

**Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
“Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина”**

Физический факультет



ДИФФУЗИЯ ЛИПИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

Учебное пособие

Казань 2006

Печатается по решению Редакционно-издательского совета физического факультета КГУ.

Филиппов А.В., Рудакова М.А., Гиматдинов Р.С., Семина И.Г. Диффузия липидов в биологических мембранах. Учебное пособие для студентов третьего и четвертого курсов специализации «Медицинская физика» физического факультета. Казань 2006.

В пособии кратко описаны структуры липидных молекул, фазовые состояния систем фосфолипид – вода, особенности движения молекул липидов в бислоях липидов. Особое внимание уделено исследованию латеральной диффузии молекул липидов методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля в однородных бислоях и в условиях латеральной фазовой неоднородности.

Рецензент:

Анисимов А.В., д.ф.-м.н., профессор, заведующий лабораторией биофизики транспортных процессов Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук.

Издание подготовлено при поддержке проектов РНП2.1.1.3222, CRDF REC-007-3 и РФФИ 05-04-48370.

© Физический факультет Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина», 2006.

“If the reader has by now concluded that little is known about the prediction of diffusivities in lipid bilayer membranes, he is correct. There is an urgent need for experimental measurements, both for their own value and for the development of future theories”

R.B.Bird, W.E.Stewart, E.N.Lightfoot
“Transport Phenomena”, Wiley, New-York, 1960.

“This citation, which was true for diffusivities in simple liquids in 1971, is certainly valid for lipid today”

R.Glegg and W.Vaz
“Progress in Protein-Lipid interactions”
Elsevier Science, Amsterdam, 1985.

“We investigate the plausibility of this suggestion by first sketching what is to be expected of a quantitative theory with predictive power, and subsequently examining whether existing free area theories comply with these expectations. Our conclusion is that current free area theories for lipid bilayers are not quantitative theories with predictive power”

E.Falck, M.Patra, M.Karttunen, M.T.
Hyvönen, I.Vattulainen
“Biophysical Journal”, V.89, P.745, 2005.

Оглавление

1. Биомембрана: ее структура и функции
2. Структуры молекул липидов
3. Фазовое состояние систем липид – вода, структуры фаз
4. Локальная подвижность молекул липидов в биологических мембранах и ЯМР релаксация протонов
5. Диффузия и самодиффузия. Измерение самодиффузии методом ЯМР
6. Физические модели липидного бислоя биологических мембран
7. Латеральная диффузия липидов
8. Описание латеральной диффузии липидов с помощью феноменологических моделей
9. Диффузия липидов в условиях латерального фазового разделения

Литература

1. Биомембрана: ее структура и функции

Элементарная живая система, способная к самостоятельному существованию, развитию и восприятию – живая клетка является основой строения всех животных, растений и микроорганизмов. Важнейшие условия существования клетки (и клеточных органелл), с одной стороны, - автономность по отношению к окружающей среде (вещество не должно смешиваться с веществом окружения, должна соблюдаться автономность химических реакций в клетке и ее отдельных частях); с другой стороны, - связь с окружающей средой (непрерывный, регулируемый перенос вещества и энергии между клеткой и окружающей средой). Живая клетка – термодинамически открытая система.

Единство автономности от окружающей среды и тесной связи с окружающей средой – необходимое условие функционирования живых организмов на всех уровнях их организации. Поэтому важнейшее условие существования живой клетки и, следовательно, жизни – биологические мембраны.

Биологические мембраны выполняют ряд важных функций.

Барьерная функция обеспечивает селективный, регулируемый, пассивный и активный обмен веществ клетки с окружающей средой. Селективный – значит избирательный: одни вещества переносятся через биологические мембраны, другие нет). Регулируемый – проницаемость мембраны для определенных веществ меняется в зависимости от функционального состояния клетки. Пассивный – перенос по направлению от областей с более высокой концентрацией к областям с более низкой концентрацией. Такой перенос вещества (диффузия) осуществляется в соответствии с законами Фика и не требует энергетических затрат. Активный – перенос от мест, где концентрация

веществ мала, к местам с большей концентрацией; такой перенос не может осуществляться без затрат энергии и участия специализированных мембранных устройств, белковых каналов.

Матричная функция обеспечивает взаимное расположение и ориентацию мембранных белков, обеспечивает их оптимальное взаимодействие (например, взаимодействие мембранных ферментов для проведения реакций). Кроме погружных (интегральных) и полупогружных белков липидная матрица содержит в себе различные стерины и полисахариды.

Механическая функция обеспечивает прочность и автономность клеток и внутриклеточных структур. Механическая прочность создается за счет сил Ван дер Вальса,

Кроме того, биологические мембраны выполняют функции: **энергетическую** – синтез АТФ на внутренних мембранах митохондрий и фотосинтез углеводов в мембранах хлоропластов; **генерацию и проведение биопотенциалов**; **рецепторную** (механическая, акустическая, обонятельная, зрительная, химическая, терморцепция – мембранные процессы) и многие другие функции.

Огромная роль мембран в жизненных процессах связана с их относительно большой совокупной площадью. Так, общая площадь всех биологических мембран в организме человека достигает десятков тысяч квадратных метров.

Молекулы липидов в мембране образуют двойной слой, в котором гидрофобные концы жирных кислот обращены друг к другу, а гидрофильные головки образуют заряженный слой на поверхности мембран (Рис. 1.1).

Биологические мембраны построены в основном из белков, липидов и углеводов. Белки и липиды составляют основную часть сухой масс мембран. Доля углеводов обычно не превышает 10-15 %, причем они связаны либо с молекулами белка (гликопротеины), либо с молекулами липидов

(гликолипиды). В мембранах различного происхождения содержание липидов колеблется от 25 до 75% по массе по отношению к белку.

Согласно Синеру и Никольсону [1], структурную основу биологической мембраны составляет двойной слой липидных молекул, инкрустированный белками (Рис.1.1), подобно тому, как инкрустация цветными камешками и стеклышками создает мозаичную картину (жидкостно-мозаичная модель биологических мембран). При этом различают, поверхностные (или периферические) и интегральные белки.

