменьшению шага

изменения концентрации $C_{Ca^{2+}}$ до 0.02 мМ. Важно заметить, что в работах, опубликованных ранее по данной тематике, было определено, что формирование однослойных везикул в присутствии ионов кальция возможно только при плотности поверхностного заряда (σ) фосфолипидных мембран более 10^{-2} Кл/м² [78]. Так, например, в [160] для ДПФХ указано значение $\sigma > (1-2) \cdot 10^{-2}$ Кл/м².

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 [97]:

$$\sigma = \sigma_0 + (2e_0/A_l)X_b, \quad (3.4)$$

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 [161] и $A_l = 64.5 \text{ \AA}^2$ (усредненное значение по данным, полученных для 50 и 60 °С в [162]) в ЖК фазе. Вычисления показывают, что в области перехода МСВ ДМФХ 1 мас.% из «связанного» состояния в «несвязанное» мембранная поверхность имеет плотность поверхностного заряда $3.7 \cdot 10^{-2}$ Кл/м² при $T = 15$ °С и $2.6 \cdot 10^{-2}$ Кл/м² при $T = 55$ °С. Полученные значения σ хорошо согласуются с данными, полученными ранее в [78].

3.5. Структура МСВ и ОСВ: $0 \text{ мМ} \leq C_{Ca^{2+}} \leq 1 \text{ мМ}$

Качественный анализ кривых малоуглового рассеяния нейтронов и количественное определение концентрации ионов Ca^{2+} для серий образцов А-I и А-II, при которых происходит переход из «связанного» состояния в «несвязанное» позволил сделать вывод о продолжительном характере рассматриваемого перехода. При этом следует отметить, что в предпереходной области структура МСВ так же изменяется не резко.

Период повторяемости МСВ

Мультислойные везикулы существуют до $C_{Ca^{2+}} = 0.4$ мМ для серии образцов А-II во всех исследуемых фазах, до $C_{Ca^{2+}} = 0.2$ мМ и $C_{Ca^{2+}} = 0.3$ мМ для серии образцов А-I в риппл и жидкокристаллической фазах, соответственно, о чем свидетельствует дифракционный пик в области $q \approx 0.1 \text{ \AA}$. При этом период повторяемости для всех исследуемых систем возрастает с увеличением концентрации ионов кальция в растворе $CaCl_2 \bullet 2H_2O/D_2O$, как следует из

данных, представленных в Таблице 3.2. При 15°C (А-I) указаны два значения d , которые получены в результате анализа дифракционного пика, аппроксимированного двумя функциями Гауссиана (Рис. 3.6(а), вставка). Эти значения соответствуют фазам $L_{\beta'}$ и $P_{\beta'}$ для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ при $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.1$ мМ, как это следует из зависимости периода повторяемости от температуры (Рис. 3.2.).

Эффект увеличения периода повторяемости легко объяснить, учитывая тот факт, что с ростом значения $C_{\text{Ca}^{2+}}$ увеличивается количество ионов Ca^{2+} , связанных с полярной головой липидных молекул и, как следствие, возрастает электростатическое отталкивание между соседними слоями мембраны. При этом в исследуемых системах исчезает ближний порядок. Анализ корреляционной длины ($\xi = 2\pi/w$) показывает, что с увеличением значения $C_{\text{Ca}^{2+}}$ уменьшается количество слоев в системе. Так, для серии образцов А-II, ξ изменяется в диапазоне $0.2^\circ\text{ММ} \leq C_{\text{Ca}^{2+}} \leq 0.5^\circ\text{ММ}$ от 251.2 Å до 142.7 Å в L_{α} фазе и от 179.5 Å до 157.1 Å в $L_{\beta'}$ фазе. Количество слоев (N) может быть определено как $N = \xi/d$. В результате получается, что величина N уменьшается с 4(L_{α})-3($L_{\beta'}$) до 2-х слоев в обеих фазах в указанном интервале концентраций ионов кальция. Дальнейшее добавление ионов Ca^{2+} ($>0.5^\circ\text{ММ}$) приводит к полному разрушению ламеллярной структуры.

Таблица 3.2. Период повторяемости (d , Å) для МСВ ДМФХ 1 мас.% в смеси $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ в гель и жидкокристаллической фазах для двух серий образцов (А-I – при нагревании, А-II – при охлаждении) при различных концентрациях ионов кальция $C_{\text{Ca}^{2+}}$ в предпереходной области ($C_{\text{Ca}^{2+}} < C_{\text{Ca}^{2+}}^*$).

Температура $T, ^\circ\text{C}$	Фаза	Концентрация ионов кальция $C_{\text{Ca}^{2+}}$, мМ				
		0.0	0.1	0.2	0.3	0.4
<i>гель фаза</i>						
15 °C (А-I), $T \uparrow$	$P_{\beta'} \rightarrow L_{\beta'}$	64.4(2)	68.9(1) 61.0(2)	70.4(1) 63.1(3)		
15 °C (А-II), $T \downarrow$	$P_{\beta'}$	64.4(2)	66.7(1)	67.1(2)	66.3(2)	68.6(1)
10 °C (А-II), $T \downarrow$	$L_{\beta'}$	60.4(1)	61.3(1)	63.9(1)	67.1(1)	68.6(2)
<i>жидкокристаллическая фаза</i>						
55 °C (А-I), $T \uparrow$	L_{α}	60.6(1)	60.4(1)	61.1(2)	62.8(1)	
55 °C (А-II), $T \downarrow$	L_{α}	60.6(1)	61.8(2)	62.8(1)	64.8(1)	67.3(2)

Сравнительный анализ влияния ионов кальция на межмембранные взаимодействия и структуру МСВ ДМФХ проведен для серии образцов А-I с концентрациями липида 1 и

0.5 мас.% в области предперехода, установленной в предыдущем разделе. Шаг по величине $C_{Ca^{2+}}$ уменьшен до 0.02 мМ для интервала $0.2 \text{ мМ} \leq C_{Ca^{2+}} \leq C_{Ca^{2+}}^*$. Поведение кривых малоуглового рассеяния для МСВ с $C_l = 0.5 \text{ мас.}\%$ идентично поведению кривых для МСВ с $C_l = 1.0 \text{ мас.}\%$, которое детально было обсуждено ранее. Однако изменение периода повторяемости описывается разными зависимостями: линейной для МСВ ДМФХ (1.0 мас.%) и экспоненциальной для МСВ ДМФХ (0.5 мас.%) в обеих исследуемых фазах, как представлено на Рис. 3.8(а). Следует отметить, что возрастание величины d более значительно в гелевой, чем в жидкокристаллической фазе. Отношение наклонов аппроксимированных прямых ≈ 1.6 для $C_l = 1.0 \text{ мас.}\%$ в диапазоне концентраций $0 \leq C_{Ca^{2+}} \leq C_{Ca^{2+}}^*$. Значения d для $C_{Ca^{2+}} = 0.1$ и 0.2 мМ не указаны на Рис. 3.8, поскольку при этих концентрациях сосуществуют две фазы: $P_{\beta'}$ и $L_{\beta'}$. Данные представлены в Таблице 3.2. и на Рис. 3.8(б) для МСВ ДМФХ 1 мас.% в смеси $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ для $C_{Ca^{2+}} = 0.2 \text{ мМ}$ при $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$.

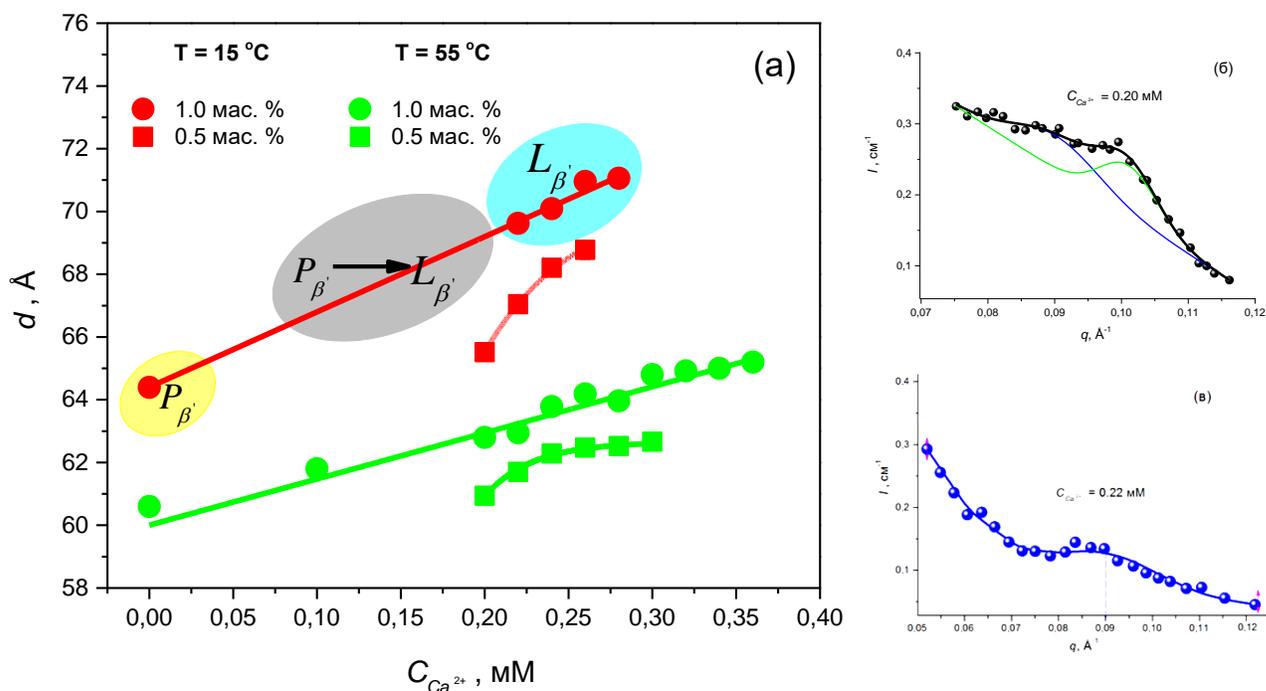


Рис. 3.8. Зависимость периода повторяемости от концентрации ионов кальция для МСВ ДМФХ в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (серия А-1) с массовой долей 0.5 мас. %: ■ – 15 °С, ■ – 55 °С и 1 мас. %: ● – 15 °С, ● – 55 °С. Экспериментальные данные (экспериментальные ошибки меньше символов) профитированы прямой для $C_l = 1.0 \text{ мас.}\%$ и экспоненциальной функцией для $C_l = 0.5 \text{ мас.}\%$ – сплошные линии (а). Кривые малоуглового рассеяния для МСВ ДМФХ 1 мас.% в смеси $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ при $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ для $C_{Ca^{2+}} = 0.2 \text{ мМ}$ (б) и $C_{Ca^{2+}} = 0.22 \text{ мМ}$ (в).

Дальнейшее увеличение $C_{Ca^{2+}}$ в исследуемой системе так же приводит к увеличению температур предперехода и основного фазового перехода. МСВ с концентрацией ионов кальция $C_{Ca^{2+}} \geq 0.22$ мМ при $T = 15$ °С уже находятся в L_{β} фазе (при $C_{Ca^{2+}} = 0.22$ мМ дифракционный пик описывается одной функцией Гауссиана – Рис. 3.8(в)). Поскольку фазовые переходы происходят для ФХ мембран в избытке растворителя (> 40 мас.% воды) при одной и той же температуре [163], то МСВ ДМФХ 0.5 мас.% находятся в L_{β} фазе при $C_{Ca^{2+}} \geq 0.22$ мМ. Экспоненциальное возрастание значения d в предпереходной области ($0.2 \text{ мМ} \leq C_{Ca^{2+}} \leq C_{Ca^{2+}}^*$) так же более выражено для $C_l = 0.5$ мас.% в L_{β} фазе. Период повторяемости изменяется от 65.5(2) Å при $C_{Ca^{2+}} = 0.2$ мМ до 68.8(1) Å при $C_{Ca^{2+}} = 0.26$ мМ в гелевой фазе и от 60.9(1) Å при $C_{Ca^{2+}} = 0.2$ мМ до 62.7(3) Å при $C_{Ca^{2+}} = 0.3$ мМ в жидкокристаллической фазе.

Однако для полного понимания влияния ионов кальция на структуру МСВ ДМФХ этой информации недостаточно. Необходимо проанализировать зависимость толщины липидного бислоя от $C_{Ca^{2+}}$ для ОСВ, образованных спонтанно, и сравнить полученный результат с данными, полученными для однослойных везикул, приготовленных методом экструдирования.

Анализ толщин липидных бислоев ДМФХ

Детальный анализ кривых малоуглового рассеяния (Рис. 3.5.–3.6.), проведенный в предыдущем разделе, позволил определить истинную концентрацию ионов Ca^{2+} , при которой ламеллярная структура МСВ разрушается полностью. Однако, как было замечено ранее, процесс перехода мультислойных везикул из «связанного» в «несвязанное» состояние сопровождается формированием ОСВ. В таблице 3.2. приведены данные для толщин спонтанно образованных и приготовленных с помощью экструдирования по методике, описанной в Главе 2, однослойных везикул в широком диапазоне концентраций ионов кальция от 0 до 10 мМ. В настоящем разделе будет рассмотрено влияние ионов Ca^{2+} на толщину липидных бислоев ДМФХ более детально в области концентраций ионов кальция $0 \text{ мМ} \leq C_{Ca^{2+}} \leq 1 \text{ мМ}$ для двух серий образцов А-I и А-II.

Зависимость толщины липидного бислоя от температуры для ОСВ ДМФХ в D_2O , представленная на Рис. 3.9., характерна для всех ФХ мембран. Уменьшение величины d_{bu} с ростом температуры связано, в первую очередь, с плавлением углеводородных хвостов

фосфолипидных молекул. Абсолютные значения толщин ОСВ, приведенные здесь, вычислялись как $\sqrt{12}R_t$, где R_t определялся из наклона аппроксимированной прямой спектров МУРН в представлении Кратки-Порода ($\ln(Iq^2)$ от q^2). Подобное приближение предполагает наличие четкой границы между мембраной и водой. Однако вода способна проникать в полярную область ФХ мембран, и в этом случае необходимо делать поправку. В работе [40] показано, что реальная толщина мембран ДМФХ в D_2O может быть определена как:

$$d'_b = d_b \left(1 - 1.26 \frac{V_W}{V_l}\right)^{-1/2} = 1.15 d_b, \quad (3.1.)$$

где V_l – объем молекулы липида и $V_W = n_w \times V_{D_2O}$ – объем молекул воды, связанных с мембраной. Для вычислений взяты значения: $V_l = 1097 \text{ \AA}^3$ (при $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$), $n_w = 7.2$ [157] и $V_{D_2O} = 30 \text{ \AA}^3$.

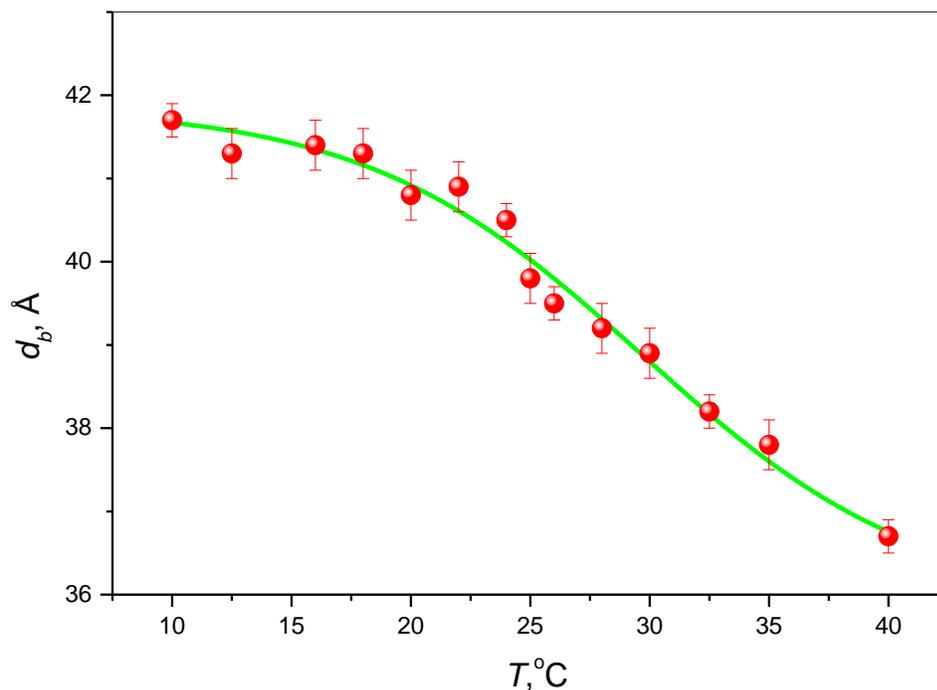


Рис. 3.9. Зависимость толщины липидного бислоя от температуры для ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в D_2O .

На Рис. 3.9. представлена зависимость расстояния «голова-голова» (d_b) для ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в D_2O . Добавление 1 мМ ионов кальция практически не влияет на величину d_b , как следует из данных, представленных в Таблице 3.2. В настоящем разделе проведен детальный анализ толщин липидного бислоя в области перехода МСВ из «связанного» состояния в «несвязанное».

Серия А-I

Как видно на Рис. 3.10. (а,б), формирование ОСВ происходит при $C_{Ca^{2+}} < C_{Ca^{2+}}^*$ как в гель, так и в ЖК фазе. В области Гинье ($0.001 \text{ \AA}^{-2} \leq q^2 \leq 0.006 \text{ \AA}^{-2}$) кривые МУРН для МСВ ДМФХ в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (серия А-I) соответствуют рассеянию от ОСВ уже при $C_{Ca^{2+}} = 0.3 \text{ мМ}$, хотя в системе еще и содержатся МСВ. Полный переход МСВ \rightarrow ОСВ происходит при концентрациях ионов кальция 0.3 мМ в L_{β} фазе и $> 0.3 \text{ мМ}$ в L_{α} фазе, когда полностью исчезает дифракционный пик и кривая МУРН описывается уравнением (2.18).

Анализ зависимости толщин липидного бислоя от концентрации ионов кальция для ОСВ, образованных из МСВ ДМФХ (1 мас.%) (серия А-I) - d_{bm} , и приготовленных методом экструдирования ОСВ ДМФХ (1 мас.%) - d_{bu} в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ в гелевой ($T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$) и ЖК ($T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$) фазах представлен на Рис. 3.11.

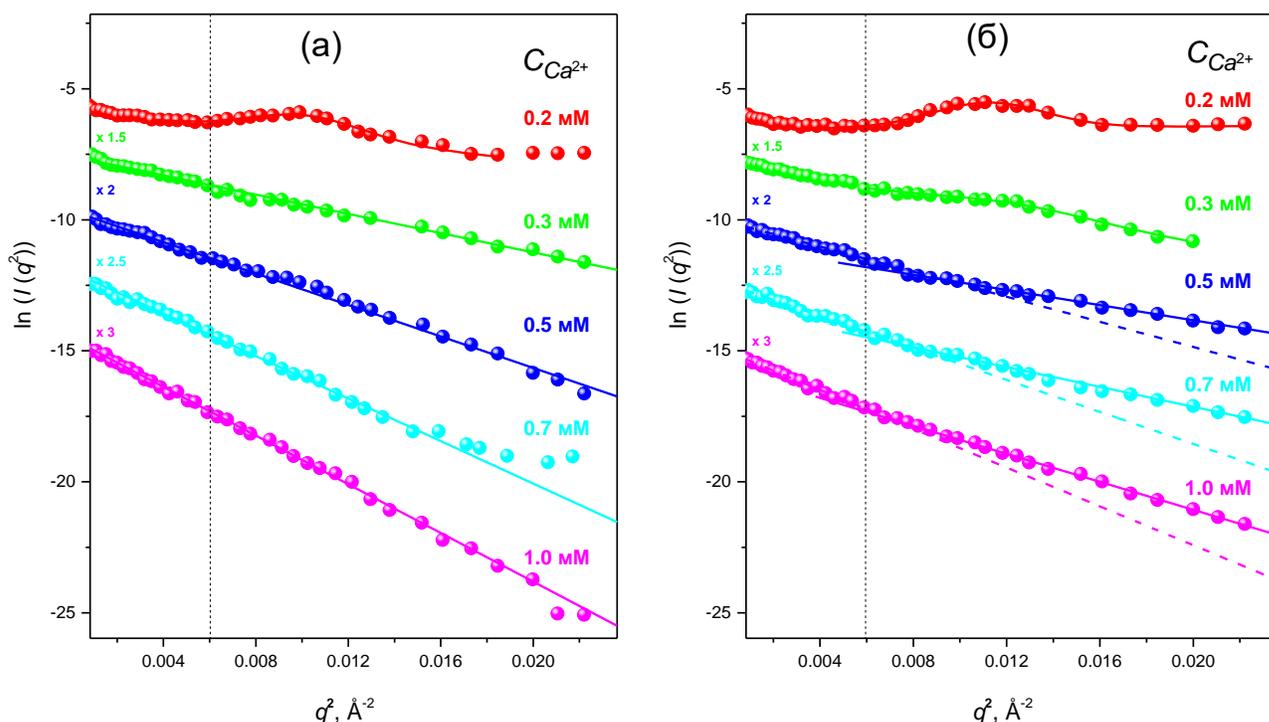


Рис. 3.10. Построение Кратки-Порода для МСВ ДМФХ в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (серия А-I) при различных концентрациях ионов кальция в гелевой (а – $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$) и ЖК (б – $55 \text{ }^\circ\text{C}$) фазах.

L_{β} фаза. Характер изменения величины d_{bm} с увеличением $C_{Ca^{2+}}$ - экспоненциальное возрастание с выходом на насыщение при $C_{Ca^{2+}} = 0.8 \text{ мМ}$. Стоит отметить, что первоначально ($C_{Ca^{2+}} = 0.3 \text{ мМ}$) формируются ОСВ (зеленые круги на Рис. 3.11) с толщиной бислоя $41.2(3) \text{ \AA}$, что соответствует значению d_{bu} для ОСВ ДМФХ в D_2O , приготовленных методом экструдирования (фиолетовая пунктирная линия на Рис. 3.11). При концентрации ионов Ca^{2+} 0.4 мМ , когда произошло полное разрушение ламеллярной структуры МСВ в гель

фазе, $d_{bm} = 42.4(0.2)$ Å. Это незначительное увеличение толщины бислоя связано с набуханием липидных мембран, индуцируемое ростом количества ионов Ca^{2+} , связанных с полярной головой липидных молекул. Дальнейшее увеличение концентрации ионов кальция не приводит к существенному росту толщины липидного бислоя. Аналогичное поведение – экспоненциальное возрастание величины d_{bu} с увеличением $C_{\text{Ca}^{2+}}$ – наблюдается и для приготовленных ОСВ (фиолетовые круги на Рис. 3.11). Однако следует обратить внимание на тот факт, что при $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.4$ мМ толщина липидного бислоя на 2 Å меньше, чем для приготовленных ОСВ в D_2O без добавления ионов кальция. Причины подобного поведения не обсуждаются в данной работе, поскольку требуют дополнительных исследований. Эта разница нивелирует только при добавлении 0.8 мМ ионов кальция. Именно поэтому ранее, при изучении подобных систем с большим шагом по концентрации ≥ 1 мМ [118,156], был сделан вывод о том, что добавление ионов Ca^{2+} не влияет на величину d_{bu} .