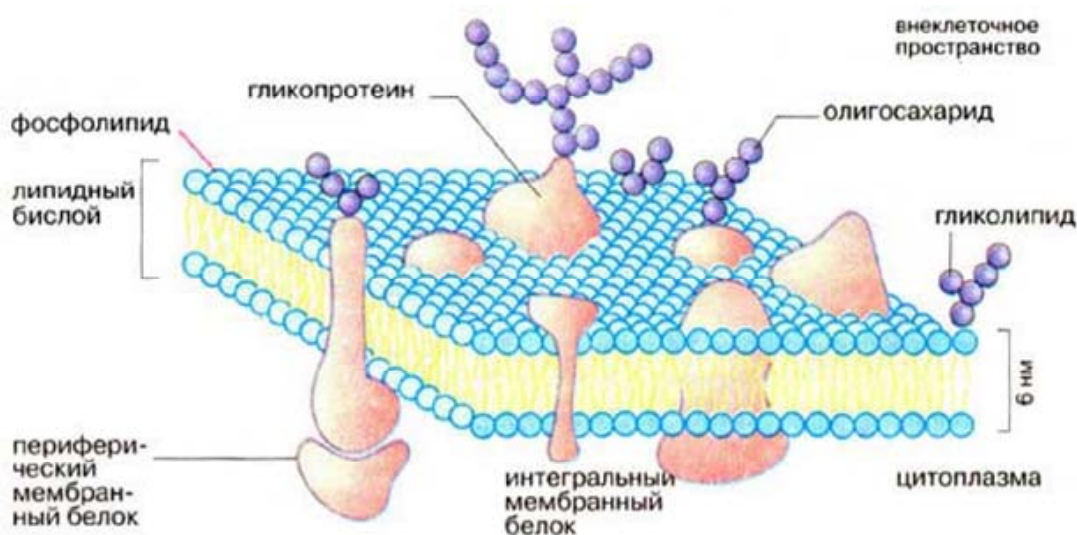


Рис.1.1. Схематическое представление структуры плазматической мембраны.

Липиды находятся при физиологических условиях в жидком агрегатном состоянии, это позволяет сравнить мембрану с фосфолипидным морем, по которому плавают белковые «айсберги». Одним из подтверждений жидкостно-мозаичной модели является тот факт, что, как установлено химическим анализом, в разных мембранах соотношение между содержанием белков и фосфолипидов сильно колеблется: количество белков в миелиновой мембране в 2,5 раза меньше, чем липидов, а в митохондриях, напротив, белков в 2,5 раза больше, чем липидов. Кроме фосфолипидов и белков в биологических мембранах содержатся и другие химические соединения. В мембранах

животных клеток много холестерина (в сравнимом количестве с фосфолипидами и белками).

Таблица 1.1. Состав некоторых биомембран [2].

Мембрана	Состав, вес. %		
	Протеины	Липиды	Углеводороды
Плазматическая мембрана эритроцитов человека	49	43	8
Плазматическая мембрана печени мышь	44	52	4
Плазматическая мембрана амебы	54	42	4
Хлоропласт шпината	70	30	0
Внутренняя мембрана митохондрии	76	24	0

Есть в мембранах и другие вещества, например, гликолипиды, гликопротеиды.

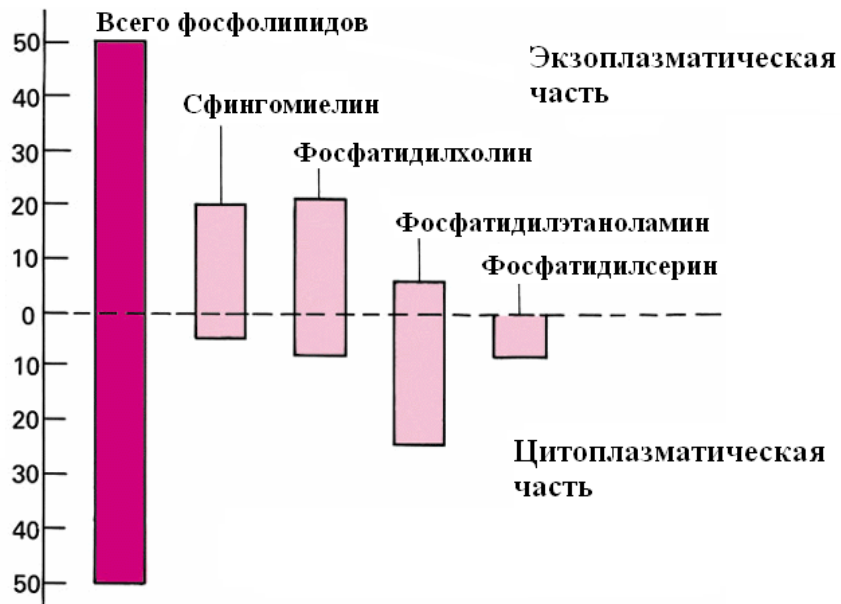


Рис.1.2. Липидный состав клеточной мембраны.

Жидкостно-мозаичная модель строения мембраны в настоящее время общепринята. Однако, как всякая модель, она дает довольно упрощенную и

схематическую картину строения мембраны. В частности, обнаружено, что белковые «айсберги» не всегда свободно плавают в липидном море, а могут быть «заякорены» на внутренние (цитоплазматические) структуры клетки. К таким структурам относятся микрофиламенты и микротрубочки. Микротрубочки – полые цилиндры диаметром около 300 нм из особого белка тубулина играют, по - видимому, важную роль в функционировании клетки.

2. Структуры молекул липидов

Липидный бислой – это основа структуры биомембраны. Липиды являются одним из классов природных соединений, важнейших для функционирования живых организмов. В состав липидов входят жирные кислоты и их производные. Из органической химии известно, что жирные кислоты алифатические монокарбоновые кислоты, общий вид которых можно представить в виде: $R-COOH$, где R представляет собой линейную углеводородную цепочку.

Три крупные группы липидов, различаются по химическому строению: I – простые липиды; II – сложные липиды; III – оксипипины.

В группу I наряду с жирными кислотами входят соединения, содержащие одну длинную углеводородную цепь с функциональной группой, образованной из карбоксильной, или утратившие карбоксил.

Липиды группы II построены из нескольких блоков, соединенных между собой связями, расщепляющимися при гидролизе, чаще всего сложноэфирными или амидными. В этих липидах могут быть и простые эфирные связи. Сложные липиды обычно делят на две подгруппы, которые называют: А – нейтральные липиды и Б – полярные липиды.

Липиды группы III- оксипипины образуются не из любых жирных кислот, как липиды групп I и II, а только из некоторых полиеновых, в первую очередь

содержащих 20 углеродных атомов. В литературе липиды группы III чаще всего называют эйкозаноидами, из которых наиболее известны простагландины. Термин «оксипирины» предложили в 1991 году шведские и американские ученые. Он говорит о содержании в молекулах кислорода и их принадлежности к липидам.

Жирными кислотами называются карбоновые кислоты с углеводородной цепью не менее 4 атомов углерода. Они присутствуют во всех организмах в виде сложных эфиров (например, с глицерином и холестерином) и служат структурными элементами жиров и мембранных липидов. Свободные жирные кислоты присутствуют в организме в небольших количествах, например в крови.

В Таблице 2.1 приведен ряд алифатических карбоновых кислот, обнаруженных в растительных и животных тканях. В высших растениях и животных содержатся главным образом жирные кислоты с длинной и неразветвленной цепью из 16 и 18 углеродных атомов, а именно пальмитиновая и стеариновая. Все длинноцепочечные природные жирные кислоты состоят из четного числа углеродных атомов, что обусловлено биосинтезом этих соединений.

Многие жирные кислоты имеют одну или несколько двойных связей. К наиболее распространенным ненасыщенным кислотам относятся олеиновая и линолевая. Из двух возможных цис- и транс-конфигураций двойной связи в природных липидах присутствует лишь цис-форма. Разветвленные жирные кислоты встречаются только в бактериях. Для обозначения жирных кислот иногда применяют сокращенные названия, где первая цифра означает число углеродных атомов, вторая цифра указывает число двойных связей, а последующие — положение этих связей. Как обычно, нумерация атомов углерода начинается с наиболее окисленной группы (карбоксигруппа = C-1).

Для этих целей используются также буквы греческого алфавита ($\alpha = C-2$, $\beta = C-3$, $\omega =$ последний C-атом).

Таблица 2.1. Карбоновые кислоты. Светло-серым обозначены незаменимые жирные кислоты для человека, темно-серым – не встречающиеся в липидах.

Тривиальное название	Число С атомов	Число двойных связей	Положение двойных связей	
Муравьиная	1	0		
Уксусная	2	0		
Пропионовая	3	0		
Масляная	4	0		
Валериановая	5	0		
Капроновая	6	0		
Каприловая	8	0		
Каприновая	10	0		
Лауриновая	12	0		
Миристиновая	14	0		
Пальмитиновая	16	0		
Стеариновая	18	0		
Олеиновая	18	1	9	
Линолевая	18	2	9, 12	
Линоленовая	18	3	9, 12, 5	
Арахидиновая	20	4	5, 8, 11, 14	
Бегеновая	22	0		
Эруковая	22	1	13	
Лигноцериновая	24	0		
Нервоновая	24	1	15	

К незаменимым жирным кислотам относятся те из них, которые не синтезируются в организме и должны поступать с пищей. Речь идет о сильно ненасыщенных кислотах, в частности арахидиновой (20:4; 5, 8, 11, 14), линолевой (18:2; 9, 12) и линоленовой (18:3; 9, 12, 15). Арахидиновая кислота является предшественником эйкозаноидов (простагландинов и лейкотриенов) и

поэтому обязательно должна присутствовать в пищевом рационе. Линолевая и линоленовая кислоты, имеющие более короткую углеродную цепь, могут превращаться в арахидоновую за счет наращивания цепи, и, следовательно, являются ее заменителями.

Все простые липиды, формулы которых в общем виде представлены ниже, биогенетически тесно связаны с жирными кислотами (R)



Спирты



Альдегиды



Углеводороды

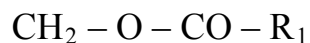


Сфингозиновые основания

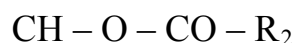
Родство спиртов, альдегидов и углеводов с жирными кислотами очевидно. Что касается сфингозиновых оснований, то они являются биохимическими производными жирных кислот и серина. Все липиды этой группы в больших количествах присутствуют в живых организмах в свободном виде. Однако их основная роль – быть строительными блоками для липидов группы II, а для жирных кислот – и предшественниками группы III. Исключение составляют углеводороды, у которых нет функциональной группы.

Классификация большинства липидов (как нейтральных, так и полярных) основана на структуре их полярной части, поэтому природные липиды одного какого-либо класса не являются обычно чистыми соединениями, а представляют собой смеси соединений с различными углеводородными цепями. Как правило, только синтетические липиды с известными длинами цепей являются чистыми соединениями.

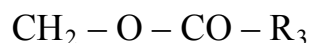
Нейтральные липиды могут быть разделены на пять основных классов: 1) триглицериды; 2) воски; 3) эфиры стеринов; 4) N-ацилэтаноламиды; 5) церамиды. Ниже приведены краткие структурные формулы основных представителей нейтральных липидов в сокращенной записи



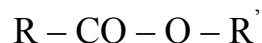
|



|



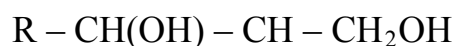
Триацилглицерины



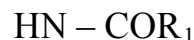
Воски или эфиры стеринов



Этаноламиды жирных кислот



|



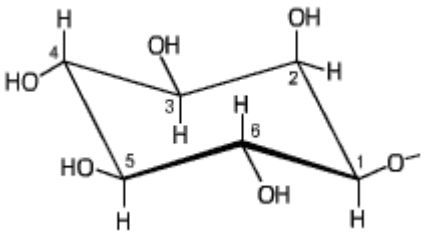
Церамиды

Воски и эфиры стеринов имеют общую формулу, в которой радикал R может быть жирным спиртом или стеринном. Наиболее известны воски – продукты деятельности насекомых (пчелиный), животный (ланолин) и растений. В их состав помимо восков – химических соединений входят простые липиды и другие соединения. Триглицериды – основные вещества всех жиров и масел. Два последних класса нейтральных липидов заслуживают упоминания как биологически активные вещества. В первую очередь это относится к этаноламидам ЖК, которые уже несколько раз привлекали внимание мировой науки. В 1992 году начался новый период в истории этого класса липидов: этаноламид арахидоновой кислоты («анандомид») был обнаружен в мозгу животных как вещество, связывающееся с рецепторами каннабиноидов.