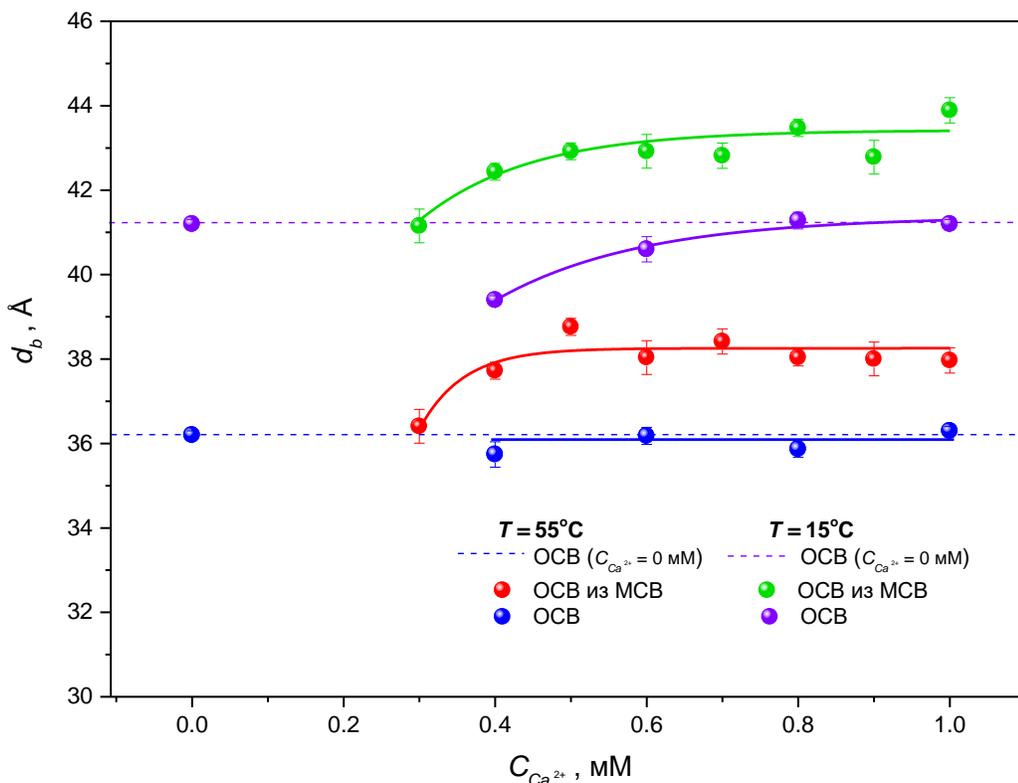


Рис. 3.11. Зависимость толщины липидного бислоя от концентрации ионов кальция для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (серия А-І) и ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в гелевой ($T = 15^\circ\text{C}$) и ЖК ($T = 55^\circ\text{C}$) фазах.

L_u фаза. Ситуация в ЖК фазе выглядит несколько иначе. Первоначально из МСВ формируются ОСВ (красные круги на Рис. 3.11) с толщиной бислоя $d_{bm} = 36.4(4)$ Å, что с учетом ошибок сопоставимо со значением $d_{bu} = 36.2(1)$ Å для ОСВ в D_2O без добавления

ионов кальция при $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$ (синяя пунктирная линия на Рис. 3.11). Экспоненциальное возрастание величины d_{bm} с ростом количества ионов кальция в системе выходит на насыщение при $C_{Ca^{2+}} = 0.6 \text{ мМ}$, когда в системе ДМФХ/ $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ все МСВ перешли в ОСВ. Однако стоит заметить, что разница между минимальным (37.8 \AA при 0.4 мМ) и максимальным (38.7 \AA при 0.5 мМ) значениями толщин менее 1 \AA и с определенной долей точности для интервала концентраций ионов Ca^{2+} от 0.4 мМ до 1.0 мМ можно считать, что увеличение величины $C_{Ca^{2+}}$ не приводит к значительным изменениям толщины липидного бислоя. Данные, полученные для ОСВ (синие круги на Рис. 3.11) также свидетельствуют о том, что добавление ионов кальция в указанном выше интервале концентраций не влияет на структуру липидного бислоя.

Серия А-II.

В области «предперехода» было изучено так же влияние ионов кальция на толщину липидного бислоя для ОСВ, образованных из МСВ и приготовленных методом экструдирования. Образцы измерялись в температурном режиме: $55 \text{ }^\circ\text{C}$ (Рис. 3.12.(а)) $\rightarrow 15 \text{ }^\circ\text{C}$ $\rightarrow 10 \text{ }^\circ\text{C}$ (Рис. 3.12.(б)). Поведение зависимости величин d_{bm} и d_{bu} с увеличением $C_{Ca^{2+}}$ в обеих фазах идентично. Формирование однослойных везикул начинается при $C_{Ca^{2+}} < C_{Ca^{2+}}^*$; при $C_{Ca^{2+}} \geq 0.45 \text{ мМ}$ кривые МУРН для МСВ фактически совпадают с кривыми для ОСВ (Рис. 3.12 (а), вставка) и могут быть описаны моделью «Везикулы», как представлено на Рис. 3.12 (с) и (д) для L_α и L_β фаз, соответственно. Отклонение экспериментальных данных от модельной кривой в области малых q ($q \leq 0.1 \text{ \AA}^{-1}$) для МСВ – выделено зеленым – свидетельствует о наличии в системе ОСВ с различными радиусами. Полидисперсность по размерам наиболее выражена для систем с $C_{Ca^{2+}} = 0.4 \text{ мМ}$. При увеличении концентрации ионов кальция до 0.5 мМ она уменьшается, о чем свидетельствуют меньшие отклонения экспериментальных данных от линейной аппроксимации в построении Кратки-Пород, как представлено на Рис. 3.13 (а-с). Толщины бислоев ОСВ, образованных из МСВ, вычислены как $\sqrt{12}R_t$, где R_t определялся из наклона аппроксимированной прямой в области $0.001 \text{ \AA}^{-2} \leq q^2 \leq 0.006 \text{ \AA}^{-2}$. Значения d_{bm} соответствуют $40.2(2) \text{ \AA}$ при $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$, $43.3(3) \text{ \AA}$ при $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ и $47.5(3) \text{ \AA}$ при $T = 10 \text{ }^\circ\text{C}$ для $C_{Ca^{2+}}$ от 0.4 до 0.5 мМ . Полученный результат согласуется с данными, полученными для серии образцов А-I. Разница в L_α фазе составляет 1.4 \AA , в L_β фазе ($T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$) получены одинаковые значения при $C_{Ca^{2+}} = 0.5 \text{ мМ}$.

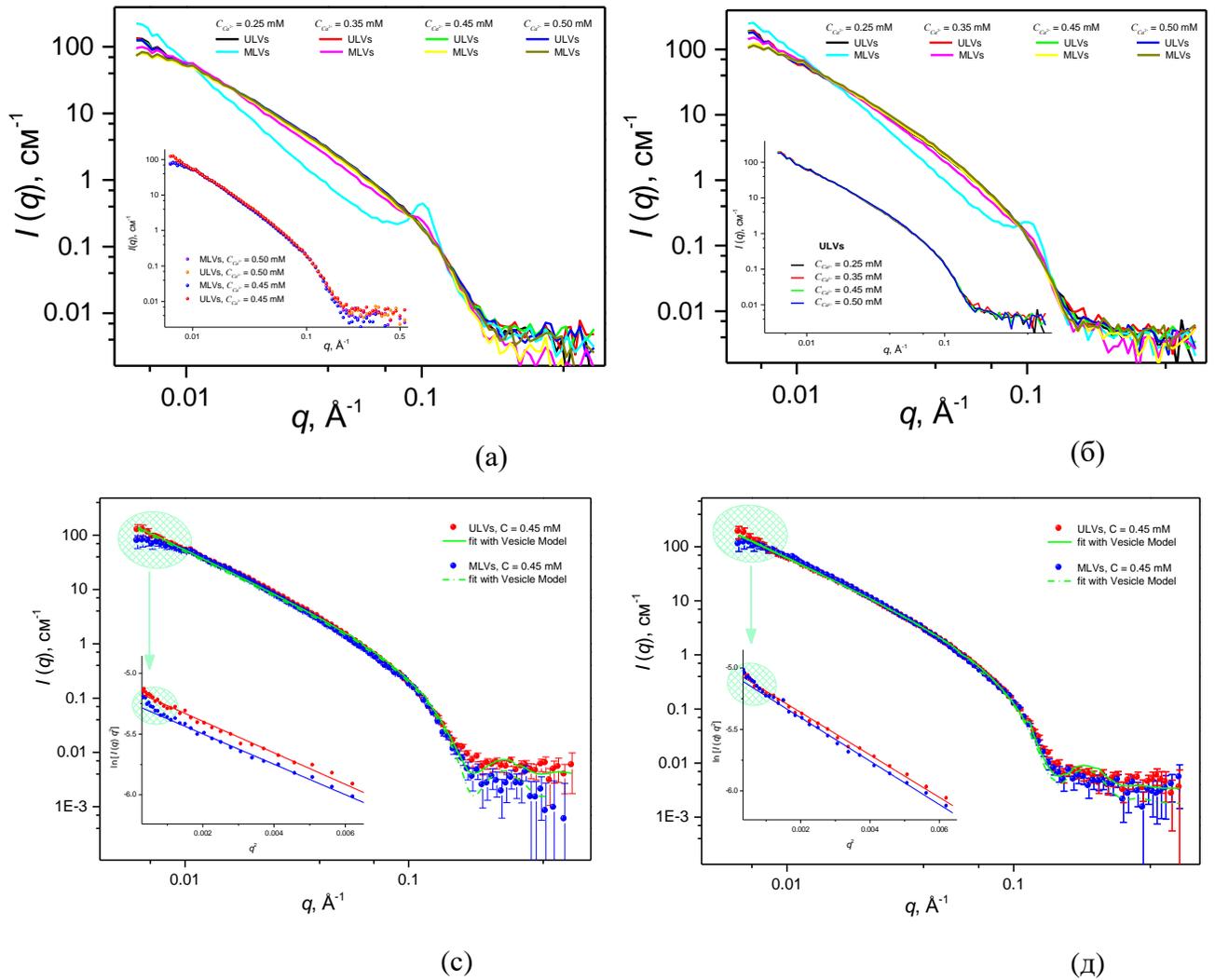


Рис. 3.12. Кривые малоуглового рассеяния для образцов серии А-II: МСВ и ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ в ЖК (а, с – $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$) и гелевой (б, д – $T = 10 \text{ }^\circ\text{C}$) фазах. На (с) и (д) сплошная (для ОСВ) и пунктирная (для МСВ) зеленые линии – наилучшие аппроксимации моделью «Везикулы» (2.18) в программе Sas View – 3.1.2; на вставках (с) и (д) – построение Кратки-Порода для области Гинье $0.001 \text{ \AA}^{-2} \leq q^2 \leq 0.006 \text{ \AA}^{-2}$

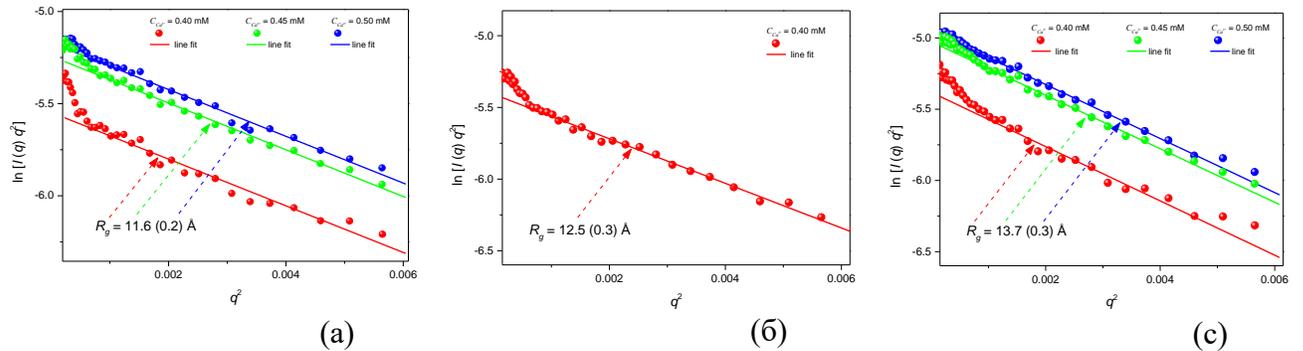


Рис. 3.13. Построение Кратки-Порода для МСВ ДМФХ в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (серия А-II) при различных концентрациях ионов кальция в ЖК (а – $55 \text{ }^\circ\text{C}$) и гелевой (б – $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$; в – $T = 10 \text{ }^\circ\text{C}$) фазах.

Следует отметить, что если для серии А-I концентрация ионов кальция 0.5 мМ соответствует «несвязанному» состоянию МСВ, то для серии А-II МСВ все еще находятся в «связанном» состоянии. Кроме того, для серии А-I было определено, что увеличение количества ионов Ca^{2+} в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ индуцируют образование ОСВ из МСВ с бóльшими толщинами, чем получено для ОСВ (Рис. 3.11) при одних и тех же концентрациях ионов кальция. Для серии А-II подобный эффект не наблюдается. В «предпереходной» области $0.4 \text{ мМ} \leq C_{\text{Ca}^{2+}} \leq 0.5 \text{ мМ}$ определены те же значения d_{bu} , что и d_{bm} в гель и ЖК фазах. Это означает, что из МСВ формируются ОСВ с толщинами бислоев, равными толщине 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) Å в L_α фазе, 43.2(3) Å и 47.5(2) Å 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 $T = 55$ °С, 41.2(1) Å при $T = 15$ °С и 41.8(2) Å при $T = 10$ °С.

Таким образом, анализ данных МУРН указывает на тот факт, что ионы кальция увеличивают толщину липидного бислоя для серии А-II. Объяснение подобного факта состоит в следующем:

- (1) Ионы кальция адсорбируются на полярной голове липидной молекулы, что приводит к частичной дегидратации липидного бислоя [91]. Ионы Ca^{2+} соединяются с отрицательно заряженной группой PO_4^- , а также могут соединяться и с $\text{C}=\text{O}$, как было показано в работе [164] при соотношении в системе $\text{Ca}^{2+}/\text{ПОФХ} = 1/17$. В результате этого нейтрально заряженные ФХ мембраны становятся положительно заряженными. При этом P^--N^+ диполь, направленный первоначально практически вдоль плоскости мембраны переориентируется под углом к этой плоскости в направлении межмембранного пространства.
- (2) С другой стороны взаимодействие ионов кальция с липидными мембранами приводит к их латеральному сжатию [164]. Это, в свою очередь, влечет за собой уменьшение площади молекул ФХ мембран, увеличение их жесткости. Мембраны становятся менее мобильными. А поскольку в гель фазе мембрана изначально была более жесткой, чем в ЖК фазе, то, именно поэтому, ионы кальция вызывают наибольшее увеличение толщины ОСВ в L_β фазе.

Ориентация P⁻-N⁺ диполя

Подводя итог вышесказанному, можно сделать вывод: увеличение концентрации ионов Ca²⁺ приводит к росту величины d_{bm} для двух серий образцов в обеих фазах. Увеличение d_{bm} по сравнению с d_{bu}^0 при $C_{Ca^{2+}} = 0$ мМ наиболее существенно для образцов, измеренных в температурном режиме 55 °С → 15 °С → 10 °С (серия А-II). Эта разница ($\Delta d_b^0 = d_{bm} - d_{bu}^0$) составляет 4.0 Å, 2 Å и 5.7 Å в порядке указанных температур для 0.4 мМ ≥ $C_{Ca^{2+}}$ ≥ 1.0 мМ. Для серии А-I $\Delta d_b^0 = 2.1$ Å при температурах 55 и 15 °С для $C_{Ca^{2+}}$ по аппроксимированной кривой в области выхода значений d_{bm} на насыщение (Рис. 3.11).

Наибольшее изменение d_{bm} приходится на область перехода МСВ из «связанного» состояния в «несвязанное». Так этот диапазон $C_{Ca^{2+}}$ составляет от 0.3 до 0.4-0.5 мМ для серии А-I и 0.4-0.5 мМ для серии А-II. При $C_{Ca^{2+}} < 1$ мМ увеличение величины d_{bm} приходится на область полярной головы липидных молекул, принимая во внимание тот факт, что ионы Ca²⁺ не проникают в область углеводородных хвостов. Причиной подобного изменения является переориентация P⁻-N⁺ диполя полярной головы в указанном выше диапазоне концентраций ионов Ca²⁺, как представлено схематично на Рис. 3.14 для ЖК фазы. При $C_{Ca^{2+}} = 0$ мМ P⁻-N⁺ диполь фактически направлен вдоль плоскости мембраны. Угол α между нормалью к плоскости мембраны и направлением P⁻-N⁺ составляет в среднем $\sim(80 \pm 1)^\circ$ в ЖК фазе [165] по данным, определенным экспериментальными методами и компьютерным моделированием.

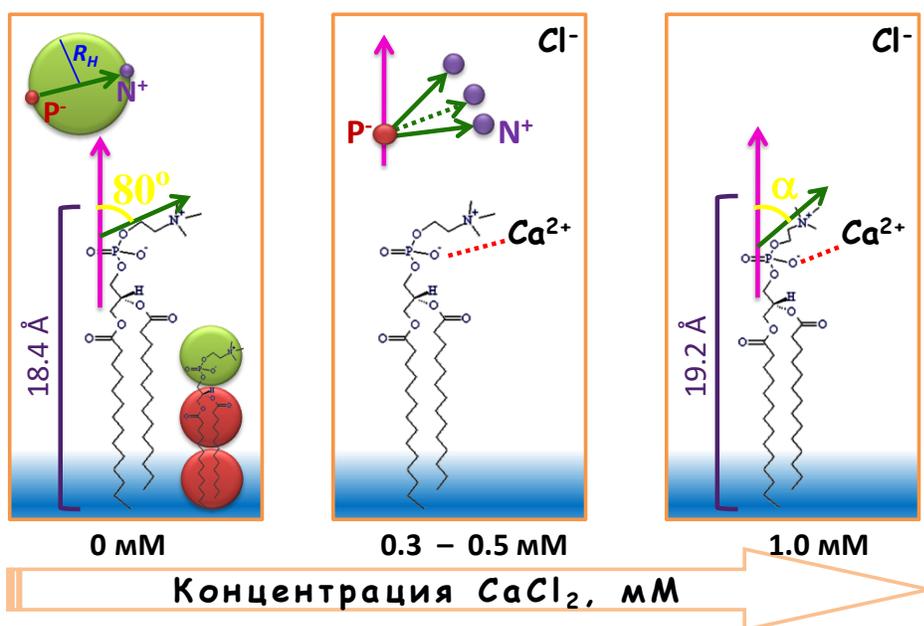


Рис. 3.14. Схематичное представление изменения структуры ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе CaCl₂•2H₂O/D₂O (серия А-I), полученных из МСВ, при увеличении концентрации ионов Ca²⁺ в ЖК фазе

Для определения изменения угла α в системе с ионами Ca^{2+} использована модель трех бусин (крупнозернистая модель фосфолипидных мембран в рамках одноцепочечной теории среднего поля) [166]. Молекула ДМФХ в этой работе представлена в одномерном пространстве в виде трех окружностей с одинаковыми радиусами 4.05 \AA (Рис. 3.14): зеленая окружность с радиусом R_H соответствует полярной области молекулы, состоящей из PO_4^- и $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ групп, соединенных короткой углеводородной цепочкой $\text{CH}_2\text{-CH}_2$; две красных окружности – область углеводородных хвостов. Выбрав диаметр окружности, совпадающий по направлению с $\text{P}^-\text{-N}^+$ диполем (схематично изображено зеленой стрелкой на Рис. 3.14), можно определить изменения угла α с увеличением величины $C_{\text{Ca}^{2+}}$. Из геометрии Рис. 3.15 для L_α фазы следует: $\cos 80^\circ = d_1/2R_H$ для ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в D_2O и $\cos \alpha = d_2/2R_H$, где $d_2 = d_1 + \Delta d_{b/2}^0$ для ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, полученных из МСВ. В гелевой фазе направление $\text{P}^-\text{-N}^+$ диполя совпадает с направлением плоскости мембраны, а угол между нормалью и углеводородными хвостами составляет 32.3° [161]. Тогда $\cos \alpha = \Delta d_{b/2}^0/2 R_H$. Вычисления показывают, что для образцов серии А-II угол α 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 ДМФХ (1 мас.%) в $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ в указанном интервале $C_{\text{Ca}^{2+}}$ углы α будут такие же, поскольку изменение величин d_{bm} и d_{bu} одинаково, как было определено в предыдущем разделе. Таким образом в указанном диапазоне концентраций ионов Ca^{2+} разница между первоначальным ($C_{\text{Ca}^{2+}} = 0 \text{ мМ}$) и определенным ($0.4 \geq C_{\text{Ca}^{2+}} \geq 1.0 \text{ мМ}$) значениями направлений $\text{P}^-\text{-N}^+$ диполей составляет 15° в ЖК фазе и 20.6° в гелевой фазе.

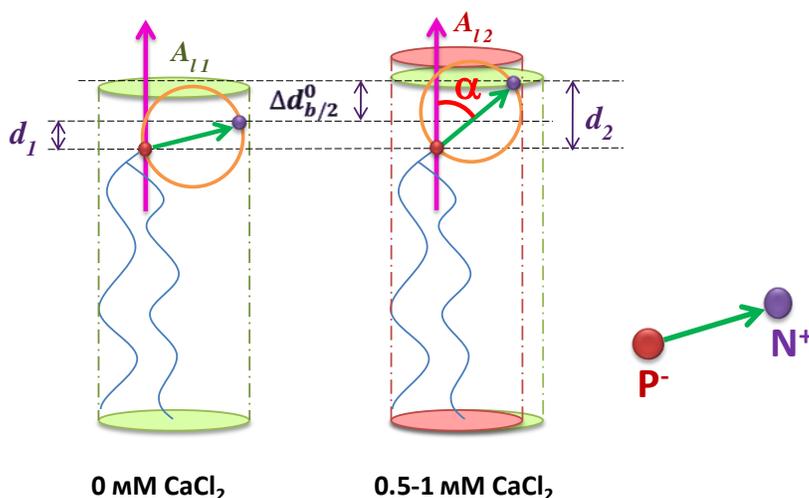


Таблица 3.3.

$C_{\text{Ca}^{2+}}$, мМ	α , град
0.3	80
0.4	74
0.5	72

Рис. 3.15. Схематичное изображение изменения направления $\text{P}^-\text{-N}^+$ диполя в ЖК фазе: слева – ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в D_2O ; справа – ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, сформированных из МСВ

Интерес представляет динамика изменения направления $P-N^+$ диполя относительно нормали к плоскости мембранной поверхности для образцов серии А-I с ростом концентрации ионов кальция от 0.3 мМ, когда из МСВ начинают формироваться ОСВ, до 1 мМ. Данные для ЖК фазы представлены в Таблице 3.3 и схематично изображены на Рис. 3.14 (в середине). Подобного эффекта для приготовленных ОСВ не обнаружено. Следует отметить, что для всех образцов использована одна и та же величина $2R_H$ в предположении, что при одинаковых температурных условиях все длины связей между функциональными группами полярной головы ДМФХ молекулы остаются неизменными. В литературе нет данных опровергающих данное предположение. Более того, хорошо известно, что для ДМФХ объем головы не изменяется с ростом температуры и составляет 331 \AA^3 как в гелевой [161], так и ЖК фазе [162]. Изменение направления диполя в область межмембранного пространства и вызывает уменьшение площади молекулы липида (условно показано на Рис. 3.15: зеленым – исходная и красным – конечная площадь), которое наблюдалось в исследованиях ранее для ДПФХ, но при больших концентрациях ионов Ca^{2+} ($C_{Ca^{2+}} = 2.25 \text{ мМ}$) и в присутствии в буфере 5 мМ NaCl и составляло $\sim 2.3/4.7 \text{ \AA}^2$ (гелевая/ЖК фазы) [118]. Также следует отметить, что здесь не приводятся данные для $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$, поскольку предложенный подход справедлив только при неизменном значении толщины углеводородной части ДМФХ молекулы. Как было отмечено ранее, добавление ионов кальция в растворе $CaCl_2 \bullet 2H_2O/D_2O$ приводит к увеличению температур и основного фазового перехода, и предперехода. Так, МСВ в диапазоне концентраций ионов Ca^{2+} от 0 до 0.2 мМ находятся в $P_{\beta'}$ фазе, при $C_{Ca^{2+}} \geq 0.22 \text{ мМ}$ везикулы находятся в $L_{\beta'}$ фазе, как было показано для образцов серии А-I (Рис. 3.8.). Это означает, что длина гидрофобной части для ОСВ ДМФХ (1 мас.%) в растворе $CaCl_2 \bullet 2H_2O/D_2O$, сформированных из МСВ, при $C_{Ca^{2+}} \geq 0.22 \text{ мМ}$ больше, чем для ОСВ без добавления кальция, и предложенный способ определения направления $P-N^+$ диполя в данном случае применен быть не может.