Полярные липиды, в отличие от нейтральных, содержат достаточно большую полярную «голову». В мономерной форме они, как правило, малорастворимы как в воде, так и в неполярных растворителях (алканах, бензоле), образуя уже при небольших концентрациях мицеллы, в том числе и бислойные. На основании строения полярной части можно выделить две большие группы этих соединений: фосфолипиды и гликолипиды; кроме того, к амфифильным липидам можно отнести жирные кислоты и их соли, моноацилглицериды, а также длинноцепные амиды. На основании способа присоединения углеводородных цепей фосфо- и гликолипиды можно также разделить на два больших класса: глицеро- и сфинголипиды. Первые построены на основании глицерина, вторые – на основании аминок спирта сфингазина или его гомологов.

В мембранах содержатся липиды трех классов: фосфолипиды, холестерин и гликолипиды.

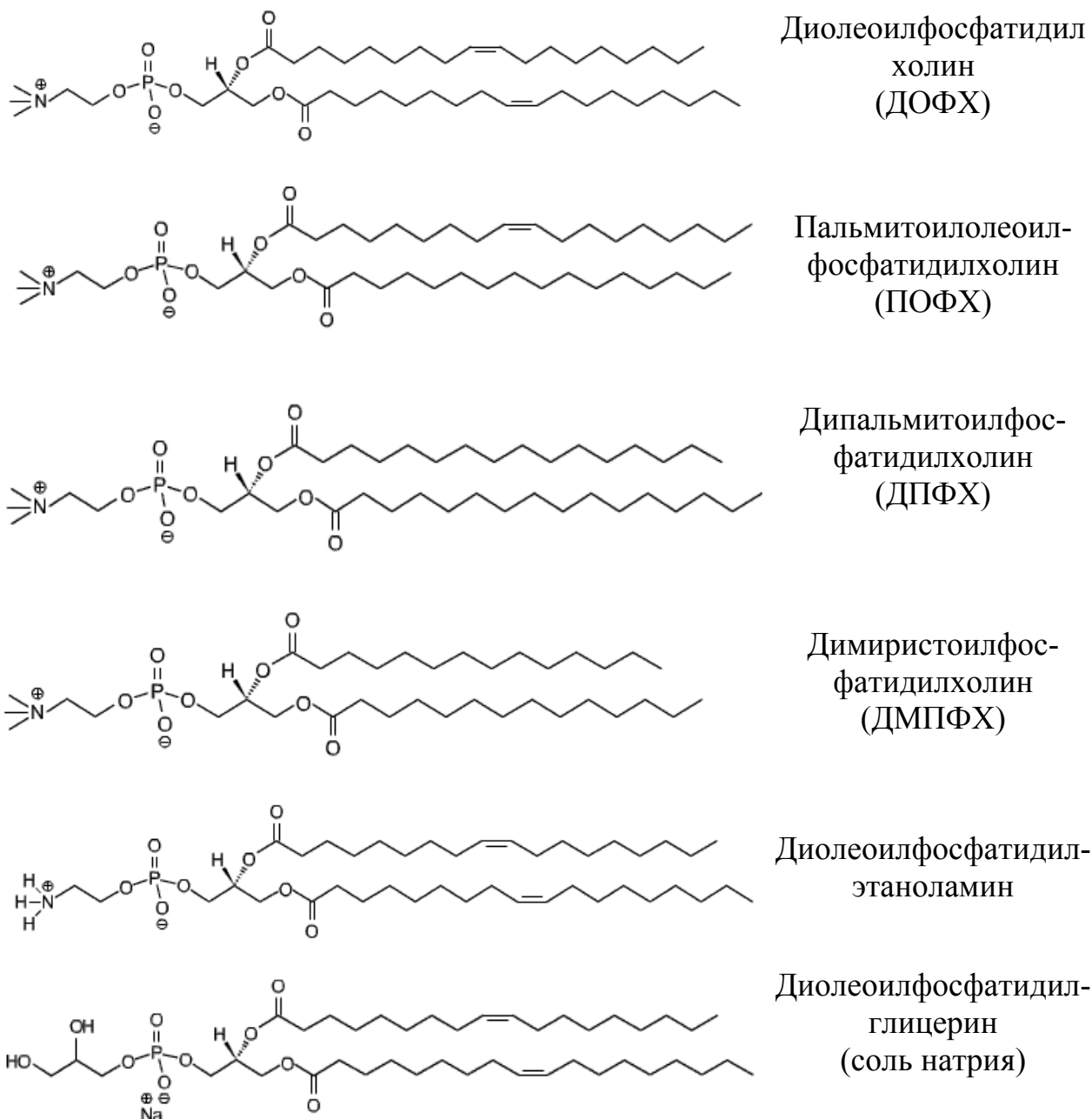
Таблица 2.2. Структура полярных голов липидов.

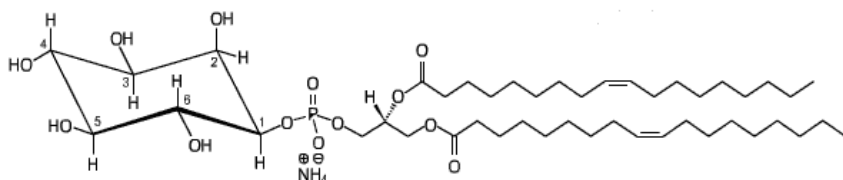
Название	Формула
холин	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}^{(+)}(\text{CH}_3)_3$
этаноламин	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}^{(+)}\text{H}_3$
серин	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COO}^{(-)} - \text{N}^{(+)}\text{H}_3$
МИОИНОЗИТ	
глицерин	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$

Фосфолипиды являются одними из основных компонентов биомембран. Приставка «фосфо-» используется для всех липидов, являющихся моно- или

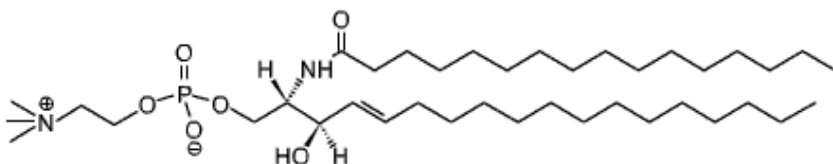
диэфирами фосфорной кислоты. Основой большинства фосфолипидов является фосфатидовая кислота (остаток фосфатидил-). Остаток фосфорной кислоты может образовывать сложноэфирную связь с гидроксильными группами аминоспиртов (холин, этаноламин или серин) или полиспиртов (миоинозит) (Таблица 2.2).

Таблица 2.3. Структурные формулы некоторых липидов.

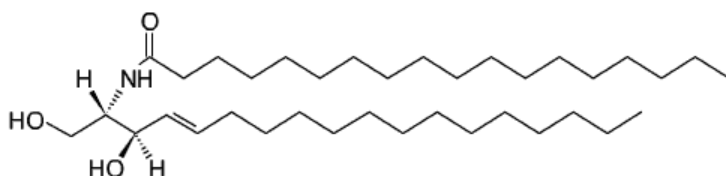




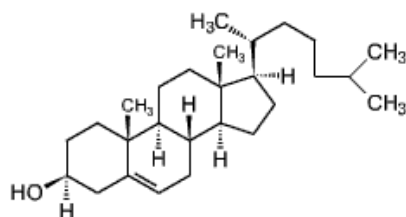
Диолеоилфосфатидил-
инозитол
(соль аммония)



Сфингомиелин
(СМ)



Церамид



Холестерин

Охарактеризуем некоторые типы фосфолипидов.

Фосфатидилхолин (лецитин) – главный фосфолипид большинства типов животных. Его содержание обычно составляет не менее 50% суммы фосфолипидов.

Вторым по значению фосфолипидом у животных обычно является **фосфатидилэтаноламин**. В большинстве бактерий фосфатидилхолина нет, а более 60-70% их фосфолипидов составляет фосфатидилэтаноламин.

Для большинства растений очень важен **фосфатидилглицерин**. Это единственный фосфолипид сине-зеленых водорослей, главный фосфолипид фотосинтетического аппарата всех растений.

Сфингомиелин является важнейшим представителем группы сфинголипидов. Это один из главных компонентов клеток эволюционно продвинутых типов животных. В эритроцитах некоторых млекопитающих, в частности овец, он заменяет фосфатидилхолин в качестве главного фосфолипида. По строению сфинголипиды отличаются от обычных фосфолипидов тем, что функции глицерина в них выполняет аминоксирт с длинной алифатической цепью – сфингозин. Производные сфингозина, ацилированного по аминоксирте остатками жирных кислот, называются церамидами. Нужно отметить, что сфинголипиды в большом количестве присутствуют в мембранах клеток нервной ткани и мозге.

Гликолипиды содержатся во всех тканях, главным образом в наружном липидном слое плазматических мембран. Гликолипиды построены из сфингозина, остатка жирной кислоты и олигосахарида. Заметим, что в них отсутствует фосфатная группа. К наиболее простым представителям этой группы веществ относятся галактозилцерамид и глюкозилцерамид (так называемые цереброзиды). В растениях много моно- и дигалактозилдиглицерида. Гликолипиды растений играют важную роль в процессе фотосинтеза. У позвоночных животных наиболее богаты гликолипидами мозг и нервные ткани. В них наряду с цереброзидами присутствует их сульфированные производные – сульфаты, а также сфингогликолипиды со сложной углеводной цепью – ганглиозиды. Интересно, что последние присутствуют только у представителей двух типов животных: позвоночных и иглокожих. Ганглиозиды вызывают большой интерес не только в биохимии, но и в медицине.

Холестерин относится к стеринам, но благодаря своей широкой распространенности в биомембранах также относится к основным липидам биомембраны. Подобно другим молекулам липидов он имеет гидрофобный «хвост», в качестве которого выступают пять соединенных циклов, и

небольшую гидрофильную «голову» - ОН группу. Роль холестерина в мембране до конца не понятна, однако известно, что нарушение его метаболизма приводит к серьезным заболеваниям, в частности атеросклерозу и другим. Не все биологические мембраны имеют высокое содержание холестерина, в некоторых бактериях (*Acholeplasma laidlawii*) он вообще отсутствует.

3. Фазовое состояние систем липид – вода, структуры фаз

Смеси липидов с водой отличаются выраженным полиморфизмом, то есть способностью образовывать различные полимолекулярные структуры. Типичная для системы фосфолипид – вода фазовая диаграмма представлена на Рис.3.1 в координатах концентрация воды – температура.

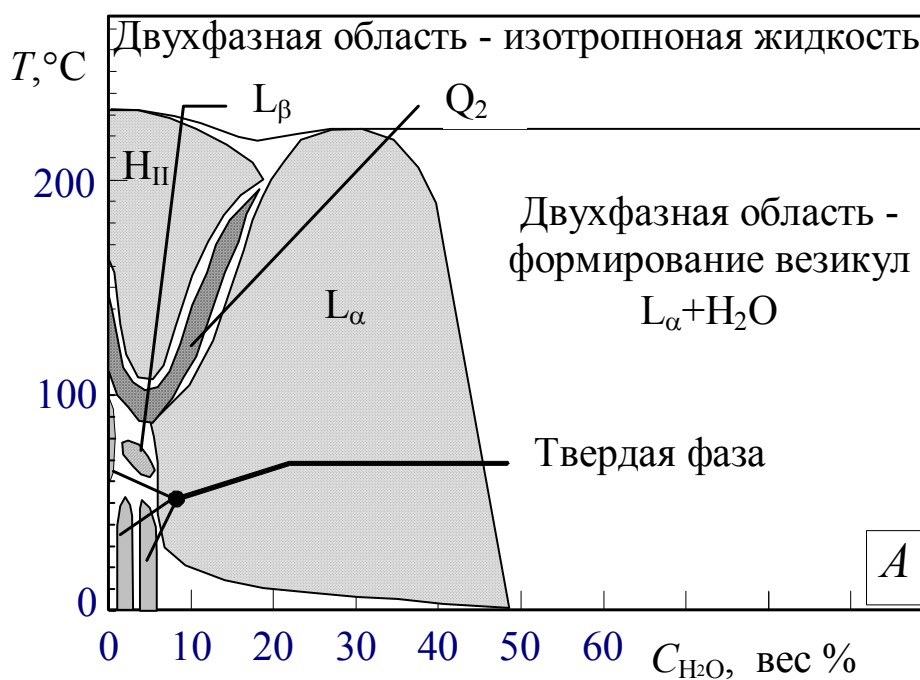


Рис.3.1. Фазовая диаграмма системы яичный лецитин (фосфатидилхолин) – вода в координатах концентрация воды – температура [3].