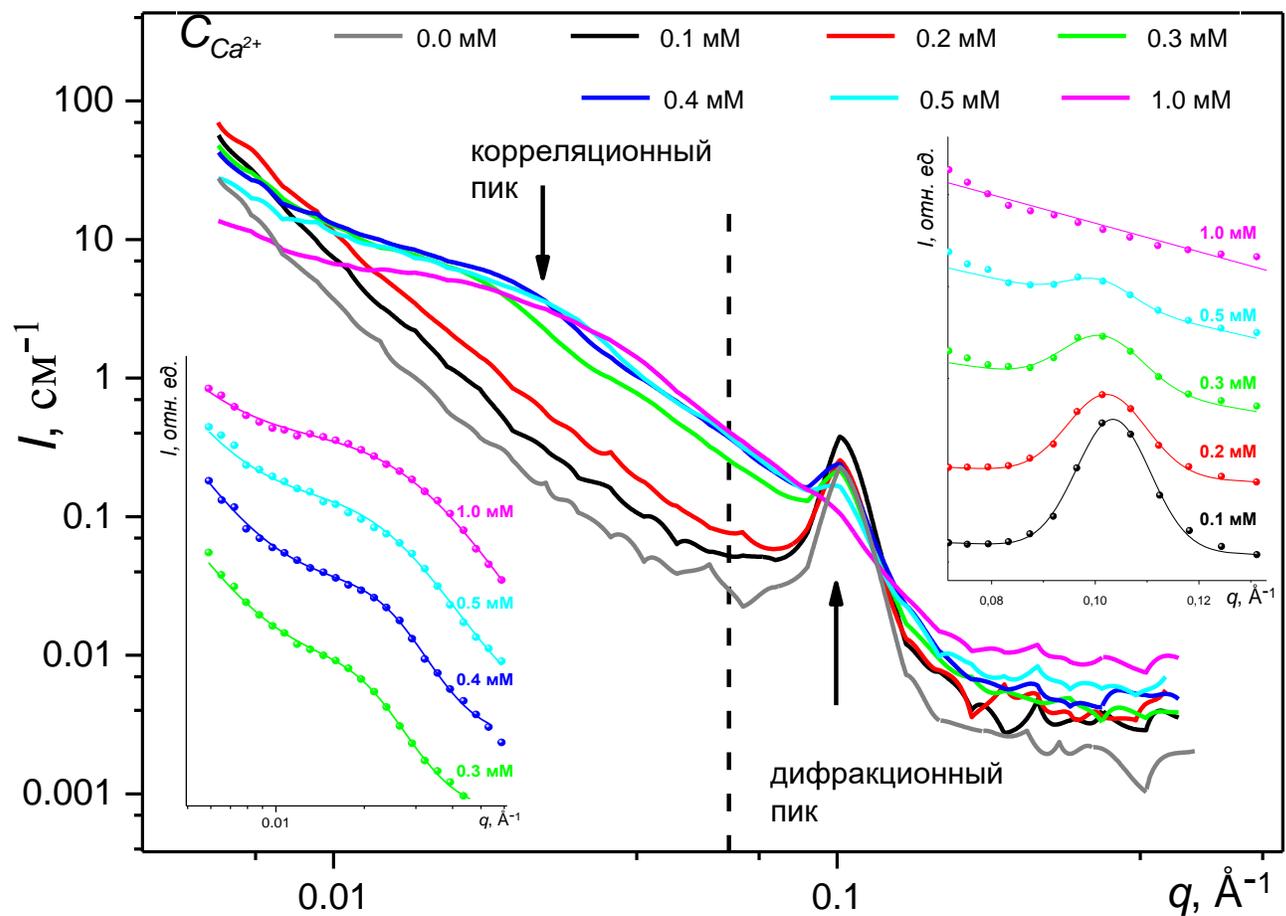
3.6. Слияние мембран

Для серии В МСВ ДМФХ 1 мас.% готовились в D_2O , после гомогенизации образцов добавлялся 10 мМ раствор $CaCl_2 \bullet 2H_2O/D_2O$ так, чтобы финальная концентрация ионов кальция составляла 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 и 1 мМ. Кривые малоуглового рассеяния нейтронов представлены на Рис. 3.16 (а) для МСВ ДМФХ после стабилизации один день при комнатной

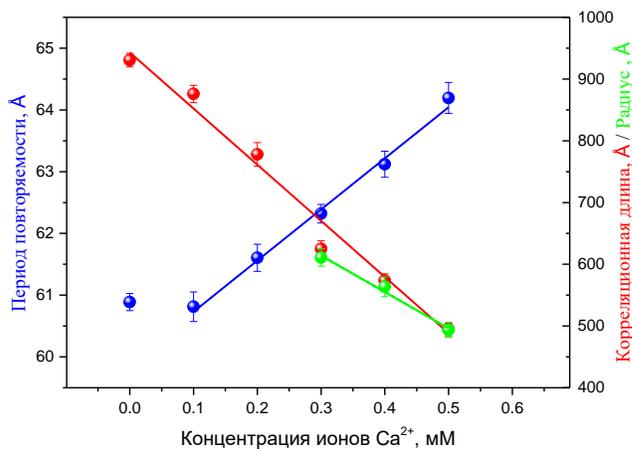
температуре в ЖК фазе ($T = 55$ °С). Из данных следует, что при увеличении величины $C_{Ca^{2+}}$ от 0 до 0.2 мМ сохраняется мультислойная структура везикул. При этом незначительно возрастает период повторяемости от 60.9 до 61.6 Å в указанном диапазоне концентраций. Дальнейшее добавление ионов Ca^{2+} приводит к структурным изменениям в исследуемой системе, о чем свидетельствует постепенное исчезновение дифракционного пика в области $q \geq 0.065$ Å⁻¹ и формирование широкого пика в области $q \leq 0.065$ Å⁻¹. При $C_{Ca^{2+}} = 1$ мМ дифракционный пик исчезает, что свидетельствует об отсутствии ближнего порядка в исследуемой системе. В диапазоне концентраций ионов кальция 0.1 мМ $\leq C_{Ca^{2+}} \leq 0.5$ мМ период повторяемости МСВ линейно возрастает от 60.8 до 64.2 Å, как представлено на Рис. 3.16(б). Зависимость интегральной интенсивности и ширины дифракционного пика (Рис. 3.16(в)) свидетельствует о постепенном разрушении мультислойной структуры, как и для образцов серии А-II. Интегральная интенсивность в указанном диапазоне линейно уменьшается и $S_{intg}(C_{Ca^{2+}})$ принимает нулевое значение при $C_{Ca^{2+}} = 0.56$ мМ. Именно при этой концентрации имел место переход МСВ (серия А-II) из «связанного» состояния в «несвязанное».

Однако для данной системы не наблюдается формирование ОСВ в ЖК фазе. Пик в области $q \leq 0.08$ Å⁻¹ начинает формироваться при $C_{Ca^{2+}} \geq 0.3$ мМ. По положению пика q_0 , которое определено из аппроксимации экспериментальных данных функцией Гауссиана, 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 $C_{Ca^{2+}}$ 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 ($\xi = 2\pi/w$) 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 в интервале концентраций ионов кальция от 0.3 до 0.5 мМ уменьшается с 10 до 7.

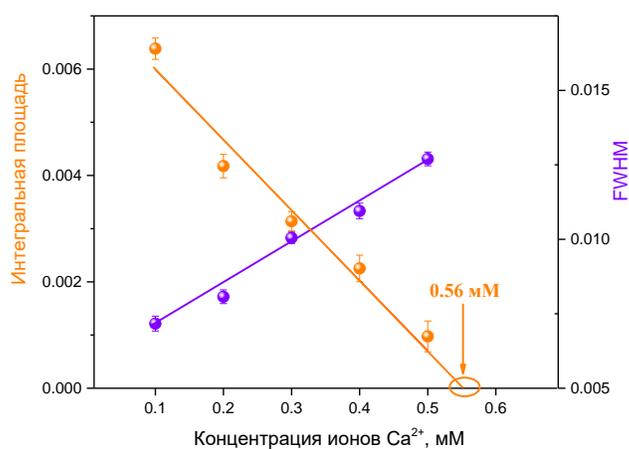
Таким образом, структурные изменения МСВ в D₂O, наблюдаемые при добавлении ионов Ca^{2+} , имеют место при $C_{Ca^{2+}} \geq 0.3$ мМ. Учитывая тот факт, что ионы кальция не проникают в межмембранное пространство, а находятся на внешней поверхности МСВ можно предположить, что наблюдаемый эффект вызван слиянием соседних мембран. Электростатическое отталкивание в присутствии малого количества ионов кальция легко преодолимо и мембраны могут находиться на достаточно близком расстоянии друг от друга.



(a)



(б)



(в)

Рис. 3.16. (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 которой функцией Гауссиана представлена линиями на вставках для экспериментальных данных (точки) для соответствующих концентраций; (б) – зависимость периода повторяемости (синие круги), корреляционной длины (красные круги), определенные из дифракционного пика, и радиуса везикул (зеленые круги), определенный из корреляционного пика, от концентрации ионов кальция; (в) – зависимость интегральной площади (оранжевые круги) и ширины (фиолетовые круги) дифракционного пика от концентрации ионов кальция.

Ионы кальция (сфера с радиусом 1 Å (Shannon, 1976)), связываясь с мембранной поверхностью, вызывают частичную дегидратацию липидного слоя, что приводит к ослаблению гидратационного отталкивания. Ионы Ca^{2+} способны связываться с двумя липидными молекулами близкорасположенных МСВ. Мембраны находятся в стерическом контакте друг с другом, где ионы кальция выполняют роль мостиков между соседними мембранами (I стадия слияния). В результате тепловых флуктуаций в области контакта возникают поры, внутренний слой «уходит» из этой области, а внешний образует бислойную перегородку (II стадия слияния). Полное слияние (III стадия) возникает при наличии сквозной поры. В эту пору вместе с растворителем попадают и ионы Ca^{2+} (выравнивается градиент по концентрации), которые индуцируют слияние мембран слой за слоем. Все вышеперечисленные процессы схематически представлены на Рис. 3.17.

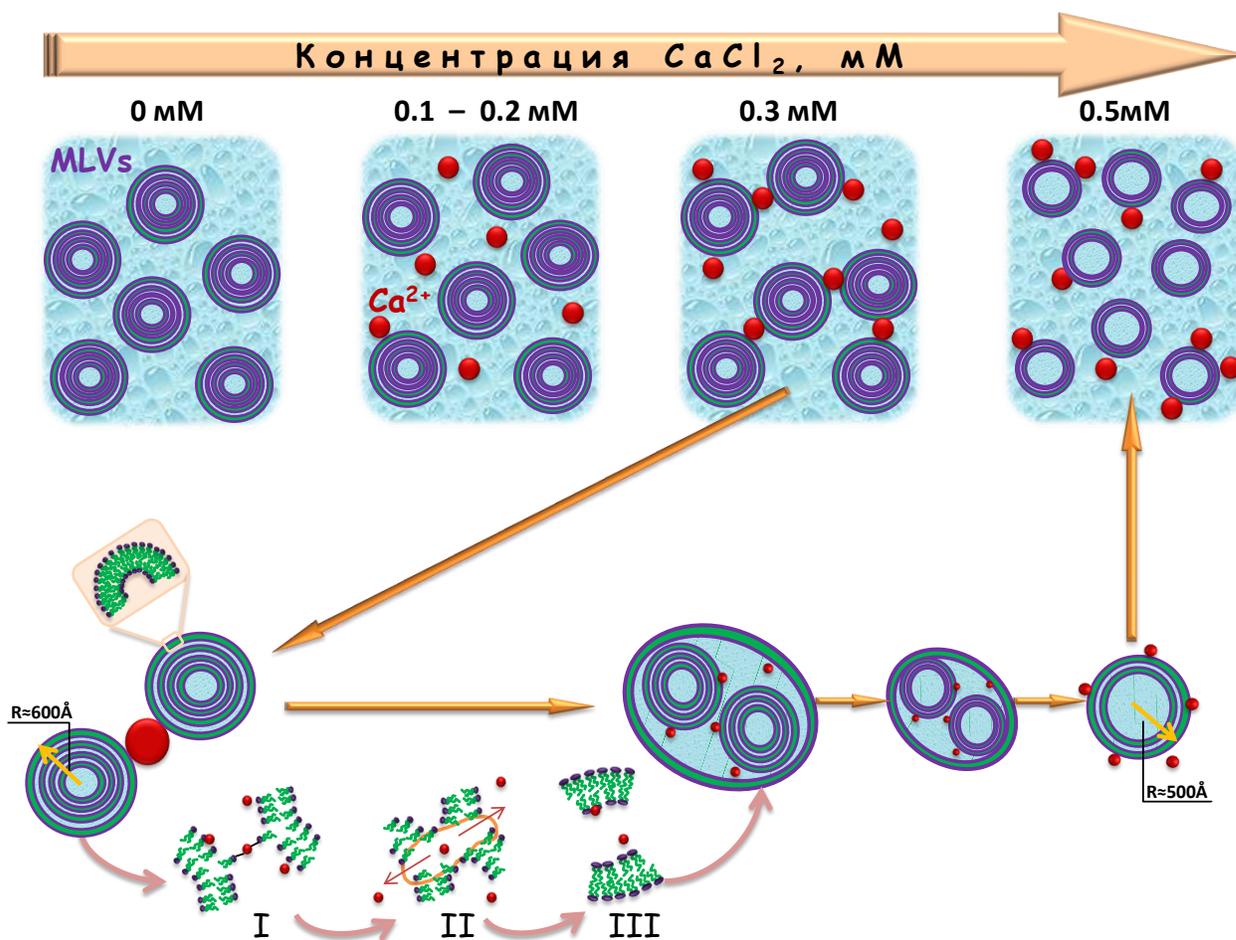


Рис. 3.17. Слияние МСВ ДМФХ, индуцируемое добавлением ионов кальция

3.7. Выводы к главе 3

Проведенные исследования показали, что температура основного фазового перехода в присутствии ионов кальция увеличивается. Так 0.1 мМ ионов Ca^{2+} в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ сдвигает T_m на 1 °С.

С увеличением концентрации ионов кальция реализуется переход МСВ ДМФХ в «несвязанное» состояние как в гелевой, так и в жидкокристаллической фазах. 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, 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 области 0–1 мМ по концентрации ионов кальция 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 как: $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.33$ мМ в фазе L_β и $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.37$ мМ в фазе L_α при переходе системы из гелевой в жидкокристаллическую фазу, $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.56$ мМ при переходе $L_\alpha \rightarrow L_\beta$ во всех исследуемых фазах.

Определено, что формирование однослойных везикул с толщиной липидного бислоя, соответствующей толщине липидного бислоя для ОСВ в отсутствие ионов Ca^{2+} , начинается в предпереходной области при $C_{\text{Ca}^{2+}} = 0.3$ 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 Å (L_β/L_α) больше, чем толщина липидного бислоя однослойных везикул, приготовленных без добавления ионов кальция.

В области исследуемого перехода мембранная поверхность МСВ ДМФХ 1 мас.% имеет плотность поверхностного заряда $3.7 \cdot 10^{-2}$ Кл/м² при $T = 15$ °С и $2.6 \cdot 10^{-2}$ Кл/м² при $T = 55$ °С.

Рассчитаны константы связывания ионов Ca^{2+} с мембранной поверхностью ДМФХ: $K_{\text{Ca}^{2+}} = 22 \text{ M}^{-1}$ в гелевой фазе и $K_{\text{Ca}^{2+}} = 19 \text{ M}^{-1}$ в ЖК фазе. Эти значения находятся в хорошем соответствии с данными, полученными альтернативными методами исследования, для нейтрально заряженных ФХ мембран, но с большим значением $C_{\text{Ca}^{2+}}$ и/или при наличии в растворителе ионов Na^+ и Cl^- .

Определен ряд термодинамических параметров в области перехода МСВ ДМФХ из «связанного» состояния в «несвязанное»: изменение энергии Гиббса составляет -7.4 кДж/моль в L_{β} фазе и -8.0 кДж/моль в L_{α} фазе; 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)).

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; разница между первоначальным ($C_{\text{Ca}^{2+}} = 0$ мМ) и определенным ($0.4 \geq C_{\text{Ca}^{2+}} \geq 1.0$ мМ) значениями направлений P^-N^+ диполей составляет 15° в ЖК фазе и 20.6° в гелевой фазе.

Дополнительные исследования структуры МСВ ДМФХ (1 мас.%), приготовленных в D_2O , показали, что при добавлении ионов Ca^{2+} ($C_{\text{Ca}^{2+}} \geq 0.3$ мМ) происходит разрушение мультислойной структуры, как и для МСВ ДМФХ, изначально приготовленных в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ с заданной концентрацией ионов кальция. Однако для данной системы формирование ОСВ не наблюдается. Подобное изменение структуры, по всей видимости, связано со слиянием МСВ 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. Частичная дегидратация липидного слоя ФХ мембран при добавлении ионов Ca^{2+} приводит к ослаблению гидратационного отталкивания. Это является причиной слияния соседних мембран.

ГЛАВА 4. ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ, СВОЙСТВ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ НЕВОДНЫХ ПОЛЯРНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Данная глава посвящена исследованию влияния диметилсульфоксида (ДМСО) и диэтилсульфоксида (ДЭСО) на структуру и фазовые состояния ФХ мембран в широком диапазоне мольных долей сульфоксидов (X). Проведен сравнительный анализ структурных параметров и стабильности мультислойных везикул (МСВ): приготовленных методом экструдирования, образованных путем слияния однослойных везикул (ОСВ) ДМФХ в растворе сульфоксид/вода или ОСВ ДМФХ в воде с добавлением сульфоксидов. Предложено прямое доказательство дегидратации липидной поверхности при образовании комплексов ДМСО-липид при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ с помощью метода вариации контраста.

4.1. Структура и фазовые переходы липидных мембран в присутствии сульфоксидов

Первоочередной задачей данной работы было исследование влияния ДМСО и ДЭСО на структуру липидного бислоя и межмембранные взаимодействия, которые определяются балансом сил притяжения и отталкивания. Однако, гидрофобный эффект, который предположительно усиливается в присутствии ДЭСО, способен существенно изменить баланс межмембранных взаимодействий.

Влияние ДМСО на структуру ДМФХ мембран

Структура DMPC-d54 мембран в избытке растворителя ДМСО/вода исследовалась во всем диапазоне мольных долей сульфоксида как в гелевой, так и в ЖК фазах методом малоуглового рассеяния нейтронов. На Рис.4.1. представлены типичные кривые МУРН для (а) МСВ и (б) ОСВ ДМФХ-d54 (2 мас.%) в смеси ДМСО/Н₂О при мольных долях ДМСО, указанных на графиках, в жидкокристаллической фазе ($T = 55$ °С). Полученные данные позволили определить период повторяемости МСВ как $d = 2\pi/q_0$, где q_0 определялось из аппроксимации кривых МУРН уравнением (2.23) и толщину липидного бислоя для ОСВ ($d_b = \sqrt{12} R_t$, где R_t – наклон аппроксимирующей прямой в представлении Кратки-Порода на Рис.4.1.(б)). Определение зависимости толщины липидного бислоя от концентрации ДМСО оказалось весьма нетривиальной задачей, поскольку увеличение мольной доли ДМСО

($X_{\text{ДМСО}} > 0.2$) в растворе ДМСО/вода приводит к слипанию мембран, о чем подробно будет описано в разделе 4.2. Здесь, на Рис.4.1.(б), представлены данные, полученные для свежеприготовленных ОСВ ДМФХ-d54 и измеренных в течение 20 минут. Как видно из графика, при $X_{\text{ДМСО}} = 0.431$ кривая рассеяния имеет не линейную зависимость, как это характерно для однослойных везикул в координатах $\ln Iq^2$ от q^2 . Появление дифракционного пика в области $q \approx 0.11 \text{ \AA}^{-1}$ свидетельствует о наличии в системе мультислойной структуры. Это означает, что слипание мембран происходит фактически сразу после приготовления ОСВ при $X_{\text{ДМСО}} > 0.4$ с образованием мультислойной структуры. Сравнительный анализ МСВ, приготовленных и образованных из ОСВ, будет рассмотрен в разделе 4.2.

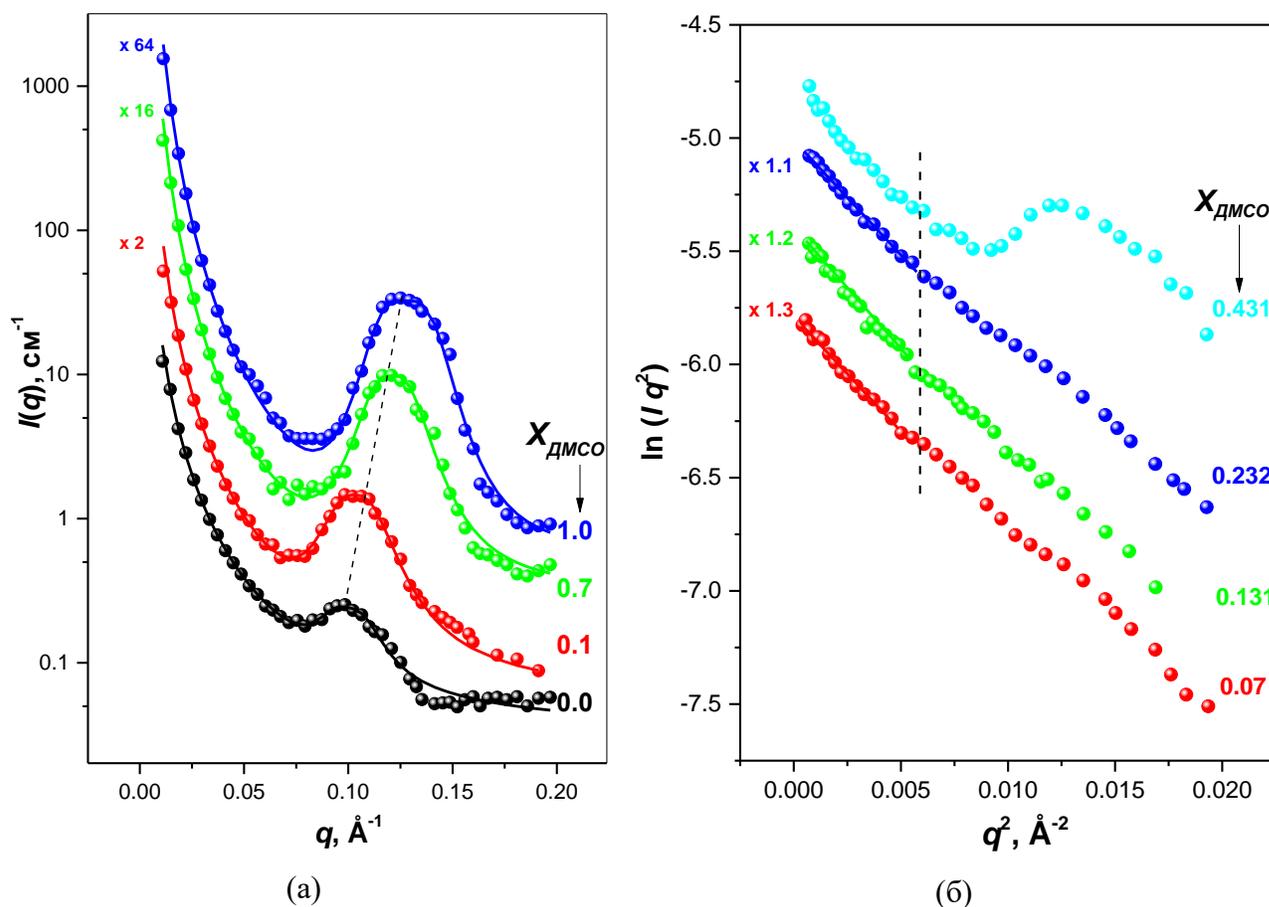


Рис.4.1. Кривые МУРН для (а) МСВ с аппроксимирующими кривыми (линии), полученные из (2.23), и (б) ОСВ ДМФХ-d54 (2 мас.%) в растворе ДМСО/ H_2O для различных мольных концентраций ДМСО при $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$

Зависимости периода повторяемости, толщины липидного бислоя и межмембранного расстояния от мольной доли ДМСО для ДМФХ-d54 мембран (2 мас.%) в растворителе ДМСО/вода в гелевой и ЖК фазах представлены на Рис.4.2. (а), (б) и (в), соответственно. Можно выделить 4 характерные области изменения величины d в зависимости от $X_{\text{ДМСО}}$ для

L_{β} фазы и 2 области для L_{α} фазы. Первый участок относится к диапазону концентраций $X_{\text{ДМСО}} \in (0; 0.1)$ и характеризуется резким уменьшением величины d с увеличением $X_{\text{ДМСО}}$ в обеих фазах. Следует отметить, что данная зависимость носит совершенно противоположный характер в случае глицерина [167]. Дальнейшее уменьшение периода повторяемости d наблюдается при увеличении $X_{\text{ДМСО}}$ от 0.1 до 0.3. Влияние ДМСО на свойства липидных мембран незначительно в диапазоне концентраций $0.3 \leq X_{\text{ДМСО}} \leq 0.8$ в гель фазе. Период повторяемости практически не изменяется. При $X_{\text{ДМСО}} \in (0.8; 1.0)$ наблюдается резкое уменьшение d с 51.8 Å до 44 Å, что соответствует переходу мембран в фазу с взаимным проникновением углеводородных хвостов. Таким образом, представленные результаты показывают, что изменение периода повторяемости d для ДМФХ-d54 в растворе ДМСО/вода носит тот же характер, что и для ранее изученных систем [127]. В отличие от гелевой фазы в жидкокристаллической фазе наблюдается практически линейное уменьшение величины d с ростом концентрации ДМСО от 52.8 Å при $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$ до 40.5 Å при $X_{\text{ДМСО}} = 1.0$.