Основные типы структурной организации водно – липидных систем схематично представлено на Рис.3.2 Какая из структур преобладает, зависит от

таких параметров, как тип липида, концентрация воды, температура, давление, ионная сила и pH.

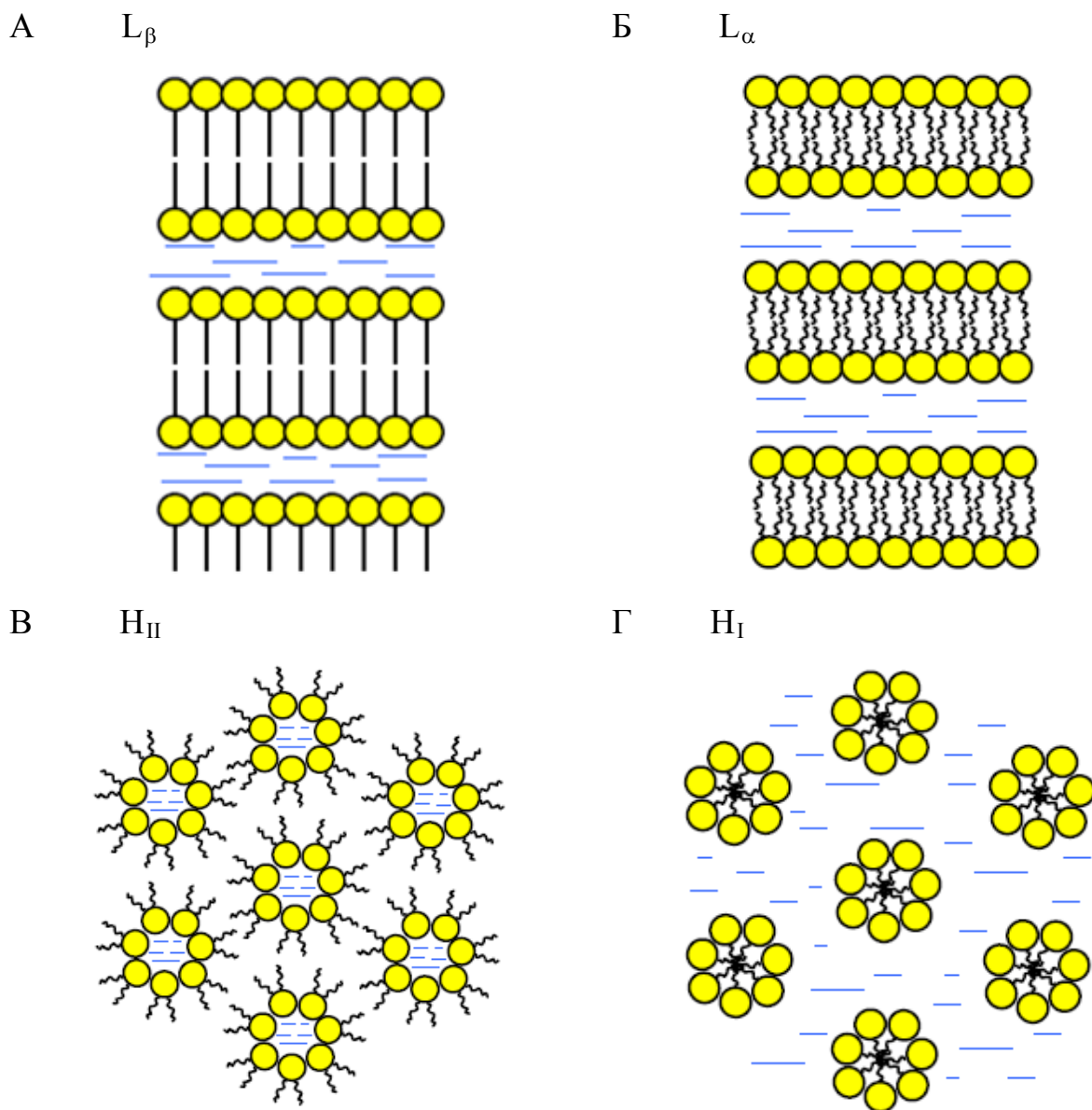


Рис.3.2. Схематическое изображение различных фаз водно-липидных систем. *А.* ламелярная гель - фаза. *Б.* ламелярная жидкокристаллическая фаза. *В.* гексагональная фаза типа II. *Г* – Гексагональная фаза типа I.

Ламелярная жидкокристаллическая фаза (L_{α}). Считается, что именно в этой фазе находится основная масса липидов в биологических мембранах. Для

этой фазы характерно упорядоченное расположение слоистых структур при значительной неупорядоченности ацильных цепей.

Ламелярная гель фаза (L_{β}). Она образуется при низкой температуре теми липидами, которые формируют слоистые структуры. В этой фазе молекулы упакованы более плотно (на молекулу приходится меньшая площадь поверхности), а ацильные цепи упорядочены и находятся преимущественно в полностью-транс-конфигурации, как в липидных кристаллах. Поскольку цепи максимально вытянуты, толщина бислоя в фазе геля выше, чем в жидкокристаллической фазе. В случае липидов, имеющих объемные полярные головки (например, дипальмитоилфосфатидилхолин), ацильные цепи наклонены относительно поверхности бислоя. Фазу с наклоном цепей обозначают штрихом (L_{β}').

Гексагональная фаза I (H_I). В этом случае липидные молекулы формируют цилиндрические структуры, поверхность которых образована полярными головками, контактирующими с водой. Сами цилиндры упаковываются с образованием гексагональной решетки.

Гексагональная фаза II (H_{II}). Липиды также образуют цилиндры, но в этом случае полярные группы обращены внутрь цилиндра и формируют водный канал. Упаковка самих цилиндров также является гексагональной.