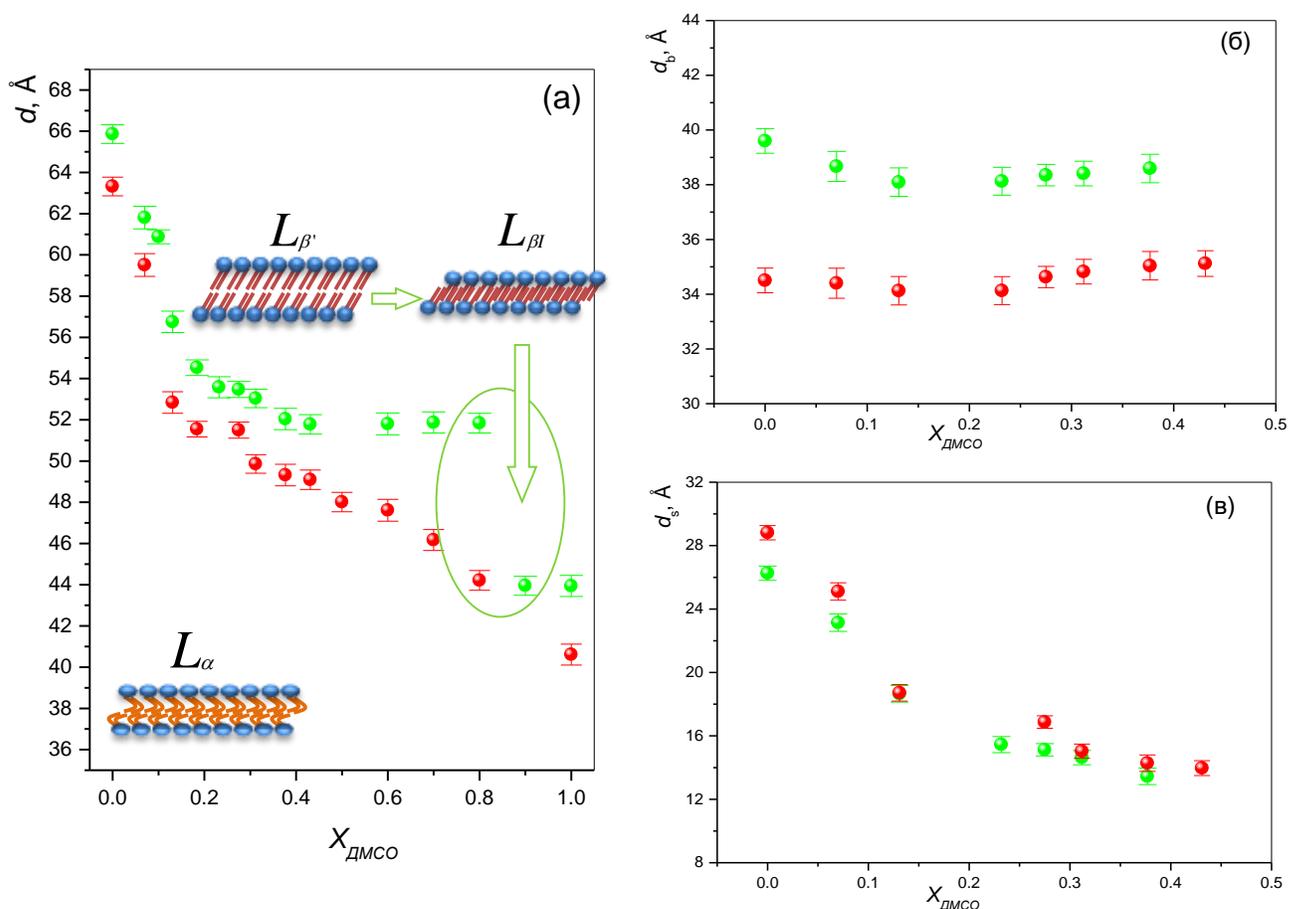


Рис.4.2. Зависимости (а) периода повторяемости d , (б) толщины липидного бислоя d_b и (в) межмембранного расстояния $d_s = d - d_b$ от мольной доли ДМСО для ДМФХ-d54 мембран (2 мас.%) в растворе ДМСО/вода в ● гелевой $L_{\beta'}$ ($T = 12.5$ °C) и ● ЖК L_{α} ($T = 55$ °C) фазах.

Для исследования влияния ДМСО на межмембранные взаимодействия необходимо определить величину межмембранного расстояния d_s . Это легко сделать, используя соотношение $d_s = d - d_b$. С этой целью была изучена зависимость толщины одиночных липидных мембран d_b от $X_{\text{ДМСО}}$. Частичная замена воды на ДМСО до $X_{\text{ДМСО}} = 0.13$ приводит к незначительному уменьшению величины d_b , дальнейший рост концентрации ДМСО до $X_{\text{ДМСО}} = 0.4$ не влияет на величину d_b в $L_{\beta'}$ фазе как показано на Рис.4.2(б). Увеличение мольной доли ДМСО в растворе ДМСО/вода практически не влияет на толщину ОСВ в исследуемом диапазоне $X_{\text{ДМСО}}$ в L_a фазе. Этот результат достаточно хорошо согласуется с опубликованными ранее данными [127,168]. С помощью электронных профилей, полученных из рентгеноструктурных данных от мультислойных мембран, было показано, что значение d_b остается практически постоянным для любых $X_{\text{ДМСО}}$ [127]. Однако следует отметить, что численные значения толщины мембраны при более высоких концентрациях ДМСО могут быть несколько неточны из-за его проникновения в полярную часть мембраны. Этот эффект, в определенном смысле, аналогичен тому, который возникает в случае исследований с помощью дифракции рентгеновских лучей: атомы серы молекулы ДМСО при взаимодействии с полярной группой липидных молекул изменяют наблюдаемую толщину липидного бислоя [125,169]. Если взаимодействие между ДМСО и фосфорной группой более сильное, чем между молекулами воды и гидрофильной частью липидных молекул, то добавление ДМСО должно приводить к частичному замещению молекул воды в области полярных голов. В этом случае должно наблюдаться более глубокое проникновение молекул ДМСО в область полярной головы липидного бислоя, как это было определено, например, в [170]. Вместе с этим показано, что в гелевой фазе направление $\text{P}^- \text{N}^+$ диполя практически параллельно плоскости липидного бислоя в присутствии ДМСО с мольной долей 0.1-0.2.

Значительное уменьшение межмембранного расстояния DMPC-d54 мембран наблюдается с ростом $X_{\text{ДМСО}}$ до 0.2 (Рис.4.2(в)) для исследуемых систем в обеих фазах. Дальнейшее увеличение мольной доли ДМСО ($X_{\text{ДМСО}} > 0.2$) не приводит к существенным изменениям величины d_s . Однако стоит заметить, что на более длительном временном интервале (> 30 минут), когда мембраны предположительно находятся в равновесном состоянии, при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ уже наблюдается слияние ОСВ DMPC-d54. 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.

Дегидратация мембраной поверхности

Для определения степени дегидратации мембранной поверхности, вызванной присутствием ДМСО в растворителе, необходимо знать, сколько молекул ДМСО могут связаться с молекулой липида. Для исследования подобных проблем в малоугловом рассеянии нейтронов традиционно используется метод вариации контраста, который заключается, как правило, в замене водородных компонент растворителя на дейтерированные. При всей привлекательности метода существует ряд серьезных трудностей, которые необходимо разрешить для извлечения из экспериментальных данных корректной информации. Во-первых, исследуемая система должна соответствовать условию: плотность длины рассеяния ДМРС ($\overline{\rho}_m$) близка нулю и много меньше плотности растворителя ДМСО/вода (ρ_s). Во-вторых, принимая во внимание, что сульфоксиды при определенных ранее мольных долях и временных интервалах, как было показано в работе [171], вызывают слияние ОСВ, нужно подобрать оптимальные условия эксперимента. Принимая во внимание эти факты, для изучения данного вопроса была выбрана тройная система ДМФХ-d54/ДМСО-d6/вода с мольной долей $X_{\text{ДМСО-d6}} = 0.2$. ОСВ ДМФХ-d54 с массовой долей липида в смеси ДМСО-d6/вода 2 мас.% готовились по методике, описанной в Главе 2, для объемных соотношений $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$: 0/1, 0.2/0.8, 0.4/0.6, 0.6/0.4, 0.8/0.2 и 0/1. Время измерения было сокращено до 15 мин для полного исключения слияния везикул.

Определение зависимости интенсивности в нулевой угол $I(0)$ от $\Delta\rho$ дает возможность вычислить точку компенсации $I(0) = 0$ при $\overline{\rho}_m = \rho_s$ [147], как следует из уравнения (2.20). Точка компенсации определена из Рис.4.3.

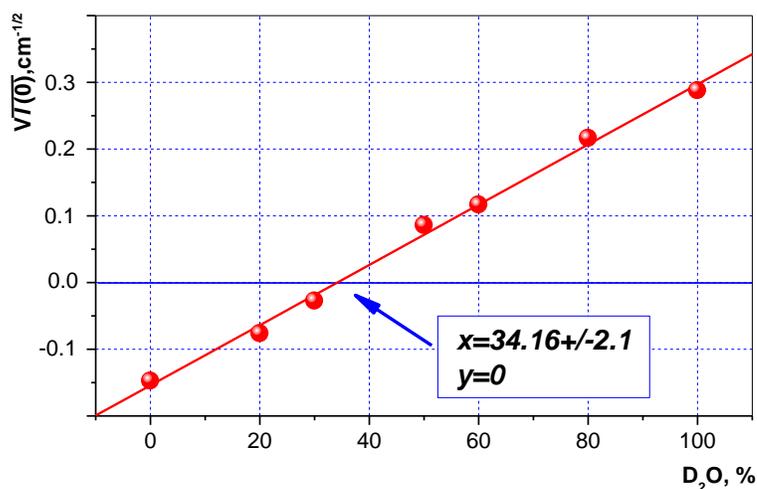


Рис.4.3. Зависимость $\sqrt{I(0)}$ от процентного содержания D_2O для ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в растворе ДМСО-d6/вода в гель фазе ($T = 15^\circ\text{C}$). Мольная доля ДМФХ-d6 $X_{\text{ДМСО-d6}} = 0.2$. Точка компенсации ($I(0) = 0$) соответствует 34 % D_2O или $\rho_{s,\text{matching}} = 3.53 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$.

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 $\overline{\rho_m}$ и ρ_s определяются уравнениями (4.1) и (4.2):

$$\overline{\rho_m} = \frac{b_l + n_{\text{ДМСО}} b_{\text{ДМСО}}}{V_l + V_{\text{ДМСО}} b_{\text{ДМСО}}} \quad (4.1)$$

$$\rho_s = \chi \rho_{\text{ДМСО}} + (1 - \chi) \rho_w, \quad (4.2)$$

где $n_{\text{ДМСО}}$ – число молекул ДМСО-d6, сильно связанных с мембранной поверхностью, $b_{\text{ДМСО}} = 6 \cdot 10^{-12}$ см и b_w – длины рассеяния тепловых нейтронов молекул ДМСО-d6 и воды в точке компенсации ($I(0) = 0$) для смеси H₂O/D₂O, где для 34% D₂O $b_w = 0.54 \cdot 10^{-12}$ см и $\rho_{s, \text{matching}} = 3.53 \cdot 10^{10}$ см⁻², соответственно, $\chi = 0.25$ – количество молекул ДМСО-d6, приходящихся на одну молекулу воды растворителя, $V_w = 30 \cdot 10^{-24}$ см³ и $V_{\text{ДМСО}} = 118 \cdot 10^{-24}$ см³ – 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 равен 430 Å³ [172]. Это подтверждает результаты работ [173,174], ранее полученные для аналогичной системы, но при меньшем количестве растворителя.

Принимая во внимание, что (1) головные части ДМФХ и ДМФХ-d54 идентичны; (2) измерения для ДМФХ-d54 проводились в гелевой фазе ($T_m = 17.3$ °C); (3) число молекул воды, связанных с липидной молекулой (n'_w) для ДМФХ в воде в гелевой фазе определено как 3-4.5 [175], можно сделать заключение, что при $X_{\text{ДМСО-d6}} = 0.2$ молекулы ДМСО полностью вытесняют молекулы воды, связанные с липидом. Это означает, что присутствие ДМСО в растворе ДМСО/вода с мольной долей $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ приводит к полной дегидратации мембранной поверхности.

Структура ФХ мембран в присутствии диэтилсульфоксида (ДЭСО)

Рентгеноструктурный анализ

Пионерская работа по исследованию влияния ДЭСО на структуру МСВ ДПФХ (50 мас.%) была выполнена методом рентгеноструктурного анализа на дифрактометре ДРОН-4 [143], адаптированном для исследования коллоидных систем (Рис. 4.4(слева)). В качестве источника излучения рентгеновских лучей используется Си-анодная трубка с длиной волны

1.54 Å. Фокусировка Брэгга-Брентано и две щели расположены на расстоянии 10 мм друг от друга, рядом с выходным окном трубки, и используются для формирования рентгеновского луча. Дополнительная щель помещается непосредственно перед образцом для подавления рассеяния от границ второй щели. Сканирование θ - 2θ выполняется в горизонтальной плоскости (с вращением детектора вокруг вертикальной оси). Образец в боросиликатном капилляре с диаметром 1,5 мм и толщиной стенок 0,01 мм (В. Мюллер, Берлин, Германия) помещался в держатель. Температура на образце устанавливалась с помощью жидкостного термостата с точностью $\pm 0,5$ °C и контролировалась термопарой. Период повторяемости многослойной структуры определялся по положению дифракционных пиков (Рис. 4.4(справа)) в соответствии с уравнением Брэгга-Вульфа ($2d \sin\theta = \lambda n_i$, где n_i — порядок дифракционного максимума).

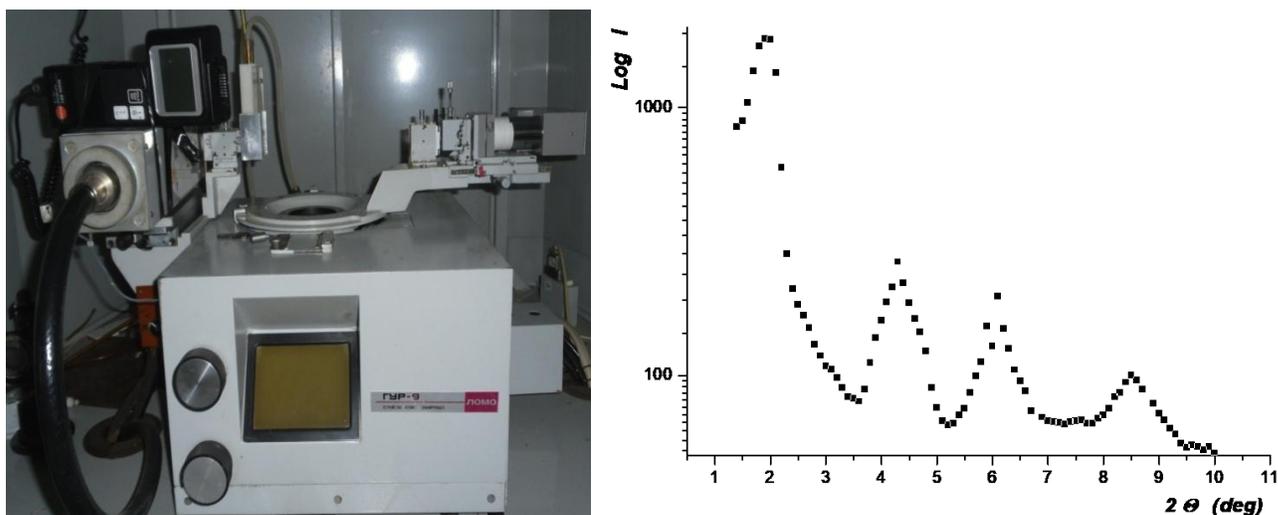


Рис. 4.4. Дифрактометр ДРОН-4 в конфигурации для исследования мембран (слева) и рентгеновский дифракционный спектр для системы ДПФХ/ДЕСО/Н₂О с $X_{ДЕСО} = 0.2$ при $T = 20$ °C (справа).

Полученные зависимости периода повторяемости мультислойных ДПФХ мембран от температуры для различных мольных долей ДЭСО в растворе ДЭСО/Н₂О представлены на Рис. 4.5. Анализ данных показывает, что при $X_{ДЕСО} \geq 0.2$ исчезает риппл фаза и МСВ ДПФХ (50 мас.%) испытывают только основной фазовый переход $L_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ с ростом температуры, как и в случае ДМСО [135]. Аналогичный результат был получен и для ДМФХ мембран (20 мас.%) в растворе ДЭСО/Н₂О методом ДСК [134]. Кроме того, при увеличении $X_{ДЕСО}$ переход из гелевой фазы в ЖК фазу происходит в более узком температурном диапазоне: 2 °C при $X_{ДЕСО} = 0.2$ и 0.4; 1 °C при $X_{ДЕСО} = 0.8$. При полной замене воды на ДЭСО наблюдается сосуществование двух фаз при $X_{ДЕСО} = 1$ в точке фазового перехода. Температуры основных

фазовых переходов определены из аппроксимации экспериментальных данных функцией Больцмана по аналогии, как детально было показано на Рис. 3.2. Данные, представленные в Таблице 4.1., свидетельствуют о росте температуры основного фазового перехода МСВ ДПФХ (50 мас.%) с увеличением мольной доли ДЭСО в растворе ДЭСО/Н₂О, зависимость T_m от $X_{ДЭСО}$ (Рис. 4.7.) имеет экспоненциальный характер, как следует из аппроксимации экспериментальных данных.

Зависимости периода повторяемости от концентрации ДЭСО для МСВ ДПФХ (50 мас.%) в растворе ДЭСО/Н₂О в гелевой и жидкокристаллической фазах имеет одинаковый характер. На Рис. 4.6. представлены данные при $T = 20$ °С. Определено, что добавление диэтилсульфоксида ($X_{ДЭСО} = 0.1$) существенно уменьшает величину d с 64.2 Å и 57.5 Å для ДПФХ мультислоев в чистой воде до 58.6 Å и 46.0 Å при $T = 20$ °С и $T = 70$ °С, соответственно. Дальнейшее добавление ДЭСО приводит к незначительному уменьшению периода повторяемости мультислойных мембран как в $L_{\beta'}$, так и в L_a фазах. Сравнительная характеристика зависимости периода повторяемости мультислойных мембран от мольной доли $X_{ДЭСО}$ и $X_{ДМСО}$ (Таблица 4.1.) подтверждает предположение о схожем механизме взаимодействия сульфоксидов с липидными мембранами. Однако, в случае ДЭСО в гелевой фазе при $X_{ДЭСО} = 0.9$ не наблюдается резкое уменьшения величины d , как это имело место при исследовании влияния ДМСО на липидные мультислои [127,172]. Это означает, что мультислойные мембраны в присутствии ДЭСО не подвержены переходу в фазу с взаимным проникновением углеводородных цепей.

Таблица 4.1. Данные X-RAY для МСВ ДПФХ в ДМСО/вода и ДЭСО/вода.

Мольная доля X	Период повторяемости (Å)				Температура главного фазового перехода (°С)		
	Гелевая фаза		Жидкая фаза		$T_{m_ДЕСО}$	$T_{m_ДМСО}^a$	$T_{m_ДМСО}^b$
	$d_{ДЕСО} \pm 2\text{Å}$	$d_{ДМСО}^a$	$d_{ДЕСО} \pm 2\text{Å}$	$d_{ДМСО}^a$			
0	64.2	64.0	57.5	58.0	41.0	40.7	40.7
0.1	58.6	57.8	46.0			44.0	44.0
0.2	58.2	58.0	41.1	50.0	47.0	49.0	49.0
0.3	57.8	57.6				50.0	50.0
0.4	57.9	57.0	40.8		55.0		
0.5		57.0		47.0		52.0	52.0
0.6	57.7	57.5			57.5	56.0	52.0
0.7	58.0	57.0					52.0
0.8	58.5	56.0	38.2	44.0	58.5	55.0	52.5
0.9	57.5	51.8				58.0	52.0
1	57.1	52.0		41.0	59.0	78.0	

^a V. I. Gordeliy et al., Biophys.J. 75, 2343 (1998), ^b M.A. Kiselev, JINR Preprint (2003)

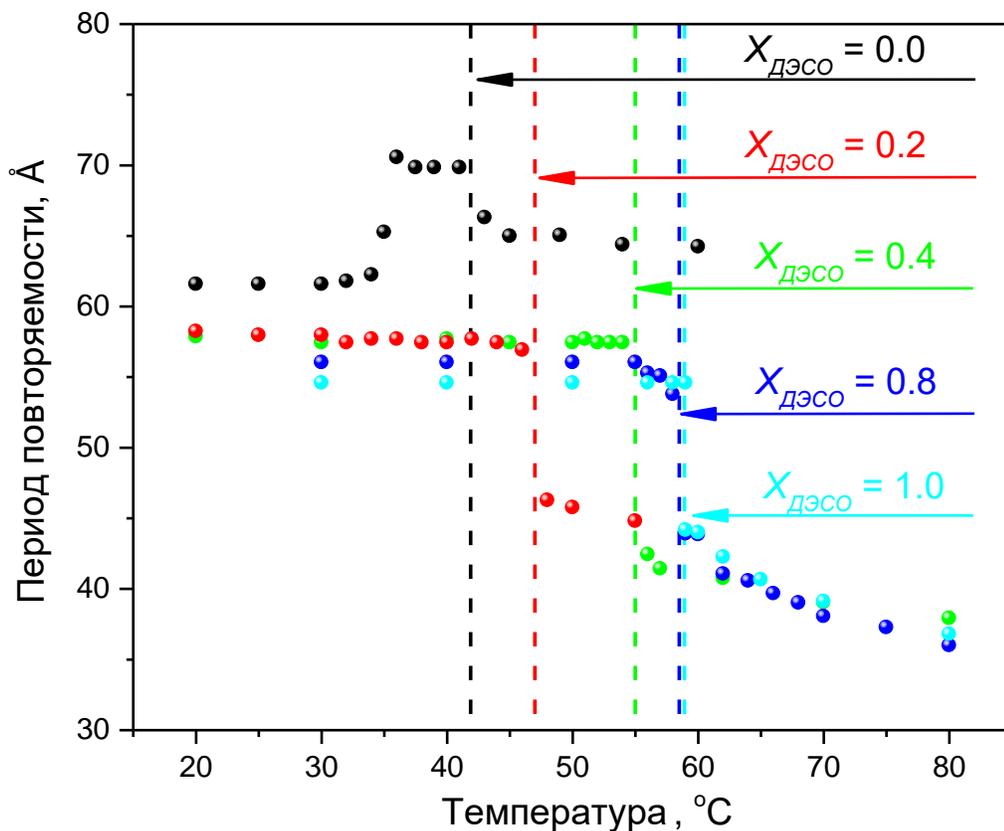


Рис.4.5. Зависимость периода повторяемости от температуры для МСВ ДПФХ (50 мас.%) для различных мольных долей ДЭСО в растворе ДЭСО/Н₂О. Вертикальные пунктирные линии соответствуют температурам основных фазовых переходов для соответствующих $X_{\text{ДЭСО}}$.

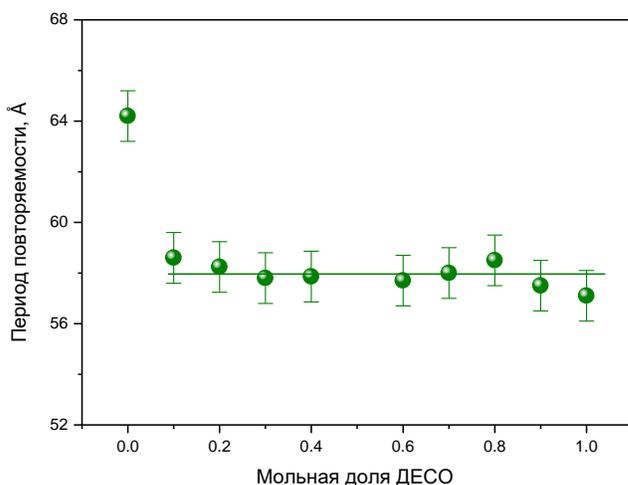


Рис.4.6. Зависимость периода повторяемости от концентрации ДЭСО для МСВ ДПФХ (50 мас.%) в растворе ДЭСО/Н₂О при $T = 20$ °С.

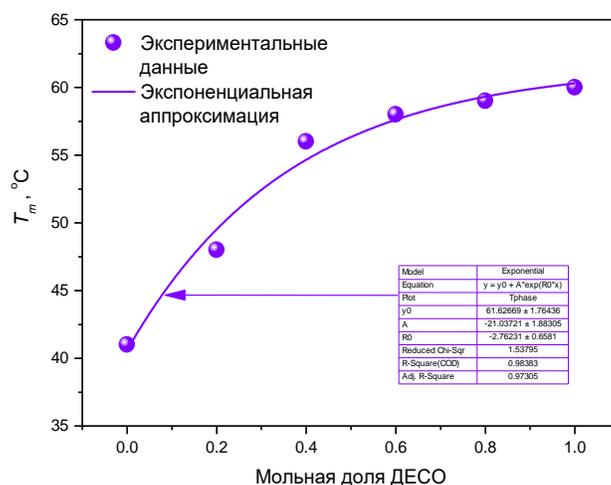


Рис.4.7. Зависимость температуры основного фазового перехода от концентрации ДЭСО для МСВ ДПФХ (50 мас.%) в растворе ДЭСО/Н₂О.

МУРН

Методом малоуглового рассеяния нейтронов проведено исследование влияния ДЭСО на структуру и фазовые состояния ДМФХ мембран в избытке растворителя. На Рис. 4.8. представлены кривые МУРН для МСВ ДМФХ (2 мас.%) при различных мольных долях ДЭСО в растворе ДЭСО/D₂O в гелевой (а) и ЖК (б) фазах. Уменьшение интенсивности кривых МУРН обусловлено меньшим содержанием дейтерия в растворе ДЭСО/D₂O с ростом $X_{ДЭСО}$. Тем не менее, получение значений d из спектров возможно. Периоды повторяемости для мультислойной структуры, определенные из максимума интенсивности для положения дифракционного пика q_0 как $d = 2\pi/q_0$, указаны в Таблице 4.2. для L_{β} фазы в диапазоне концентраций ДЭСО от 0 до 0.8. Ясно видно, что в гелевой фазе наблюдается значительное уменьшение периода повторения для МСВ ДМФХ от 60.6(1) Å в чистом D₂O до 56.9(2) Å при $X_{ДЭСО} = 0.2$. В той же области мольных долей ДЭСО период повторяемости существенно уменьшается от 60.9(1) до 42.6(1) Å в жидкокристаллической фазе. Дальнейшее увеличение мольной доли ДЭСО в растворе ДЭСО/D₂O в области $0.3 \geq X_{ДЭСО} \geq 0.8$ не влияет на значение d в гелевой фазе.

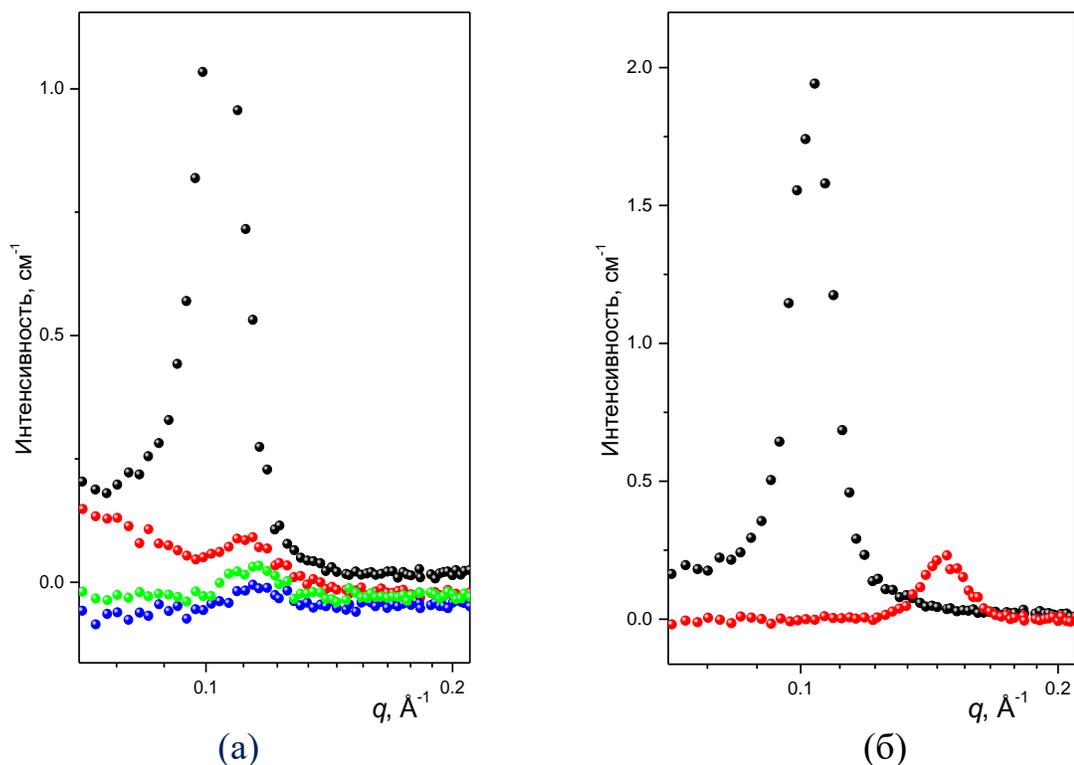


Рис.4.8. Кривые МУРН для МСВ ДМФХ (2 мас.%) в растворе ДЭСО/D₂O при различных мольных долях ДЭСО: $X_{ДЕSO} = 0.0$ (черные символы), 0.2 (красные символы), 0.4 (синие символы) и 0.8 (зеленые символы) в гелевой при $T = 14$ °C (а) и ЖК при $T = 64$ °C (б) фазах.

Таблица 4.2. Период повторяемости для МСВ ДМФХ в ДЭСО/D₂O в гелевой фазе.

X_{DES0}	0.0	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7	0.8
d (Å)	60.6(1)	56.9(2)	54.1(4)	54.0(4)	54.5(2)	54.7(3)	54.9(3)

Толщина однослойных мембран ДМФХ определена как $d_b = \sqrt{12} R_t$, где R_t – наклон аппроксимирующей прямой в представлении Кратки-Порода $\ln(I(q)q^2)$ от q^2 в области q , удовлетворяющей условию $qR_t \leq 1$ (вставки А на Рис. 4.9.). Из представленных данных следует, что ОСВ ДМФХ стабильны только до мольной доли ДЭСО 0.2 включительно. Дальнейшее увеличение ДЭСО ($X_{DES0} \geq 0.3$) приводит к слиянию мембран с образованием мультислойной структуры, на что указывает дифракционный пик (вставки В на Рис. 4.9.). Аналогичный эффект наблюдался и для ОСВ ДМФХ в присутствии ДМСО (Рис.4.1.(б)). Однако если ДМСО практически не изменяет толщину мембран, то увеличение мольной доли ДЭСО в ДЭСО/D₂O приводит к линейному уменьшению величины d_b , как представлено на Рис.4.10 для ОСВ ДМФХ в двух исследуемых фазах: гелевой ($T = 12$ °С) и жидкокристаллической ($T = 55$ °С).

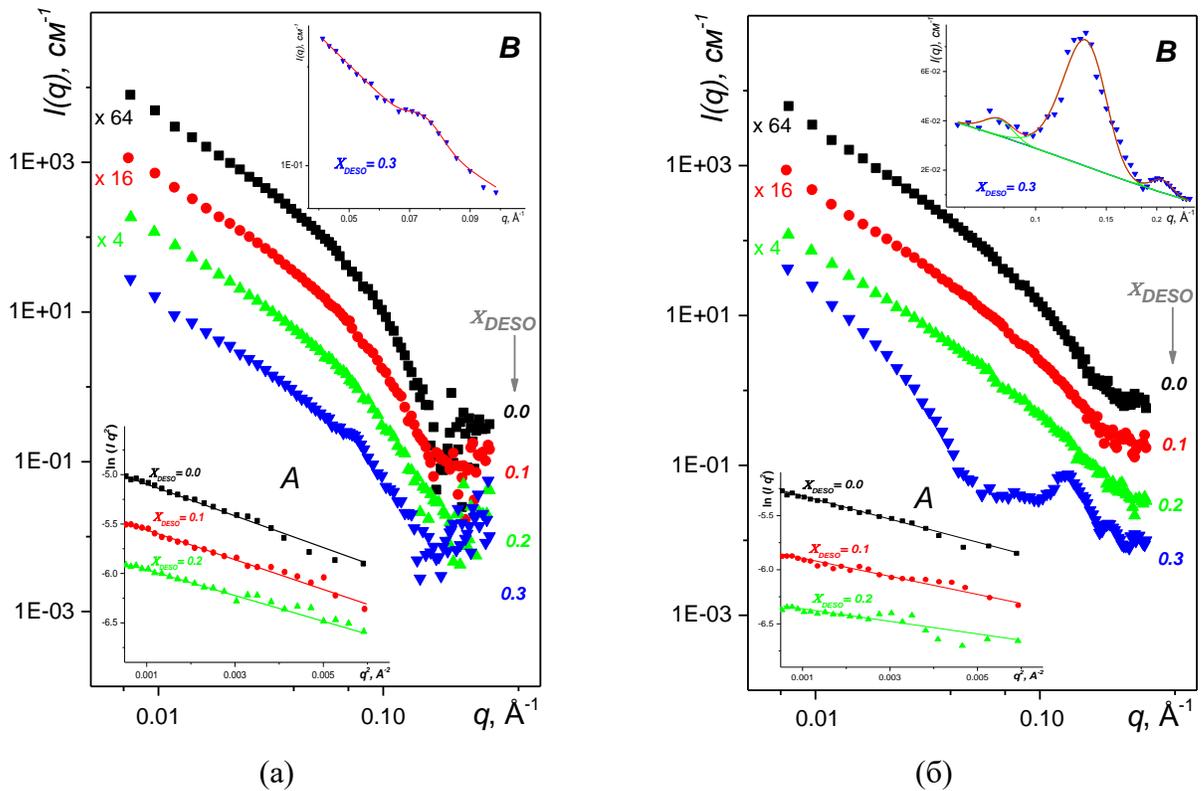


Рис.4.9. Кривые МУРН для ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в L_{β} (а) и L_{α} (б) фазах при $X_{DES0} = 0.0$ (■); 0.1 (●); 0.2 (▲) and 0.3 (▼).

Подобное уменьшение толщины липидного бислоя в диапазоне $0.0 \leq X_{\text{ДЭСО}} \leq 0.2$ с 41.2 Å до 34.1 Å в L_{β} фазе и с 36.2 Å до 27.5 Å в L_{α} фазе означает, что молекулы ДЭСО сильно связаны с полярной головой липидных молекул. Следует отметить, что подобного эффекта влияния ДМСО на толщину липидного бислоя обнаружено не было. Это означает, что добавление двух CH_2 групп существенно изменяет межмембранные взаимодействия и причиной этого являются гидрофобные взаимодействия.

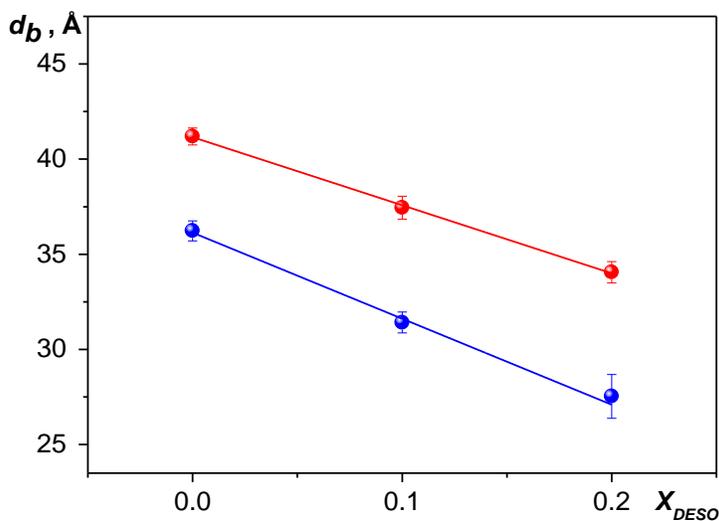


Рис.4.10. Зависимость толщины липидного бислоя ОСВ ДМФХ от мольной доли ДЭСО в L_{β} (красные символы) и L_{α} (синие символы) фазах.

Дальнейшее увеличение мольной доли ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.3$) приводит к образованию МСВ. Стоит отметить, что данные, представленные на Рис. 4.9. и 4.10., соответствуют свежеприготовленным системам. На более длительном интервале времени (более одного часа) ОСВ в присутствии мольной доли ДЭСО 0.2 также подвержены слиянию. Проведенный сравнительный анализ приготовленных и образованных из ОСВ мультислойных везикул указывает на увеличение T_m на 4.7 °С для МСВ, образованных из ОСВ. Период повторяемости так же больше для этой системы во всем диапазоне исследуемых температур (Рис.4.11). Можно выделить три характерные области в зависимости периода повторяемости мультислойных структур от температуры: (1) область I (выделено желтым) соответствует гелевой фазе для обеих систем, а разница величин d определена как 4 Å; (2) переходная область II между L_{β} и L_{α} фазами указывает на уменьшение периода повторяемости ДМФХ мембран с 59.5 (2) Å до 53.1(1) Å и с 55.5(1) Å до 47.6(1) Å для спонтанно образованных и приготовленных МСВ, соответственно; (3) область III (выделено зеленым) – жидкокристаллическая фаза, а разница в определении периодов повторяемостей составляет

5.6 Å. Экстраполяция экспериментальных данных (синяя линия) дает значение $d = 41.6$ Å при $T = 55$ °C для приготовленных МСВ.

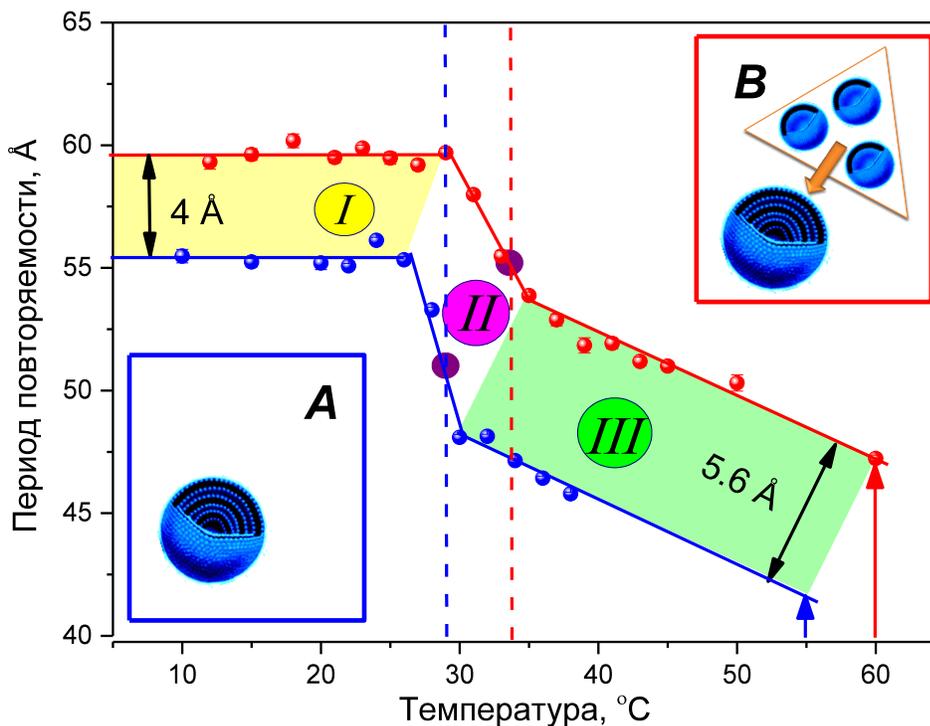


Рис.4.11. Зависимость периода повторяемости МСВ ДМФХ (2 мас.%) в растворе ДЭСО/D₂O при $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ от температуры. Синие круги соответствуют приготовленным МСВ (вставка А), красные круги – МСВ, спонтанно образованные из ОСВ (вставка В). Красная и синяя пунктирные вертикальные линии указывают температуры основных фазовых переходов для соответствующих систем.

Предполагая, что толщина мембран будет одинаковой в обоих случаях и равна 34.1 Å в L_{β} фазе при $T = 12$ °C и 27.5 Å в L_{α} фазе при $T = 55$ °C, можно вычислить расстояние между двумя соседними мембранными слоями. Результаты, представленные в Таблице 4.3., указывают на уменьшение толщины растворителя с ростом температуры для обеих систем: 7.3 Å для приготовленных МСВ и 5.7 Å для МСВ, образованных из ОСВ.

Таблица 4.3. Структурные параметры для приготовленных и спонтанно образованных МСВ ДМФХ (2 мас.%) при $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ в гелевой L_{β} фазе при $T = 12$ °C и ЖК L_{α} фазе при $T = 55$ °C.

	Гелевая фаза			Жидкокристаллическая фаза		
	$d(\text{Å})$	$d_b(\text{Å})$	$d_s(\text{Å})$	$d(\text{Å})$	$d_b(\text{Å})$	$d_s(\text{Å})$
Приготовленные МСВ	55.5(1)	34.1(3)	21.4(2)	41.6(1)	27.5(3)	14.1(2)
Спонтанно образованные МСВ	59.5(2)	34.1(3)	25.4(3)	47.2(1)	27.5(3)	19.7(2)

Взаимодействие сульфоксид-липид

В работе [134] показано, взаимодействие ДМСО и ДЭСО с мембранами ДПФХ одинаково: низкая концентрация сульфоксидов (20 мас.%) вызывает частичную дегидратацию липидного бислоя липосом ДПФХ и одновременное изменение структуры воды, при высоких концентрациях ДЭСО и ДМСО (≥ 40 мас.%) сульфоксиды взаимодействуют непосредственно с поверхностью липидной мембраны. Уместно предположить, что ДЭСО, заменяя гидратационную воду, может связываться с гидрофильной головой ФХ молекул, как и ДМСО [136], в двух конфигурациях: ① атом серы молекулы ДЭСО связывается с кислородом фосфатной группы липидной молекулы, ② атом кислорода молекулы ДЭСО взаимодействует с водородом холиновой группы, как схематично представлено ниже.



Присутствие ДМСО (2-7.5 мольных %) в растворе ДМСО/вода вызывает уменьшение угла между плоскостью бислоя и вектором P^-N^+ (β), замена воды на ДМСО (10-20 мольных %) приводит к постепенному разрушению сольватационной оболочки головной группы ДПФХ молекул и вектор P^-N^+ параллелен плоскости мембраны в гелевой фазе, как было показано методом измерения поверхностных сил [170]. Этим обусловлено уменьшение толщины липидного бислоя, полученное из данных МУРН для ДМФХ-d54 в гелевой фазе (Рис.4.2 (б)). В ЖК фазе для той же системы влияния ДМСО на величину d_b не выявлено до $X_{\text{ДМСО}} = 0.431$ для свежеприготовленных ОСВ. Это означает, что изменения направления P^-N^+ диполя в жидкокристаллической фазе не происходит. Объяснение подобного факта состоит в том, что молекулы ДМСО не сильно адсорбируются на головных группах ФХ молекул [176] и не постоянно замещают гидратационную воду [136], и с увеличением температуры связь между молекулами ДМСО и липида ослабевают. Анализ влияния ДЭСО на толщину липидного бислоя (Рис.4.10) указывает на линейное уменьшение величины d_b

как в гелевой, так и в ЖК фазе. Так, добавление ДЭСО с мольной долей 0.2 приводит к существенному уменьшению толщины липидного бислоя на $7.1/8.7 \text{ \AA}$ в L_{β}/L_{α} фазе, что может быть следствием как большего наклона $P^{-}N^{+}$ диполя в сторону межмебранного пространства, так и/или конформационными изменениями ФХ молекул.

Фазовые переходы МСВ ДМФХ в присутствии сульфоксидов

Для исследования фазовых состояний МСВ ДМФХ в присутствии сульфоксидов были выбраны системы ДМФХ/ДМСО/ H_2O с мольной долей ДМСО или ДЭСО в растворе сульфоксид/вода $X = 0.2$ [177]. Изменение спектров МУРН в диапазоне температур $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \leq T \leq 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ для МСВ ДМФХ с массовыми долями 2 и 20 мас.% в растворе ДЭСО/ D_2O при $X_{ДЭСО} = 0.2$ представлено на Рис. 4.12 (а) и (б) соответственно. Снижение липидной фракции образцов привело к уменьшению интенсивности кривых рассеяния для МСВ ДМФХ (2 мас.%). Поведение фазовых переходов аналогично в обоих случаях и основной фазовый переход происходит при одной и той же температуре ($\sim 28.6(3) \text{ }^{\circ}\text{C}$). Это означает, что увеличение концентрации липида до $C_l \leq 20 \text{ мас.}\%$ для МСВ ДМФХ в присутствии ДЭСО не влияет на величину T_m , как и для ФХ мембран в избытке воды [17].