В системах, образованных несколькими липидами, содержащих протеины, спирты, углеводороды, другие малые молекулы или полимеры положение границ областей фазовой диаграммы, соответствующих различным фазам, изменяется. Обзор современного состояния исследования фаз липидных систем можно найти в работах [4-6].

4. Локальная подвижность молекул липидов в биологических мембранах и ЯМР релаксация протонов

Молекулы липидов в биомембране находятся в жидкокристаллическом состоянии, образуют смектическую жидкокристаллическую фазу. При этом молекула сохраняет ориентацию главной оси симметрии вдоль нормали к бислою (как в твердом теле), а локальные – вращательные и колебательные движения отдельных групп достаточно развиты (как в жидкости).

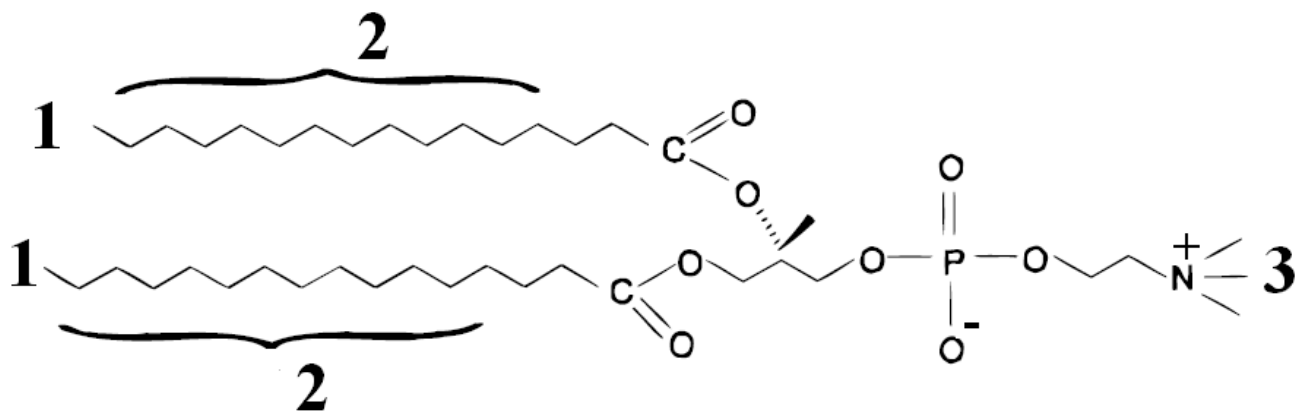


Рис.4.1. Структура молекулы дипальмитоилфосфатидилхолина. Метильные протоны CH_3 групп находятся в положениях 1 и 3 для углеводородных цепей и холиновых групп, соответственно. Метиленовые протоны углеводородных цепей находятся в положениях 2.

Сейтер и Чан [7] разработали модель для объяснения ширины линии CH_2 и CH_3 групп, наблюдаемых в спектре ^1H ЯМР мультибислоев лецитина. В этой модели находятся в состоянии анизотропного движения, что приводит к твердотельным эффектам спектра. В статье Чана [8] было показано, что дипольное взаимодействие вызывает уширение спектра. Наблюдаемые времена поперечной релаксации (T_2) для мультибислоев лецитина были около 125 мкс и не зависели от напряженности магнитного поля.

Для протонов CH_3 групп углеводородных цепей продольная ЯМР релаксация (T_1) была экспоненциальной [9]. Скорость спинового обмена между CH_3 и CH_2 группами значительно быстрее, чем скорость спин-решеточной релаксации протонов CH_3 групп. Это значит, что протоны CH_3 групп сильно

взаимодействуют с протонами CH_2 и могут, следовательно, служить стоками намагниченности. Более того, спиновая диффузия распространяется через большую часть углеводородной цепи за время значительно меньше, чем наблюдаемое T_1 , поэтому большинство метиленовых протонов не является стоками для спин-решеточной релаксации. Возможно, что менее подвижные метиленовые (CH_2) группы вблизи глицеринового основания и более удаленные от метильных (CH_3) стоков намагниченности, имеют ширину линии больше, чем в среднем. Спиновый обмен между этими протонами должен быть быстрее, чем средняя скорость релаксации для CH_2 углеводородных цепей, в этом случае метиленовые цепи должны взаимодействовать так чтобы спиновая диффузия проходила через всю цепь за время меньше чем T_1 . Измеренные времена релаксации показывают, что метиленовые группы, возможно с 2-4 подвижными метиленовыми группами, служат стоками намагниченности для всей метиленовой цепи.

CH_3 протоны холиновой группы не взаимодействуют с протонами углеводородных цепей. T_1 , измеряемые для этих протонов, не содержат вклада от спиновой диффузии. Однако метильные протоны углеводородных цепей взаимодействуют с очень большой спиновой системой, метиленовыми протонами. Для холиновых протонов и протонов CH_3 групп цепей происходит быстрая реориентация вокруг оси вращения с малыми вкладами медленных движений оси. Метиленовые протоны углеводородной цепи релаксируют через торсионные колебания цепей с небольшим вкладом в скорость релаксации от формирования кинков. В переводе с английского кинк - «петля», это участок цепи, находящийся в конформации гош(+) - транс - гош(-), формирующий уступ или петлю в углеводородной цепи. Спиновая диффузия имеет отчетливое влияние на T_1 метиленовых протонов углеводородных цепей. Более того, спиновая диффузия дает вклад во взаимную зависимость спин-решеточной релаксации метильных и метиленовых протонов углеводородных цепей [9].

Времена корреляции, полученные из температурной зависимости вблизи комнатной температуры для холиновых CH_3 протонов, составляют $\tau_{\parallel} = \approx 1 \cdot 10^{-10} - 5 \cdot 10^{-10}$ с, $\tau_{\perp} \geq \approx 4 \cdot 10^{-7}$ с, $\Delta\theta \geq 60^\circ$. Для CH_2 протонов в связанной спиновой системе $\tau_{\parallel} = \approx 1 \cdot 10^{-9} - 2 \cdot 10^{-10}$ с, $\tau_{\perp} \geq \approx 1 \cdot 10^{-7}$ с, $\Delta\beta \geq 60^\circ$. Для CH_3 протонов в углеводородной цепи $\tau_{\parallel} = \approx 1 \cdot 10^{-10} - 5 \cdot 10^{-10}$ с, $\tau_{\perp} \geq \approx 1 \cdot 10^{-7}$ с, $\Delta\theta \geq 60^\circ$ [9].