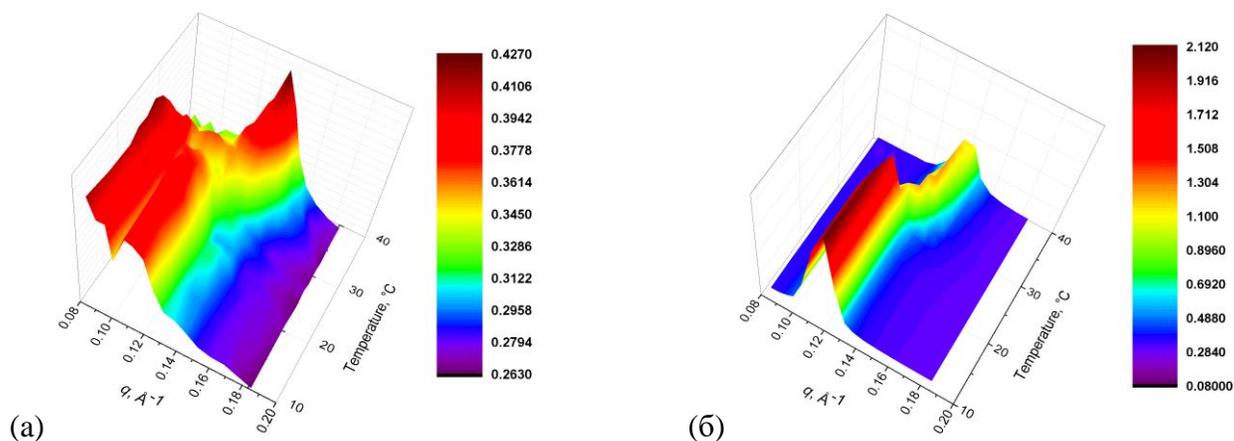


Рис.4.12. Изменение кривых МУРН для приготовленных МСВ ДМФХ с массовыми долями 2 мас.% (а) и 20 мас.% (б) в растворе ДЭСО/ D_2O при $X_{ДЭСО} = 0.2$. Справа от графиков изображены шкалы интенсивностей.

Значения T_m были определены из построения зависимости периода повторяемости МСВ ДМФХ от температуры (Рис. 4.12) двумя способами: (1) аппроксимация экспериментальных данных функцией Больцмана; (2) анализ зависимости первой производной dd/dT от температуры (вставки на Рис. 4.13). Получены следующие результаты: переход из гелевой в жидкокристаллическую фазу наблюдается при $T_m = 28.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ для $C_l = 2 \text{ мас.}\%$; увеличение

концентрации липида не изменяет температуру основного фазового перехода в пределах экспериментальных ошибок, переход происходит при $T_m = 28.4$ °C для $C_l = 20$ мас.%, что хорошо согласуется с данными ДСК для ДМФХ (20 мас.%) [134]. Однако увеличение массовой доли липида приводит к уменьшению периода повторяемости как в гелевой фазе ($d = 55.5(4)$ Å для $C_l = 2$ мас.% и $d = 53.8(2)$ Å для $C_l = 20$ мас.%), так и в ЖК фазе (например, при $T = 37$ °C $d = 45.8(3)$ Å для $C_l = 2$ мас.% и $d = 44.8(2)$ Å для $C_l = 20$ мас.%).

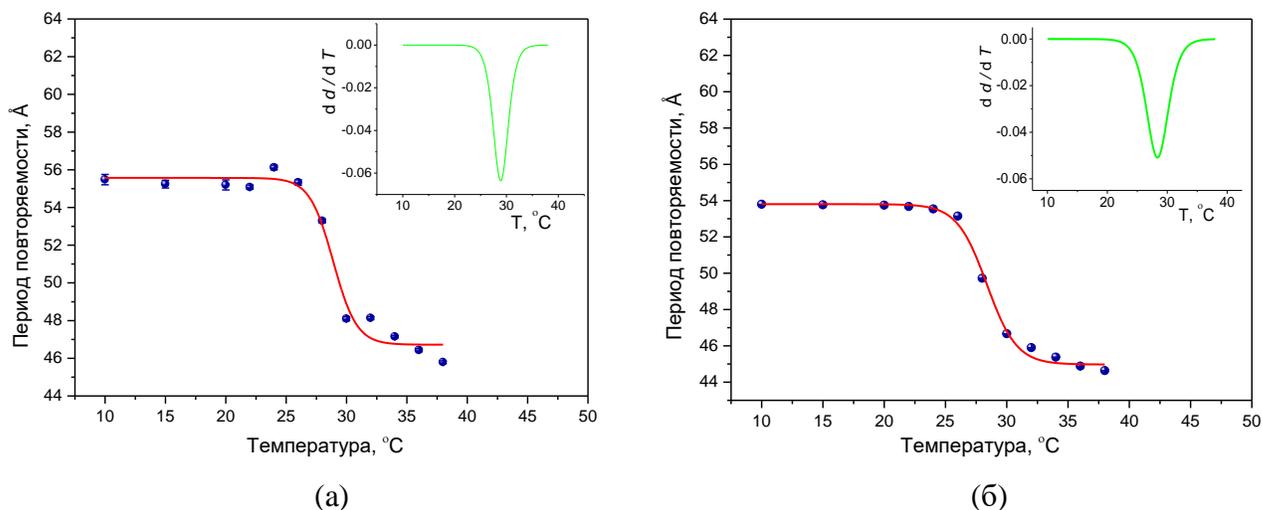


Рис.4.13. Изменение периода повторяемости МСВ ДМФХ с массовыми долями (а) 2 мас.% и (б) 20 мас.% в ДЭСО/D₂O при $X_{ДЭСО} = 0.2$ с ростом температуры. Точки – экспериментальный данные, линии – аппроксимация функцией Больцмана (2.26). На вставках изображены зависимости первой производной dd/dT от температуры.

Спонтанно сформированные МСВ

Как показывают экспериментальные данные, МСВ могут образовываться спонтанно из ОСВ в присутствии сульфоксидов [171]. В этом параграфе будут приведены результаты для МСВ ДМФХ (2 мас.%), спонтанно сформированных из экструдированных ОСВ в растворе сульфоксид/вода (ДМСО/D₂O и ДЭСО/D₂O) при $X = 0.2$. Изменение спектров МУРН с ростом температуры показаны на Рис. 4.14 для $X_{ДМСО} = 0.2$ (а) и $X_{ДЭСО} = 0.2$ (б).

Ясно, что оба сульфоксида индуцируют повышение температуры основного фазового перехода. При этом наблюдается исчезновение перехода $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$, как в случае ДМСО, так и в случае ДЭСО. Кроме того, из зависимости периода повторяемости МСВ ДМФХ от температуры (Рис. 4.15) отчетливо видно, что в присутствии ДМСО ($X_{ДМСО} = 0.2$) основной фазовый переход происходит в узком температурном диапазоне. Он начинается при $T = 28$ °C и заканчивается при $T = 42$ °C, тогда как для МСВ, растворенных в ДЭСО/D₂O, этот переход наблюдается в температурном диапазоне 20.6 °C $\leq T \leq 47.3$ °C. Указанные диапазоны

температур получены из анализа зависимости первой производной dd/dT от T (Рис. 4.15, вставки) при $dd/dT = 0$. Температуры перехода $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ вычислялись, как описано в предыдущем разделе, получены следующие значения: $T_m = 35.2$ °С для МСВ ДМФХ в растворе ДМСО/D₂O и $T_m = 33.6$ °С для МСВ ДМФХ в растворе ДЭСО/D₂O. Следует отметить, что температуры основных фазовых переходов выше на ~ 4.6 °С в случае спонтанного формирования МСВ из экструдированных ОСВ, чем для приготовленных МСВ.

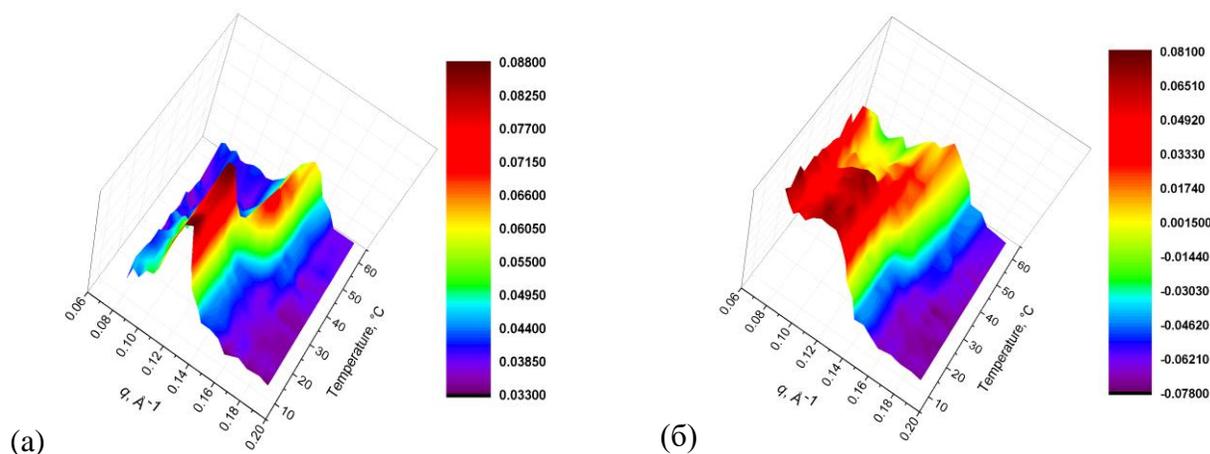


Рис.4.14. Спектры МУРН при различных температурах для МСВ ДМФХ (2 мас.%), образованных спонтанно из ОСВ, в растворах ДМСО/D₂O при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ (а) и в ДЭСО/D₂O при $X_{\text{ДЕСО}} = 0.2$ (б). Справа от графиков указаны шкалы интенсивностей.

Анализ зависимости периода повторяемости от температуры для спонтанных МСВ ДМФХ в растворе сульфоксид/вода проводился в широком диапазоне температур от 10 до 60 °С. Экспериментальные данные (точки) с подгонками по МНК функцией Больцмана (линии) представлены на Рис. 4.14 для МСВ ДМФХ (2 мас.%) в ДМСО/D₂O при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ и в ДЭСО/D₂O при $X_{\text{ДЕСО}} = 0.2$. В гелевой фазе период повторяемости равен 57.5(4) Å для системы ДМФХ/ДМСО/D₂O. Средняя величина d составляет 59.5(3) Å для спонтанных МСВ ДМФХ, растворенных в ДЭСО/D₂O. Разница значений периодов повторения в ЖК фазе значительно больше. Например, $d = 45.0(2)$ Å и $d = 50.3(1)$ Å при $T = 50$ °С для МСВ ДМФХ в ДМСО/D₂O и ДЭСО/D₂O, соответственно.

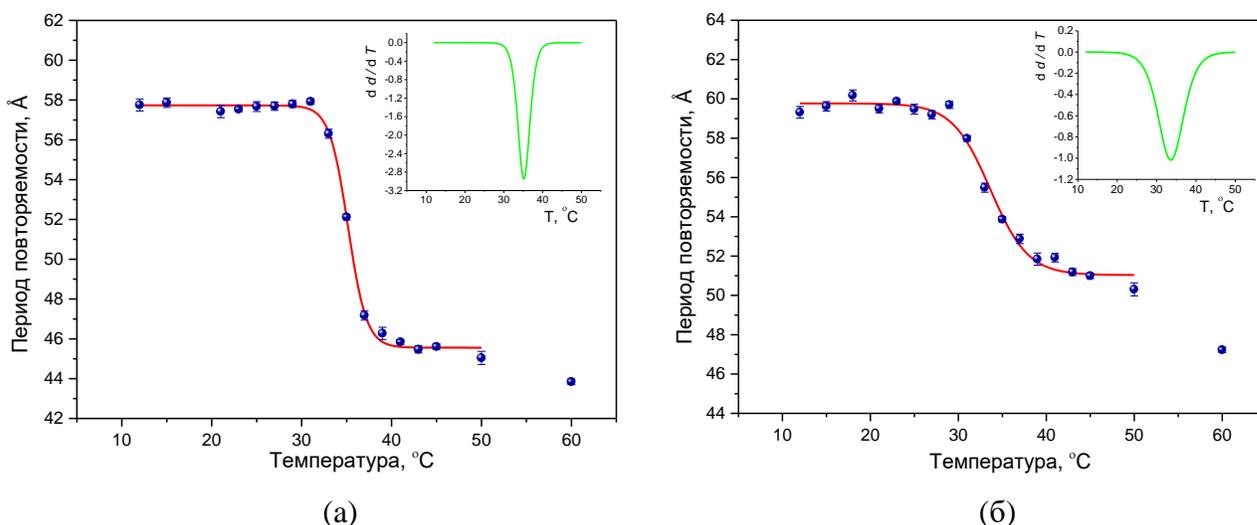


Рис.4.15. Изменение периода повторяемости для спонтанно образованных МСВ ДМФХ (2 мас.%) в растворах ДМСО/ D_2O при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ (а) и ДЭСО/ D_2O при $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ (б). Точки – экспериментальные данные, линии – аппроксимация функцией Больцмана (2.26). На вставках изображены зависимости первой производной dd/dT от температуры.

4.2. Слипание однослойных везикул

Как было показано в разделе 4.1, однослойные везикулы ДМФХ сливаются в присутствии ДМСО. Для свежеприготовленных ОСВ ДМФХ (2 мас.%) мольная доля ДМСО в растворе ДМСО/ D_2O , при которой наблюдалось слияние, составляет 0.431 (Рис. 4.1 (б)). Процесс слияния мембран сопровождается формированием пор (II стадия, Рис. 1.14), через которые могут проникать большие молекулы или наночастицы, что делает изучение этого процесса весьма интересным с точки зрения применения полученных знаний для направленного слияния живых клеток *in vitro* в биомедицине и биотехнологии. Слияние мембран в присутствии ДМСО является результатом образования пор, в результате чего повышается проницаемость мембран [137] и уменьшается их жесткость [138]. ДМСО является токсичным для живых клеток, а степень токсичности зависит от его концентрации и температуры биологической среды [178]. Диэтилсульфоксид менее токсичен, чем диметилсульфоксид и глицерин, например, для *E. coli* [141].

Для выявления минимальных концентраций сульфоксидов, при которых происходит слияние мембран, были исследованы две системы однослойных везикул ДМФХ (2 мас.%): (1) концентрация сульфоксидов одинакова внутри и вне ОСВ, (2) сульфоксиды добавлены к ОСВ ДМФХ, приготовленным в воде. В настоящем разделе так же будут представлены результаты исследования влияния времени на данный процесс при заданных мольных долях сульфоксидов.

ОСВ ДМФХ в смеси сульфоксид/вода

Полностью гидратированные ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в растворе сульфоксид/вода приготовлены в соответствии с процедурой, описанной в Главе 2 «Материалы и методы». Мольные доли сульфоксидов в смеси сульфоксид/вода варьировались в диапазоне от 0 до 0.5. Экспериментальные данные для ДМФХ-d54 (2 мас.%) в растворе ДМСО/H₂O и для ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в растворе ДЭСО/D₂O, представленные на Рис. 4.1 и Рис. 4.9, соответственно, свидетельствуют о том, что слияние однослойных везикул происходит при меньших мольных долях ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.3$), чем ДМСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.431$) в обеих L_{β} и L_{α} фазах. Кроме того, изучен процесс слияния мембран при меньших концентрациях во времени. С этой целью измерения методом МУРН проводились четыре раза для каждого образца: через 0, 1/2, 1 и 24 часа после подготовки образцов в гелевой и жидкокристаллической фазах. Оказалось, что ОСВ ДМФХ в растворах ДМСО/D₂O и ДЭСО/D₂O стабильны в течение длительного времени только при мольной доле ДМСО и ДЭСО ≤ 0.1 . При увеличении мольной доли сульфоксидов в смеси сульфоксид/вода наблюдалось слияние мембран. Так, для ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в ДМСО/D₂O этот процесс происходит в течение 1 часа после приготовления образцов. Структурные изменения – переход однослойных везикул в мультислойные – характеризуются изменением кривых МУРН. Появление дифракционного пика в области q около 0.1 \AA^{-1} , как представлено на Рис. 4.16, свидетельствует о формировании мультислойной структуры. Для лучшей визуализации данные показаны в представлении Кратки-Порода ($\ln I(q)q^2$ от q^2) для ОСВ (Рис. 4.15, А) и в двойном логарифмическом масштабе ($I(q)$ от q) для МСВ (Рис. 4.15, В).

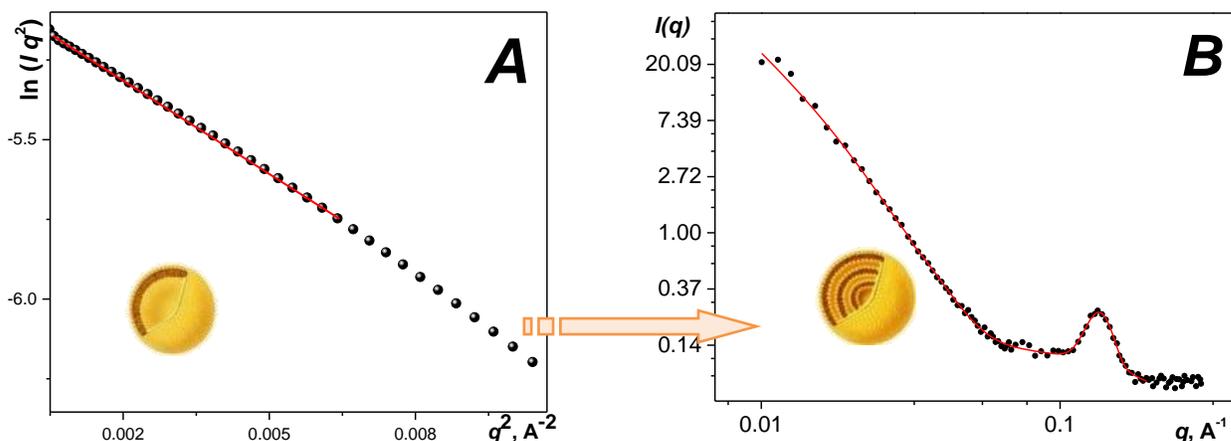


Рис.4.16. Изменение кривых МУРН для ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в растворе ДМСО/D₂O при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ в ЖК фазе ($T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$) после приготовления (А) и через 1 час (В).

Поскольку мультислойные мембраны сформированы из однослойных везикул, то при аппроксимации экспериментальных данных необходимо учитывать, как рассеяние от ОСВ, так и от МСВ. Оба вклада: рассеяние от ОСВ в области малых q и рассеяние от МСВ с $d = 46.5(4) \text{ \AA}$ учтены в уравнение (2.23). Аппроксимирующая кривая соответствует красной линии на Рис. 4.16, В. Формирование МСВ характерно и для экструдированных ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в ДЭСО/D₂O при $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$. Однако этот процесс происходит быстрее: хорошо упорядоченная многослойная система наблюдалась уже через 30 мин после приготовления образца (Рис. 4.17). Образованные мультислойные структуры стабильны длительное время, о чем свидетельствуют спектры МУРН, полученные через сутки после приготовления образцов. Так, например, аппроксимация дифракционных пиков функцией Гаусса (зеленая и синяя линии на Рис. 4.17) дает период повторяемости для спонтанно сформированных МСВ ДМФХ при $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ в жидкокристаллической фазе $d = 47.2(2) \text{ \AA}$ и $d = 47.7(3) \text{ \AA}$ через 1/2 часа и 1 день после подготовки образцов, соответственно.

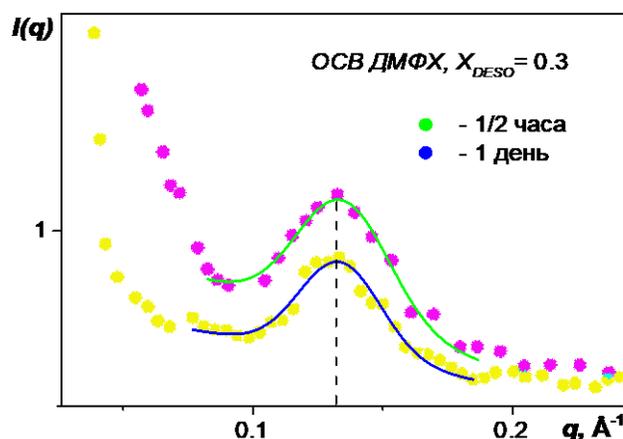


Рис.4.17. Кривые МУРН в области дифракционного пика для ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в растворе ДЭСО/D₂O при $X_{\text{ДЭСО}} = 0.3$ в ЖК фазе ($T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$) после 1/2 часа и 1 дня относительно приготовления образцов.

Переход от мольных долей к объемным концентрациям: $X_{\text{ДЭСО}} = 0.3$ соответствует $V_{\text{ДЭСО}} = 340$ мкл и $X_{\text{ДМСО}} = 0.431$ соответствует $V_{\text{ДМСО}} = 366$ мкл в общем объеме растворителя сульфоксид/вода 490 мкл, указывает на то, что слияние ОСВ происходит при меньших концентрациях ДЭСО, чем ДМСО в смеси сульфоксид/вода.

Подводя итог вышесказанному, можно отметить, что процесс слияния мембран в присутствии сульфоксидов зависит от двух факторов: концентрации сульфоксидов и времени. Оба фактора проявляют свое действие раньше (и по концентрации, и по времени) при замене ДМСО на ДЭСО в растворе сульфоксид/вода.

ОСВ ДМФХ в воде с добавлением сульфоксидов

Наибольший интерес для изучения слияния мембран представляет система, когда сульфоксид добавлен к однослойным везикулам в воде/физиологическом растворе. С этой целью были приготовлены ОСВ ДМФХ в D₂O, после их стабилизации (~12 часов) добавлен диметилсульфоксид или диэтилсульфоксид с заданной мольной долей (0.1 и 0.2). Спектры МУРН снимались через 5, 45, 125 и 165 минут после добавления сульфоксидов. Конечная концентрация липида для всех образцов составляла 2 мас.%. Из представленных данных на Рис. 4.18(а–г) следует, что структура ОСВ изменяется при добавлении сульфоксидов. Анализ экспериментальных данных проведен с помощью уравнений (2.18) для начальной системы и (2.23) для кривых, полученных при добавлении сульфоксидов.

В случае ДМСО образование мультислойных структур, о чем свидетельствует дифракционный пик в области $q \approx 0.1 \text{ \AA}^{-1}$, происходит в течение первых пяти минут (минимальное время, обусловленное техническими аспектами проведения эксперимента) после добавления диметилсульфоксида. Кривые МУРН не изменяются со временем для исследуемых мольных долей ДМСО. Период повторяемости составляет 62.2(2) Å для $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$. Это значение близко к 60.6(1) Å, которое было получено для МСВ ДМФХ (1 мас.%) в D₂O (Таблица 3.2). При добавлении ДМСО с $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ из ОСВ ДМФХ (2 мас.%) образуется мультислойная структура с $d = 51.5(2) \text{ \AA}$. Это значение на 7 Å больше, чем было определено ранее для спонтанно образованных МСВ при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ (Рис. 4.15).

Количество слоев (N) может быть определено как $N = \xi/d$, где $\xi = 2\pi/w$. При ширине пика на полувысоте $w = 0.046(4)$ при $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$ и $w = 0.060(6)$ при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ количество слоев, от которых наблюдается дифракционный пик равно двум. Принимая так же во внимание тот факт, что концентрация ДМСО не влияет на толщину липидного бислоя (Рис. 4.2(б)) и для ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в D₂O $d_b = 36.2 \text{ \AA}$ в L_α фазе, можно вычислить межмембранные расстояния: $d_s = 26 \text{ \AA}$ при $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$ и $d_s = 15.3 \text{ \AA}$ при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$. Эти значения сравнимы с межмембранными расстояниями, полученными для системы ДМФХ-d54/ДМСО/D₂O (Рис. 4.2(в)). Таким образом, приведенные выше рассуждения свидетельствуют о переходе ОСВ в МСВ путем слияния однослойных везикул, индуцируемого добавлением диметилсульфоксида.

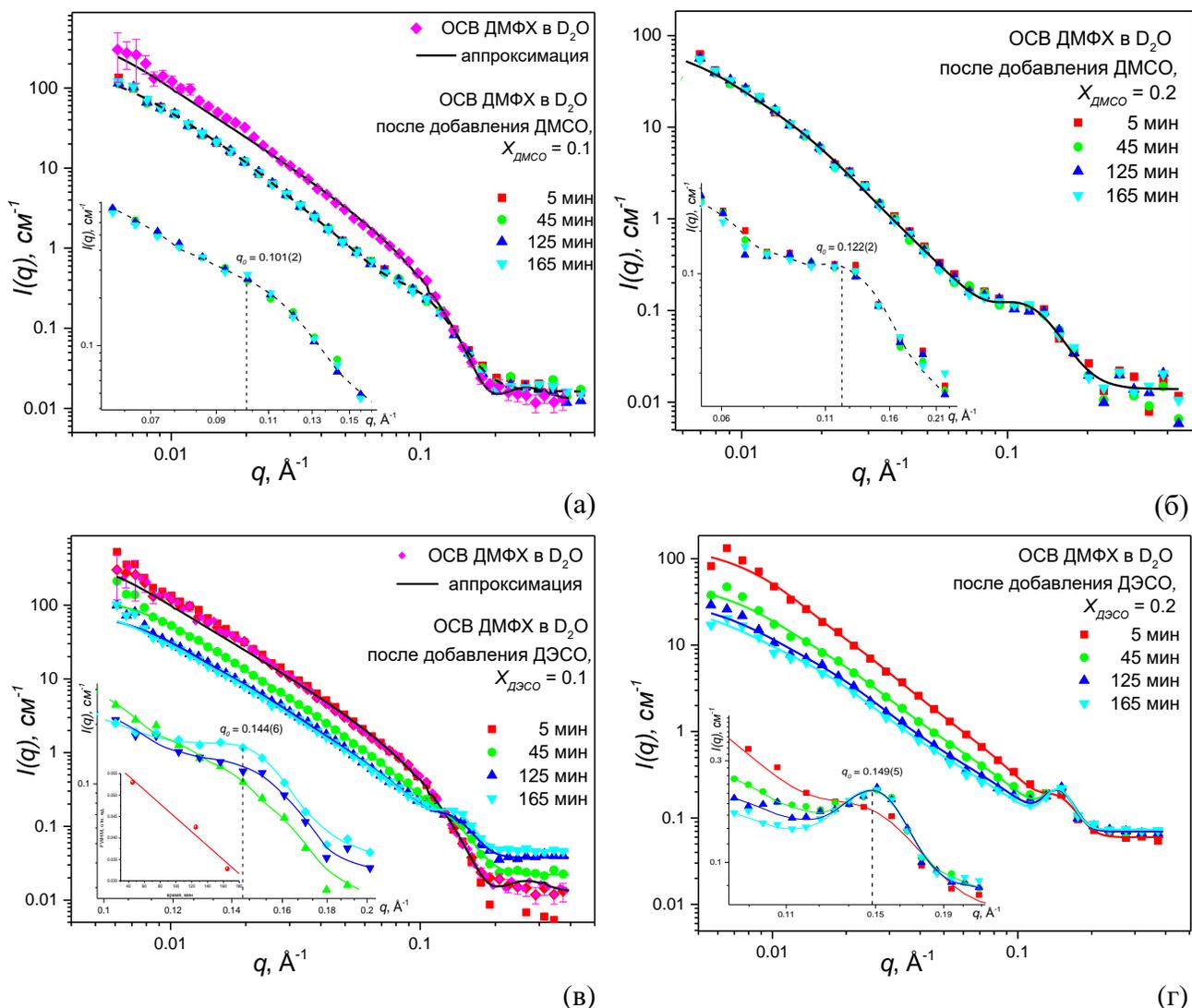


Рис.4.18. Динамика перехода ОСВ ДМФХ, приготовленных в D_2O , в МСВ при добавлении сульфоксидов ДМСО и ДЭСО: (а) $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$, (б) $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$, (в) $X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$, (г) $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$.

Процесс образования МСВ из ОСВ ДМФХ так же наблюдается и при добавлении ДЭСО к ОСВ ДМФХ и характеризуется постепенным образованием мультислойных структур. Так толщина липидного бислоя не изменяется за интервал времени 5-15 мин; формирование МСВ наблюдается спустя 45 мин после добавления ДЭСО с мольной долей 0.1. Период повторяемости для такой системы составляет $43.6(2) \text{ \AA}$ и эта величина остается постоянной во временном интервале 45-165 мин, в то время как количество самих слоев увеличивается с 2 до 4. Толщина липидного бислоя при этом уменьшается: $37.5(2) \text{ \AA}$, $37.1(3) \text{ \AA}$, $30.5(3) \text{ \AA}$ и $27.3(2) \text{ \AA}$. Увеличение мольной доли сульфоксида до $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ приводит к образованию МСВ с $d = 42.1(2) \text{ \AA}$ уже в первые пять минут после добавления ДЭСО. Это значение очень близко к $41.6(1) \text{ \AA}$, что соответствует периоду повторяемости для приготовленных МСВ

ДМФХ (2 мас.%) в ДЭСО/D₂O (Таблица 4.3.) Количество слоев в образованной мультислойной структуре растет от 3 до 5 в исследуемом временном диапазоне. После 165 мин никаких структурных изменений в ЖК фазе не наблюдалось для обеих систем.

После 3-х часов, когда были получены стабильные структуры, проведены температурные исследования: охлаждение от 55 до 10 °С и нагрев до 55 °С. Оказалось, что мультислойная структура сохраняется при добавлении ДМСО с мольной долей 0.1, ДМСО или ДЭСО с мольной долей 0.2. Зависимости периодов повторяемости от температуры для спонтанно образованных МСВ из ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в D₂O после добавления ДМСО ($X_{\text{ДМСО}} = 0.2$) и ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$) представлены на Рис.4.18(а,б). Как следует из данных, в присутствии ДМСО с мольной долей 0.2 переход $P_{\beta'} \leftrightarrow L_{\beta'}$ исчезает (Рис.4.19(а)), как и для приготовленных МСВ или полученных из ОСВ ДМФХ в растворе ДМСО/D₂O. Основной фазовый переход происходит в диапазоне температур 30-35 °С, что немного меньше, чем было определено для спонтанно образованных МСВ из ОСВ ($T_m = 35.2$ °С, нагрев), но больше, чем 30.6 °С/29.5 °С (нагревание/охлаждение). Присутствие ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$) в системе ДМФХ/ДЭСО/D₂O так же приводит к исчезновению риппл фазы при нагревании (Рис.4.19(б)). Температура основного фазового перехода составляет 31.0(1) °С, что так же находится между $T_m = 33.6$ °С для образованных из ОСВ и $T_m = 28.9$ °С для приготовленных МСВ ДМФХ в растворе ДЭСО/D₂O. Зависимость $d(T)$ при охлаждении указывает на то, что в области температур 55-35 °С МСВ находятся в ЖК фазе и в области температур 15-10 °С в гелевой фазе. Значения периодов повторяемости в температурном диапазоне от 30 до 20 °С свидетельствуют о наличии промежуточной риппл фазы, которая так же характерна для ДМФХ в ДЭСО/вода при $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ в процессе охлаждения [134].

Наибольший интерес вызывает поведение стабилизированных при 55 °С ОСВ ДМФХ после добавления ДЭСО с мольной долей 0.1. Первоначально в ЖК фазе формируется стабильная мультислойная структура, однако, в отличие от рассмотренных выше систем, МСВ при охлаждении-нагревании разрушаются и образуются ОСВ. Оказалось, что переход МСВ → ОСВ происходит в температурном диапазоне 25-20 °С, как представлено на Рис. 4.20(а), где экспериментальные данные изображены точками, а аппроксимирующие кривые линиями. Для температурного диапазона 55-25°С использовано уравнение (2.23) и для всех остальных температур уравнение (2.18). Полученные структурные параметры представлены на Рис. 4.20(б).

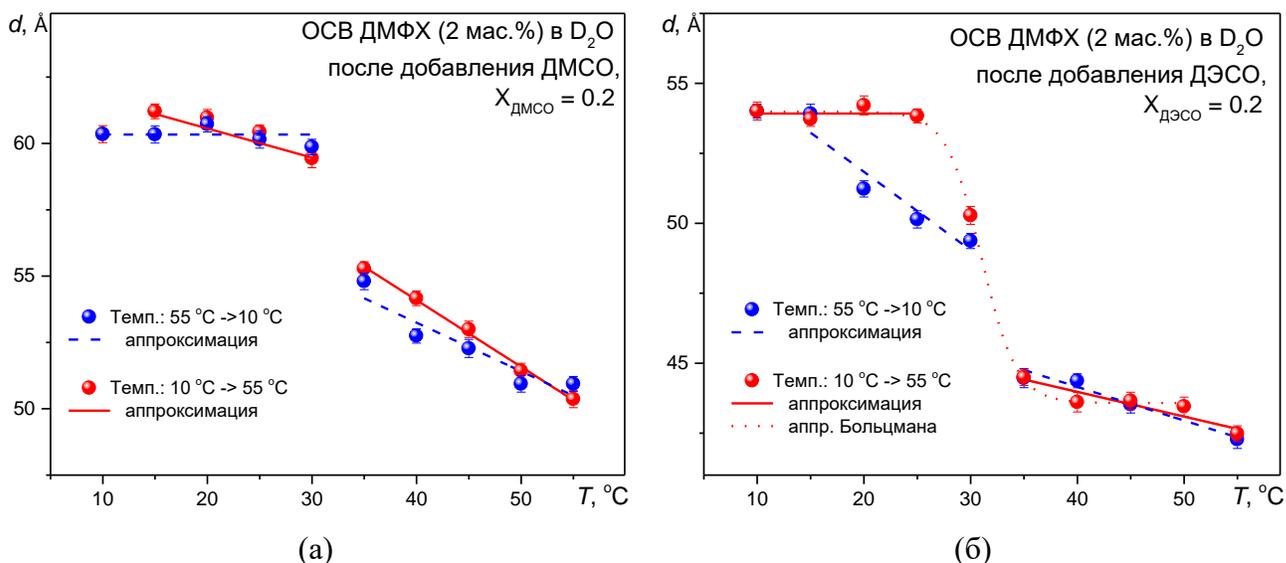


Рис.4.19. Изменение периода повторяемости для спонтанно образованных МСВ из ОСВ ДМФХ (2 мас.%) в D_2O после добавления ДМСО, $X_{DMSO} = 0.2$ (а) и ДЭСО, $X_{D_3SO} = 0.2$ (б).

Известно, что для ОСВ ДМФХ в H_2O переход $L_\alpha \rightarrow L_\beta$ происходит при 23.4 °C, а в присутствии ДЭСО с $X_{D_3SO} = 0.1$ температура основного фазового перехода возрастает до 24.1 °C [134]. Для исследуемой системы величина T'_m определена как 24.8(9) °C из аппроксимации функцией Больцмана зависимости толщины липидного бислоя от температуры (Рис. 4.20(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 $X_{D_3SO} = 0.1$).

фазе. Подобного эффекта не было обнаружено для ДМФХ мембран при добавлении ДЭСО с мольной долей 0.2. Сформированные МСВ стабильны во всем диапазоне исследованных температур, как при переходе $L_\alpha \rightarrow L_\beta$, так и при переходе $L_\beta \rightarrow L_\alpha$. При объяснении подобного различия в поведении двух систем при различных мольных долях следует обратить внимание и на тот факт, что при низких концентрациях сульфоксидов (20 мас.%) наблюдается частичная дегидратация липидного слоя с одновременным изменением структуры воды, в то время как при высоких концентрациях ДЭСО и ДМСО (≥ 40 мас.%) сульфоксиды взаимодействуют непосредственно с липидной поверхностью [134], и как было показано ранее методом вариации контраста (Рис.4.3 и пояснения в тексте), приводя к полной дегидратации липидного бислоя. Таким образом, уместно предположить, что при $X_{ДЭСО} = 0.2$, когда добавленный ДЭСО составляет $\sim 60\%$ от конечного объема ДЭСО/D₂O, формируется достаточно прочный комплекс ДЭСО-липид и изменение фазового состояния не оказывает на него никакого воздействия в отличие от системы, когда добавлено менее 40 % сульфоксида, как в случае $X_{ДЭСО} = 0.1$. В случае добавления ДМСО так же формируются стабильные мультислойные структуры путем слияния ОСВ с межмембранным расстоянием $d_s = 27 \text{ \AA}$ при $X_{ДМСО} = 0.1$ и $d_s = 16.3 \text{ \AA}$ при $X_{ДМСО} = 0.2$.

4.3. Выводы к главе 4

Методом малоуглового рассеяния нейтронов определены структурные параметры ДМФХ мембран в присутствии диметилсульфоксида и диэтилсульфоксида в диапазоне мольных долей (X) от 0 до 1 в растворе сульфоксид/вода. Показано, что период повторяемости d мультислойных мембран уменьшается с ростом X , и при $X_{\text{ДМСО}} = 0.8$ формируется фаза с взаимным проникновением углеводородных хвостов. 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. Линейное уменьшение толщины однослойных везикул ДМФХ было обнаружено в диапазоне мольных долей 0-0.2 ДЭСО в растворе ДЭСО/D₂O в L_{α} и $L_{\beta'}$ фазах. Причиной подобного влияния сульфоксидов на толщину липидного бислоя является увеличение роли гидрофобных взаимодействий в случае ДЭСО. 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.

Использование дейтерированного ДМСО и метод вариации контраста по воде позволили впервые определить количество молекул ДМСО, сильно связанных с мембраной при $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$. Их число равно 3.65, а общий объем таких молекул 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 $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ приводит к полной дегидратации мембраной поверхности.

Сульфоксиды увеличивают температуру основного фазового перехода ФХ мембран. Определено, что зависимость T_m от $X_{\text{ДЭСО}}$ носит экспоненциальный характер, существенного увеличения T_m при полной замене воды на диэтилсульфоксид, как это имеет место в случае $X_{\text{ДМСО}} = 1$, не обнаружено. При мольных долях обоих сульфоксидов ≥ 0.2 происходит структуризация гелевой фазы МСВ ДМФХ, о чем свидетельствует исчезновение риппл фазы.

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. Оба фактора, индуцирующие слияние мембран, проявляют свое действие раньше (и по концентрации, и по времени) при замене ДМСО на ДЭСО в растворе сульфоксид/вода. 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 $X_{\text{ДМСО}}$ 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате исследования фазовых переходов ФХ мембран установлено, что уже незначительное содержание ионов кальция (0.1 мМ) в растворе $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 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 $L_{\beta'}$ 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. 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 $T = 15^\circ\text{C}$ и $2.6 \cdot 10^{-2} \text{ Кл/м}^2$ при $T = 55^\circ\text{C}$, изменение энергии Гиббса составляет -7.4 кДж/моль в $L_{\beta'}$ 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.

4. 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 .
5. 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/D₂O 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.
6. Сравнительный анализ влияния ДЭСО и ДМСО на структуру и свойства липидных мембран позволил сделать вывод о важности гидрофобных взаимодействий при взаимодействии ДЭСО -липид.
7. Спонтанные процессы МСВ \rightarrow ОСВ в присутствии ионов Ca^{2+} и ОСВ \rightarrow 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 ОСВ \rightarrow МСВ в ЖК фазе и МСВ \rightarrow ОСВ в области фазового перехода $L_{\alpha} \rightarrow L_{\beta}$, соответствует ОСВ ДМФХ в D₂O при добавлении ДЭСО ($X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$) в ЖК фазе.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярные структуры и функции. Издательство «Мир» 1997
2. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия, М.: Просвещение, 1987. —816 с.
2. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия, М.: Просвещение, 1987. —816 с.
3. Рубин А.Б. Биофизика. В 2 т. М.: Высшая школа, 1987, Т. 2. —303 с.
4. Luzzati V., X-ray diffraction studies of lipid-water systems. – In: Biological Membranes. (ed. Chapman D.), London: Academic Press, 1968, —pp. 71–123.
5. Gruner Sol M., Lipid Polymorphism: The Molecular Basis of Nonbilayer Phases, *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, 1985, 14: 211–238. DOI: 10.1146/annurev.bb.14.060185.001235
6. Tanford C., The Hydrophobic Effect: Formation of Micells and Biological Membranes. New York, Wiley. 2nd ed., 1980.
7. Israelachvili J.N., Marcelja S., Horn R. G., Physical principles of membrane organization, *Q. Rev. Biophys.*, 1980, 13(2):121-200. DOI: 10.1017/S0033583500001645
8. Israelachvili J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1976, 2, 72: 15–25.
9. Mouritsen O.G., Lipids, curvature, and nano-medicine, *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 2011, 113(10): 1174–1187. DOI: 10.1002/ejlt.201100050
10. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н., Динамическая структура липидного бислоя, М.: Наука, 1981. — 293 с.
11. Кuo A.L., Wade C.G., Lipid lateral diffusion by pulsed nuclear magnetic resonance, *Biochemistry*, 1979, 17: 2300–2308.
12. Leontiadou H., Marrink S.J., Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers, *Biophys. J.*, 2004, 86(4): 2156–2164. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74275-7
13. Харакоз Д.П., О возможной физиологической роли перехода «жидкое-твёрдое» в биологических мембранах, *Успехи биологической химии*, 2001, Т. 41, — 333–364.
14. Sum A.K., Faller R., de Pablo J.J., Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides, *Biophys J.*, 2003, 85(5): 2830–2844. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74706-7
15. Hauser H., Pascher I., Pearson R.H. and Sundell S., Preferred Conformation And Molecular Packing Of Phosphatidylethanolamine And Phosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, 650(1): 21–51. DOI: 10.1016/0304-4157(81)90007-1
16. <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps/>

-
17. Matsuki H., Goto M., Tada K., Tamai N., Thermotropic and Barotropic Phase Behavior of Phosphatidylcholine Bilayers, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14(2): 2282–2302. DOI:10.3390/ijms14022282
 18. Heimburg T., Chapter 8 Coupling of chain melting and bilayer structure: Domains, rafts, elasticity and fusion, *Membrane Science and Technology*, 2003, 7: 269–293. DOI: 10.1016/S0927-5193(03)80032-3
 19. Katchalsky A., Kedem O., Klibansky C., DeVries A. Rheological considerations of the haemolysing red blood cell. – In: *Flow Properties of Blood and Other Biological Systems*. (eds. Copley A.L., Stainsby G.).- Oxford: Pergamon Press, 1960, —p.155.
 20. Fung Y.C., Theoretical considerations of the elasticity of red cells and small blood vessels, *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 1966, 25: 1761.
 21. Fung Y.C., Tong P., Theory of sphering of red blood cells, *Biophys. J.*, 1968, 5: 175.
 22. Evans E.A., Fung Y.C., Improved measurements of the erythrocyte geometry, *Microvsc. Res.*, 1972, 4: 335.
 23. Rand R.P., Burton A.C., Mechanical properties of the red cell membrane. I. Membrane stiffness and intracellular pressure, *Biophys. J.*, 1964, 4: 115.
 24. Hochmuth R. M., Mohandas N., Uniaxial loading of the red cell membrane. *J. Biomech.*, 1972, 5: 501.
 25. Evans E.A., Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers, *Biophys. J.*, 1974, 14: 923.
 26. Evans E.A., Hochmuth R.M., Mechano-chemical properties of membranes. – In: *Current Topics in Membranes and Transport*, v.10. (eds. Kleinzeller A., Bronner F.). – New York: Academic Press, 1978.
 27. Pabst G., Kucerka N., Nieh M.-P., Rheinstädter M.C., Katsaras J., Applications of neutron and X-ray scattering to the study of biologically relevant model membranes, *Chem. Phys. Lipids*, 2010, 163: 460–479. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2010.03.010
 28. Pan J., Tristram-Nagle S., Kucerka N., Nagle J.F., Temperature Dependence of Structure, Bending Rigidity, and Bilayer Interactions of Dioleoylphosphatidylcholine Bilayers, *Biophys. J.*, 2008, 94(1): 117–124. DOI: 10.1529/biophysj.107.115691
 29. Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E., Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers, *Biophys. J.*, 2000, 79(1): 328–339. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76295-3
 30. Caillé, A., Remarques sur la diffusion des rayons X dans les smectiques, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1972, Série B, 274: 891–893.
 31. Lei N., Safinya C.R., Bruinsma R.F., Discrete harmonic model for stacked membranes: theory and experiment, *J. Phys. II*, 1995, 5(8): 1155–1163. DOI: 10.1051/jp2:1995174
 32. Franks F. In *Water: A Comprehensive Treatise*, V. 1-7 (ed. Franks F.) Plenum, New York, 1972 —82.

-
33. Derjaguin B.V., Landau L., Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes, *Acta Physicochim.*, 1941 URSS, 14: 633–662.
 34. Vervwey E.J.W., Overbeek J.Th.G. In *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier, Amsterdam, 1948—205.
 35. Pashley R.M., Israelachvili J.N., Molecular layering of water in thin films between mica surfaces and its relation to hydration forces, *J. Colloid Interface Sci.*, 1984, 101(2): 511-523. DOI: 10.1016/0021-9797(84)90063-8
 36. Henderson D., An explicit expression for the solvent contribution to the force between colloidal particles using a hard sphere model, *J. Colloid Interface Sci.*, 1988, 121(2): 486-490. DOI: 10.1016/0021-9797(88)90450-X
 37. Christenson H.K., Yaminsky V.V., Adhesion and solvation forces between surfaces in liquids studied by vapor phase experiment, *Langmuir*, 1993, 9(9): 2448-2454. DOI: 10.1021/la00033a030
 38. Langmuir I., The Role of Attractive and Repulsive Forces in the Formation of Tactoids, Thixotropic Gels, Protein Crystals and Coacervates, *J. Chem. Phys.*, 1938, 6: 873-896. DOI: 10.1063/1.1750183
 39. Derjagin B.V., Churaev N. V., In *Fluid Interfacial Phenomena* (ed. Croxton C.A.), Wiley, Chichester, 1986, Ch.15: 663–738.
 40. 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
 41. Rand R. P. and Parsegian A., Hydration forces between phospholipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, 988(3): 351–376. DOI: 10.1016/0304-4157(89)90010-5
 42. McIntosh T. J. and Simon S. A., Hydration and steric pressures between phospholipid bilayers, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1994, 23: 27–54. DOI: 10.1146/annurev.bb.23.060194.000331
 43. Israelachvili J.N., Pashley R.M. In *Biophysics of Water*. (eds. Franks F., Mathias S.), Wiley, Chichester, 1982, 183–194.
 44. Israelachvili J.N., Wennerstroem H., Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions, *Nature*, 1996, 379: 219–224. DOI: 10.1038/379219a0
 45. Helfrich W., Steric interaction of fluid membranes in multilayer systems, *Z. Naturforsch.*, 1978, 33a: 305–315.
 46. de Gennis P.G., Polymers at an interface; a simplified view, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1987, 27(3-4): 189–209. DOI: 10.1016/0001-8686(87)85003-0
 47. Пастушенко В.Ф. Мембранные электрокинетические эффекты. Дис. Д-ра физ.-мат. Наук. М. 03.00.02. 1987.
 48. Белая М.Л., Левадный В.Г., *Коллоид. Журнал*, 1988, 50(6): 892.

-
49. Lakshminarayanaiah N., *Equations of Membrane Biophysics*, New York-London: Academic Press, 1984.
 50. Inoko Y., Yamaguchi T., Furuya K., Mitsui T., Effects of cations on dipalmitoyl phosphatidylcholine/cholesterol/water systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975, 413: 24–32. DOI: 10.1016/0005-2736(75)90055-3
 51. 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
 52. Lee A.G., How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1666(1-2): 62–87. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.05.012
 53. Rappolt M., Pabst G., Amenitsch H., Laggner P., Salt induced phase separation in the liquid crystalline phase of phosphatidylcholines. *Colloids and Surfaces A.*, 2001, 183–185:171–181. DOI: 10.1016/S0927-7757(01)00568-4
 54. Böckmann R. A., Hac A., Heimburg T., Grubmüller H., Effect of sodium chloride on a lipid bilayer, *Biophys. J.*, 2003, 85: 1647–1655. DOI: 10.1016/s0006-3495(03)74594-9
 55. Petrache H.I., Kimchi I., Harries D., Parsegian V.A., Measured depletion of ions at the biomembrane interface, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 11546–11547. DOI: 10.1021/ja052549+
 56. Petrache H.I., Tristram-Nagle S., Harries D., Kucerka N., Nagle J. F., Parsegian V. A., Swelling of phospholipids by monovalent salt, *J. Lipid Res.*, 2006, 47: 302–309. DOI: 10.1194/jlr.M500401-JLR200
 57. Kharakoz, D.P., Phase-transition-driven synaptic exocytosis: a hypothesis and its physiological and evolutionary implications, *Biosci. Rep.*, 2001, 21: 801–830. DOI: 10.1023/A:1015588825142
 58. Seelig J. Macdonald P. M., Scherer P. G., Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes. *Biochemistry*, 1987, 26: 7535–7541. DOI: 10.1021/bi00398a001
 59. Sachs J.N., Nanda H., Petrache H.I., Woolf T. B., Changes in phosphatidylcholine headgroup tilt and water order induced by monovalent salts: molecular dynamics simulations, *Biophys. J.*, 2004, 86:3772–3782. DOI: 10.1529/biophysj.103.035816
 60. Pandit S.A., Bostick D., Berkowitz M.L., Molecular dynamics simulation of a dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayer with NaCl, *Biophys. J.*, 2004, 84:3743–3750. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)75102-9
 61. Böckmann R.A., Grubmüller H., Multistep binding of divalent cations to phospholipid bilayers: a molecular dynamics study. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2004, 43:1021–1024. DOI: 10.1002/anie.200352784

-
62. Uhríková D., Teixeira J., Lengyela A., Almásy L., Balgavý P., Formation of unilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles promoted by Ca²⁺ ions: A small-angle neutron scattering study, *J. Spectroscopy*, 2007, 21: 43–52. DOI: 10.1155/2007/576282
 63. Chismadzhev Yu.A., How are biological membranes fusing together, *Soros Educ. J.*, 2001, 7: 4–9.
 64. Lucy J.A., The Fusion of Biological Membranes, *Nature*, 1970, 227: 815–817. DOI:10.1038/227815a0
 65. Meldolesi J., Borgese N., Camilli P.D, Ceccarelli B., Cell Surface Reviews, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978, 5: 510.
 66. Bischoff R., Cell Surface Reviews, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1978, 5: 127.
 67. Ahkong Q.F., Fisher D., Tampion W., Lucy J.A., Mechanisms of cell fusion, *Nature*, 1975, 253: 194–195. DOI:10.1038/253194a0
 68. Roy S. M. and Sarkar M., Membrane fusion induced by small molecules and ions, *J. of Lipids*, 2011 (2011), Article ID 528784, 14 pages. DOI: 10.1155/2011/528784.
 69. Verwey E.J.W., Theory of the stability of lyophobic colloids, *J. Phys. and Colloid Chem.*, 1947, 3: 631–636.
 70. Cevc G., Seddon J. M. and Marsh D., Thermodynamic and structural properties of phosphatidylserine bilayer membranes in the presence of lithium ions and protons, *BBA*, 1985, 814 (1): 141–146. DOI: 10.1016/0005-2736(85)90429-8
 71. Cevc G. and Richardsen H., Lipid vesicles and membrane fusion, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999, 38(3): 207–232. DOI: 10.1016/S0169-409X(99)00030-7
 72. Nir S., Wilschut J. and Bentz J., The rate of fusion of phospholipid vesicles and the role of bilayer curvature, *BBA*, 1982, 688(1): 275–278. DOI: 10.1016/0005-2736(82)90604-6
 73. Lee H.C., Aarhus R., Walseth T.F., Calcium mobilization by dual receptors during fertilization of sea urchin eggs, *Science*, 1993, 261(5119): 352–355.
 74. Berridge M., Lipp P., Bootman M., Calcium Signalling, *Curr. Biol.*, 1999, 9(5):157–159. DOI: 10.1016/S0960-9822(99)80101-8
 75. Lee A. G., How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1666: 62–87. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.05.012
 76. Lis L.J., Lis W.T., Parsegian V.A. and Rand R.P., Adsorption of divalent cations to a variety of phosphatidylcholine bilayers, *Biochemistry*, 1981, 20:1771–1777. DOI: 10.1021/bi00510a010
 77. Lis L.J., Parsegian V.A. and Rand R.P., Binding of divalent cations of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers and its effect on bilayer interaction. *Biochemistry*, 1981, 20: 1761–1770. DOI: 10.1021/bi00510a010

-
78. 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
79. Tatulian S.A., Gordeliy V.I., Sokolova A.E. and Syrykh A.G., A neutron diffraction study of the influence of ions on phospholipid membrane interactions, *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1070: 143–151. DOI: 10.1016/0005-2736(91)90156-3
80. Herbette L., Napolitano C.A. and McDaniel R.V., Direct determination of the calcium profile structure for dipalmitoyllecithin multilayers using neutron diffraction, *Biophys. J.*, 1984, 46: 677–685. DOI: 10.1016/S0006-3495(84)84066-7
81. Ganesan M.G., Schwinke D.L. and Weiner N., Effect of Ca^{2+} on thermotropic properties of saturated phosphatidylcholine liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 686: 245–248. DOI: 10.1016/0005-2736(82)90119-5
82. Lehrmann R. and Seelig J., Adsorption of Ca^{2+} and La^{2+} to bilayer membranes: measurement of the adsorption enthalpy and binding constant with titration calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, 1189 (1): 89–95. DOI: 10.1016/0005-2736(94)90284-4
83. Graddick W.F., Stomatoff J.B., Eisenberger P. and Berreman D.W., Order-disorder and the pretransition in dipalmitoyl phosphatidylcholine multilayers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 88: 907–912. DOI: 10.1016/0006-291X(79)91494-3
84. Akutsu H. and Seelig J., Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes, *Biochemistry*, 1981, 20(26): 7366–7373. DOI: 10.1021/bi00529a007
85. 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
86. Zidovetzki R., Atiya A.W. and Boeck H.De., Effect of divalent cations on the structure of dipalmitoylphosphatidylcholine and phosphatidylcholine/phosphatidylglycerol bilayers: an ^2H -NMR study, *Membr. Biochem.*, 1989, 8(3): 177–186. DOI: 10.3109/09687688909025830
87. Shibata T., Pulse NMR study of the interaction of calcium ion with dipalmitoylphosphatidylcholine lamellae, *Chem. Phys.Lipids.*, 1990, 53(1): 47–52. DOI: 10.1016/0009–3084(90)90132-B
88. Yabusaki, K.K. and Wells, M.A., Binding of calcium to phosphatidylcholines as determined by proton magnetic resonance and infrared spectroscopy, *Biochemistry*, 1975, 14(1): 162–166. DOI: 10.1021/bi00672a027

-
89. Grasdalen H., Eriksson L., Westman J., Ehrenberg A., Surface potential effects on metal ion binding to phosphatidylcholine membranes. ^{31}P NMR study of lanthanide and calcium ion binding to egg-yolk lecithin vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 469(2): 151–162. DOI:10.1016/0005-2736(77)90177-8
 90. Marra J. and Israelachvili J.N., Direct measurements of forces between phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers in aqueous electrolyte solutions, *Biochemistry*, 1985, 24(17): 4608–4618. DOI: 10.1021/bi00338a020
 91. Binder H. and Zschörnig O., The effect of metal cations on the phase behavior and hydration characteristics of phospholipids membranes, *Chem. Phys. Lipids*, 2002, 115(1-2): 39–61. DOI: 10.1016/S0009-3084(02)00005-1
 92. 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
 93. Lau A., McLaughlin A., MacDonald R. and McLaughlin S. – In: *Bioelectrochemistry: Ions, Surfaces, Membranes* (ed. Blank M.), Washington: Amer. Chem. Society, 1980, Vol. 188, —pp. 49–56.
 94. Ohki K. Sekiya T., Yamauchi T. and Nozawa Y., Physical properties of phosphatidylcholine-phosphatidylinositol liposomes in relation to calcium effect, *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, 644(2): 165–174. DOI: 10.1016/0005-2736(81)90372-2
 95. Klein J.W., Ware B.R., Barclay G. and Petty H.R., Phospholipid dependence of calcium ion effects on electrophoretic mobilities of liposomes, *Chem. Phys. Lipid*, 1987, 43(1): 13–23. DOI: 10.1016/0009-3084(87)90013-2
 96. Koynova R., Caffrey M., Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1376(1): 91–145. DOI: 10.1016/S0304-4157(98)00006-9
 97. 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
 98. Clarke R.J. and Lüpfer Ch., Influence of Anions and Cations on the Dipole Potential of Phosphatidylcholine Vesicles: A Basis for the Hofmeister Effect, *Biophys. J.*, 1999, 76(5): 2614–2624. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77414-X
 99. Chapman D., Peel W., Kingston B., Lilley T., Lipid phase transitions in model biomembranes: The effect of ions on phosphatidylcholine bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 464(2): 260–275. DOI: 10.1016/0005-2736(77)90002-5
 100. Black S.G., Dixon G.S., AC calorimetry of dimyristoylphosphatidylcholine multilayers: hysteresis and annealing near the gel to liquid-crystal transition, *Biochemistry*, 1981, 20(23): 6740–6744. DOI: 10.1021/bi00526a033

-
101. Parsegian V.A., and Rand R.P., Interaction in membrane assemblies. – In: Structure and Dynamics of Membranes. (eds. Lipowsky R. and Sackmann E.), Amsterdam: North-Holland, , 1995, —pp.643–690.
 102. Lipowsky, R. 1995. Generic interactions of flexible membranes. – In: Structure and dynamics of membranes. (eds. Lipowsky R., and Sackmann E.), Amsterdam: North-Holland, , 1995, —pp.521–602.
 103. Korreman S.S. and Posselt D., Modification of anomalous swelling in multilamellar vesicles induced by alkali halide salts, *Eur. Biophys. J.*, 2001, 30(2):121–128.
 104. Petrache H.I., Zemb T., Belloni L. and Parsegian V.A. Salt screening and specific ion adsorption determine neutral-lipid membrane interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006,103 (21): 7982–7987. DOI: 10.1073/pnas.0509967103
 105. Pabst G., Hodzic A., Strancar J., Danner S., Rappolt M. and Laggner P., Rigidification of Neutral Lipid Bilayers in the Presence of Salts, *Biophys. J.*, 2007, 93: 2688–2696 DOI:10.1529/biophysj.107.112615
 106. Tatulian S.A., Binding of alkaline-earth metal cations and some anions to phosphatidylcholine liposomes, *Eur. J. Biochem.*, 1987, 170: 413–420. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1987.tb13715.x
 107. Shepherd J.C., Buldt, G., Zwitterionic dipoles as a dielectric probe for investigating head group mobility in phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 514(1): 83–94.
 108. Seelig J., Gally G.U., Wohlqemuth R., Orientation and flexibility of the choline head group in phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 467(2): 109–119. DOI: 10.1016/0005-2736(77)90188-2
 109. Izumitani Y., Cation dipole interaction in the lamellar structure of DPPC bilayers, *J. Colloid Interface Sci.*, 1994, 166: 143–159. DOI:10.1006/jcis.1994.1281
 110. Huster D., Paasche G., Dietrich U., Zschornig O., Gutberlet T., Gawrisch K., Arnold K., Investigation of phospholipid area compression induced by calcium mediated dextran sulfate interaction, *Biophys. J.*, 1999, 77(2): 879–887. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)76939-0
 111. Kataoka R., Aruga, S., Mitaku S., Kinoshita K., Ikegami A., Interaction between Ca^{2+} and dipalmitoylphosphatidylcholine membranes. II. Fluorescence anisotropy study, *Biophys. Chem.*, 1985, 21(3-4): 277–284. DOI: 10.1016/0301-4622(85)80015-6
 112. Izumitani Y., A theory of the effects of the field-dependent affinity of calcium ions on the lamellar phase of dipalmitoyl lecithin, *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, 182: 6–16. DOI: 10.1006/jcis.1996.0431
 113. Akashi K., Miyata H., Itoh H. and Kinoshita K., Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: Critical role of electrostatic repulsion, *Biophys. J.*, 1998, 74: 2973–2982. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)78004-X

-
114. Yamada N.L., Seto H., Takeda T., Naga M., Kawabata Y., Inoue K., SAXS, SANS and NSE studies on “unbound state” in DPPC/water/CaCl₂ system, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 2005, 74: 2853–2859. DOI: 10.1143/JPSJ.74.2853
115. Moore J.M. Physical Chemistry. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, U.S.A., 1972
116. Banerjee R., Bellare J., Effect of calcium on the surface properties of phospholipid monolayers with respect to surfactant formulations in respiratory distress syndrome, *Biomed. Mater. Eng.*, 2001, 11: 43–53.
117. Aruga S., Kataoka R., Mitaku S., Interaction between Ca²⁺ and dipalmitoylphosphatidylcholine membranes. I. Transition anomalies of ultrasonic properties, *Biophys. Chem.*, 1985, 21(3-4): 265–275. DOI: 10.1016/0301-4622(85)80014-4
118. Uhríková D., Kucerka N., Teixeira J., Gordeliy V., Balgavý P., Structural changes in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer promoted by Ca²⁺-ions: a small-angle neutron scattering study, *Chem. Phys. Lipids*, 2008, 155: 80–89. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2008.07.010
119. 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
120. Helfrich W. Mean field theory of n-layer unbinding, *J. Phys. II France*, 1993, 3(3): 385–393. DOI: 10.1051/jp2:1993100
121. Izraelachvili J.N. and Wennerstrom H., Entropic forces between amphiphilic surfaces in liquids, *J. Phys. Chem.*, 1992, 96(2): 520–531. DOI: 10.1021/j100181a007
122. Crowe J.H., Carpenter J.F., Crowe L.M., Anchordoguy T.J., Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules, *Cryobiology*, 1990, 27(3): 219–231. DOI: 10.1016/0011-2240(90)90023-W
123. Anchordoguy T.J., Rudolph A.S., Carpenter J.F., Crowe J.H., Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing, *Cryobiology*, 1987, 24(4): 324–331. DOI: 10.1016/0011-2240(87)90036-8
124. Anchordoguy T.J., Carpenter J.F., Crowe J.H., Crowe L.M., Temperature dependent perturbation of phospholipid bilayers by dimethylsulfoxide, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1104(1): 117–122. DOI: 10.1016/0005-2736(92)90139-D
125. Tristram-Nagle S., Moore T., Petrache H., Nagle J.F., DMSO produces a new subgel phase in DPPC: DSC and X-ray diffraction study, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1396(1): 19–33. DOI: 10.1016/S0005-2736(97)00197-1
126. Yu Z.-W., Quinn P.J. Solvation effects of dimethyl sulphoxide on the structure of phospholipid bilayers, *Biophys Chem.*, 1998, 70(1): 35–39. DOI: 10.1016/S0301-4622(97)00100-2

-
127. Gordeliy V.I., Kiselev M.A., Lesieur P., Pole A.V., Teixeira J., Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures, *Biophys J.*, 1998, 75(5): 2343–2351. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77678-7
128. Smondyrev A.M., Berkowitz M.L., Molecular dynamics simulation of DPPC bilayer in DMSO, *Biophys J.*, 1999, 76(5): 2472–2478. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77402-3
129. Lovelock J.E., Bishop M.W.H., Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide, *Nature*, 1959, 183: 1394–1395. DOI: 10.1038/1831394a0
130. Ali J., Shelton J.N., Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos, *J. Reprod. Fertil.*, 1993, 99(2): 471–477. DOI: 10.1530/jrf.0.0990471
131. Crowe L.M., Crowe J.H., Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited, *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 946(2): 193–201. DOI: 10.1016/0005-2736(88)90392-6
132. McDaniel R.V., Simon S.A., McIntosh T.J., Nonelectrolyte substitution for water in phosphatidylcholine bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 731(1): 97–108. DOI: 10.1016/0005-2736(83)90402-9
133. Curatolo W., The effects of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide on cerebroside metastability, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 817(1): 134–138. DOI: 10.1016/0005-2736(85)90075-6
134. Bonora S., Markarian S.A., Trinchero A., Grigorian K.R., SC study on the effect of dimethylsulfoxide (DMSO) and diethylsulfoxide (DESO) on phospholipid liposomes, *Thermochim. Acta*, 2005, 433: 19–26. DOI: 10.1016/j.tca.2005.02.011
135. Yu Z.W., Quinn P.J., The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide, *Molecular Membrane Biology*, 1998, 15: 59–68. DOI: 10.3109/09687689809027519
136. Cheng Ch.-Yu., Song J., Pas J., Meijer L. H. H. and Han S., DMSO Induces Dehydration near Lipid Membrane Surfaces, *Biophys. J.*, 2015, 109: 330–33. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.06.011
137. Notman R., Noro M., O'Malley B., Anwar J.J., Molecular Basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on Lipid Membranes, *Am. Chem. Soc.*, 2006, 128(43): 13982–13983. DOI: 10.1021/ja063363t
138. Gurtovenko A.A. and Anwar J., Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide, *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111 (35), pp 10453–10460. DOI: 10.1021/jp073113e
139. Chaban V.V., Force field development and simulations of senior dialkyl sulfoxides, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, 18: 10507–10515, DOI: 10.1039/c5cp08006a
140. Markarian S.A., Zatikyan A.L., Bonora S., Fagnano C., Raman and FT IR ATR study of diethylsulfoxide/water mixtures, *J. of Molecular Structure*, 2003, 655: 285–292. DOI: 10.1016/S0022-2860(03)00313-2

-
141. Markarian S.A., Bonora S., Bagramyan K.A., Arakelyan V.B., Glass-forming property of the system diethyl sulphoxide/water and its cryoprotective action on Escherichia coli survival, *Cryobiology*, 2004, 49(1): 1–9. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2004.04.001
142. Grigoryan K.R., Markarian S.A., Aznauryan M.G., Effect of dimethyl sulfoxide and diethyl sulfoxide on thermal denaturation of Human Serum Albumin, *Problems of Cryobiology*, 2009, 19: 3–9.
143. Gorshkova Yu.E., Ivankov O. I., Kuklin A.I., Gordeliy V.I., Investigation of DESO/LIPID membranes interaction by X-Ray scattering, *J. of Physics: Conf. Series*, 2012, 351: 012006. DOI:10.1088/1742-6596/351/1/012006
144. <http://www.benbest.com/cryonics/viable.html>
145. Balgavý P., Dubničková M., Kučerka N., Kiselev M.A., Yaradaikin S.P., Uhrikova D., Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2-diacylphosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study, *BBA*, 2001, 1512(1): 40–52. DOI: 10.1016/S0005-2736(01)00298-X
146. Balgavý P., Kučerka N., Gordeliy V.I., Cherezov V.G., Evaluation of small-angle neutron scattering curves of unilamellar phosphatidylcholine liposomes using a multishell model of bilayer neutron scattering length density, *Acta Phys. Slov.*, 2001, 51: 53–68.
147. 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
148. 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
149. Беззаботнов В.Ю., Останевич Ю. М. Препринт ОИЯИ РЗ-88-394. Дубна 1988
150. Kuklin A.I., Rogov A.D., Gorshkova Y.E., Utrobin P.K., Kovalev Y.S., Rogachev A.V., Ivankov O.I., Kutuzov S.A., Soloviov D.V., Gordeliy V.I., Analysis of neutron spectra and fluxes obtained with cold and thermal moderators at IBR-2 reactor: Experimental and computer-modeling studies, *Physics of Particles and Nuclei Letters*, 2011, 8 (2): 119–128. DOI: 10.1134/S1547477111020075
151. Soloviev A.G., Solovieva T.M., Kuklin A.I. <http://www.info.jinr.ru/programs/jinr/lib/sas/indexe.html>
152. Ostanovich, Yu.M., Time-of-flight small-angle scattering spectrometers on pulsed neutron sources, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*, 1988, 15: 91–103. DOI: 10.1002/masy.19880150107
153. 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
154. 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
155. Guinier A. and Fournet G. Small-Angle Scattering of X-Rays. John Wiley and Sons, New York. 1955.

-
156. Горшкова Ю.Е., Куклин А.И., Горделий В.И., Структура и фазовые переходы мультислойных везикул ДМФХ в присутствии ионов Ca^{2+} , *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, 2016, 11: 34–45. DOI: 10.7868/S0207352816110068
157. Nagle J.F., Tristram-Nagle S., Structure of lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1469: 159–195. DOI: 10.1016/S0304-4157(00)00016-2
158. 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
159. Sinn C.G., Antonietti M., Dimova R., Binding of calcium to phosphatidylcholine–phosphatidylserine membranes, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2006, 282–283: 410–419. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2005.10.014
160. Hauser H., Phospholipid vesicles. – In: *Phospholipid handbook*, New York: Marcel Dekker Inc., 1993, —pp. 603–637.
161. 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
162. 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
163. Blume A., Biological calorimetry: membranes, *Thermochim. Acta*, 1991, 193: 299–347. DOI: 10.1016/0040-6031(91)80191-K
164. Melcrová A., Pokorna S, Pullanchery S., Kohagen M., Jurkiewicz P., Hof M., Jungwirth P., Cremer P.S. and Cwiklik L., The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers, *Scientific Reports*, 2016, 6: 38035. DOI: 10.1038/srep38035
165. Gurtovenko A.A., Patra M., Karttunen M. and Vattulainen I., Cationic DMPC/DMTAP lipid bilayers: molecular dynamics study, *Biophys. J.*, 2004, 86: 3461–3472. DOI: 10.1529/biophysj.103.038760A
166. Pogodin S., Baulin V.A., Coarse-grained models of phospholipid membranes within the single chain mean field theory, *Soft Matter*, 2010, 6: 2216–2226. DOI: 10.1039/b927437e
167. Gordeliy V.I., Golubchikova L.V., Kuklin A.I., Syrykh A.G., Watts A., The study of single biological and model membranes via small-angle neutron scattering, *Prof. Colloid Polym. Sci.*, 1993, 93: 252–256.
168. McIntosh T.J., Magid A.D., Simon S.A., Range of the solvation pressure between lipid membranes: dependence on the packing density of solvent molecules, *Biochemistry*, 1989, 28(19): 7904–7912.
169. Yu Z.W. and Quinn P.J., Phase stability of phosphatidylcholines in dimethylsulfoxide solutions, *Biophys. J.*, 1995, 69(4): 1456–1463. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80015-9

-
170. 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–H₂O system, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(34): 10708–10713. DOI: 10.1073/pnas.1512325112
171. Gorshkova Yu.E., Fusion of unilamellar DMPC vesicles in presence of the sulfoxides: effect of time and concentration, *JOAM*, 2015, 17(9-10): 1532–1537.
172. Gorshkova J.E., Gordeliy V.I., Investigation of the interaction of dimethyl sulfoxide with lipid membranes by small-angle neutron scattering, *Crystallography Reports*, 2007, 52(3): 535–539. DOI: 10.1134/S1063774507030364
173. Balagurov A.M., Gordeliy V.I., *Commun. JINR (Dubna)*, 1986, P14-86-644: 1–8.
174. Vasilenko I.A., Gordeliy V.I., Tonkonog L.A., Borovyagin V.L., Structure arrangement of phospholipid membranes in non-water polar solvents, *Biol. Membr.*, 1988, 5(4): 428–438.
175. Tristram-Nagle S., Use of X-Ray and Neutron Scattering Methods with Volume Measurements to Determine Lipid Bilayer Structure and Number of Water Molecules/Lipid. – In: *Membrane Hydration: The Role of Water in the Structure and Function of Biological Membranes* (Ed. E. Anibal Disalvo), Switzerland: Springer International Publishing, 2015, —pp. 17–44. DOI: 10.1007/978-3-319-19060-0
176. Kennedy A., Long C.J., Hmel P.J., Reid T.J., The interaction of DMSO with model membranes. II. Direct evidence of DMSO binding to membranes: an NMR study, *J. Liposome Res.*, 2003, 13:259–267. DOI: 10.1081/LPR-120026391
177. Gorshkova Yu.E., Ivankov O.I. Structure and phase transitions of the multilamellar DMPC membranes in presence of the DMSO and DESO sulfoxides, *J. of Phys.: Conf. Series*, 2017, 848: 012014. DOI: 10.1088/1742-6596/848/1/012014
178. Yu Z.-W., Quinn P. J., Dimethyl Sulphoxide: A Review of Applications in Cell Biology, *Bioscience Reports*, 1994, 14(6): 259–281. DOI: 10.1007/BF01199051