Таблица.4.1. Времена корреляции для различных типов локальных движений протонов групп молекулы липида в бислое в нормальных условиях.

Движение групп	Время корреляции, τ_c , с	Тип движения
Вращение молекулы вокруг оси	$\tau_{c_{\parallel}} < 10^{-5}$	Анизотропное, 90° вокруг оси молекулы
Переходы головных групп между двумя преимущественными гош+ и гош- конф	$< 10^{-6}$	Колебательное движение
Торсионные колебания вокруг С-С оси, метиленовые протоны цепи	$\tau_{c_{\parallel}} \sim 10^{-14}$	Анизотропное вращательное $\Delta\theta < 20^\circ$
Метильные протоны холиновой группы	$\tau_{c_{\parallel}} \sim 1-5 \cdot 10^{-10}$, $\tau_{c_{\perp}} \sim 4 \cdot 10^{-7}$	Анизотропное вращательное $\Delta\theta < 60^\circ$
Метиленовые протоны холиновой группы	$\tau_{c_{\parallel}} \sim 2-10 \cdot 10^{-10}$, $\tau_{c_{\perp}} > 10^{-7}$	Анизотропное вращательное $\Delta\theta < 60^\circ$
Метильные протоны цепи	$\tau_{c_{\parallel}} \sim 1-5 \cdot 10^{-10}$, $\tau_{c_{\perp}} \sim 4 \cdot 10^{-7}$	Анизотропное вращательное $\Delta\theta < 60^\circ$
Переходы транс-гош конформации цепи вокруг С=С связи, коротко-живущий кинк	$\tau_c \sim 10^{-9}$	Изменение угла на 120°

Молекула фосфолипида как целое не может реориентироваться со скоростью 10^9 с⁻¹, поскольку для сравнимой молекулы с одной углеводородной

цепью, которая имеет значительно меньший момент инерции, была определена скорость вращения 10^6 с^{-1} . Единственный тип движения, который происходит быстро и который может привести к реориентации вокруг оси цепи – торсионные колебания вокруг одиночной связи углерод-углерод. Это движение имеет небольшую амплитуду ($< 20^\circ$) и очень быстрое $\approx 10^{14} \text{ с}^{-1}$. Эта частота слишком высока, чтобы быть эффективным источником T_1 релаксации. Однако длинная последовательность таких слабо связанных торсионных осцилляторов будет давать вклад в большую амплитуду движений с низкой частотой, вследствие статистических флуктуаций в фазе множества осцилляторов. Качественное решение задачи большого числа (около 16) слабосвязанных торсионных осцилляторов, которые плотно ограничены в цилиндре, было бы чрезвычайно сложным. Такие осцилляторы будут давать вклад в распределение времен корреляции вокруг оси метиленовой цепи. Эти движения связаны в высокочастотной, низкоамплитудной частью с помощью одной частоты колебаний 10^{14} с .

Спектр ЯМР для произвольной системы спинов определяется спиновым Гамильтонианом H , который состоит из ряда членов, четыре из них имеют наибольший вклад:

$$H = H_Z + H_{CSA} + H_Q + H_D, \quad (4.1)$$

где H_Z – Зеемановский член, а оставшиеся три представляют собой статические взаимодействия: H_{CSA} – член, обусловленный взаимодействием с орбитальными электронами, то есть определяющий химический сдвиг, H_Q и H_D – квадрупольный и дипольный Гамильтонианы, соответственно. Преимущество использования ориентированных систем с точки зрения ЯМР обусловлено ориентационной зависимостью статических взаимодействий в «полутвердом»

образце, который представляет собой лиотропная жидкокристаллическая фаза. Все эти взаимодействия имеют общий масштабный множитель,

$$\frac{1}{2}(3 \cos^2 \theta_{LD} - 1), \quad (4.2)$$

который является вторым членом разложения полинома Лежандра $P_2(\theta_{LD})$, где θ_{LD} – угол между нормалью к бислою и постоянным магнитным полем B_0 . При вращении макроскопически ориентированного образца, угол между нормалью к бислою и B_0 может быть изменен и таким образом может быть изучена угловая зависимость некоторых параметров ЯМР. Для $\cos(\theta_{LD}) = (3)^{-0.5}$, то есть $\theta_{LD} = 54,7^\circ$, так называемого «магического угла», масштабный множитель (4.2) становится равным нулю и статические взаимодействия «магически» исчезают. При наиболее общем использовании методики ЯМР твердого тела с вращением образца под «магическим углом», образец помещается в ротор, который может быть приведен во вращение с очень высокой угловой скоростью. Тогда, при быстром вращении образца все статические взаимодействия будут спроецированы на ось вращения ротора, ось которого ориентируется под «магическим углом» относительно B_0 , при этом удаляя все статические взаимодействия в образце.

При исследовании ламеллярной фазы липидов дипольные взаимодействия между протонами будут вызывать быструю релаксацию спинов и спиновое эхо не будет формироваться. Чтобы избежать этого образец, представляющий собой макроскопически ориентированные бислои, помещается в специально сконструированный гониометр внутри датчика ЯМР. Далее образец ориентируется под «магическим углом», при этом «исчезают» статические взаимодействия и может быть получен спектр ЯМР подобный спектру от изотропной жидкости. Рисунок показывает, насколько чувствительны линии спектра относящиеся к различным протонам бислоистой системы липид/вода к

расстройке угла относительного «магического угла». Поперечная релаксация ЯМР протонов обусловленная дипольным взаимодействием пропорциональна $P_2(\theta_{LD})$ и средней константе дипольного взаимодействия. Из рисунка видно, что сигнал от протонов углеводородных цепей при 1,1 и 0,7 мд имеет большую величину константы дипольного взаимодействия, чем от протонов головных групп липидов при 3,1 мд. Сигнал от воды при 4,6 мд имеет очень маленькую константу дипольного взаимодействия, и он гораздо менее чувствителен к отклонению θ_{LD} от «магического угла».

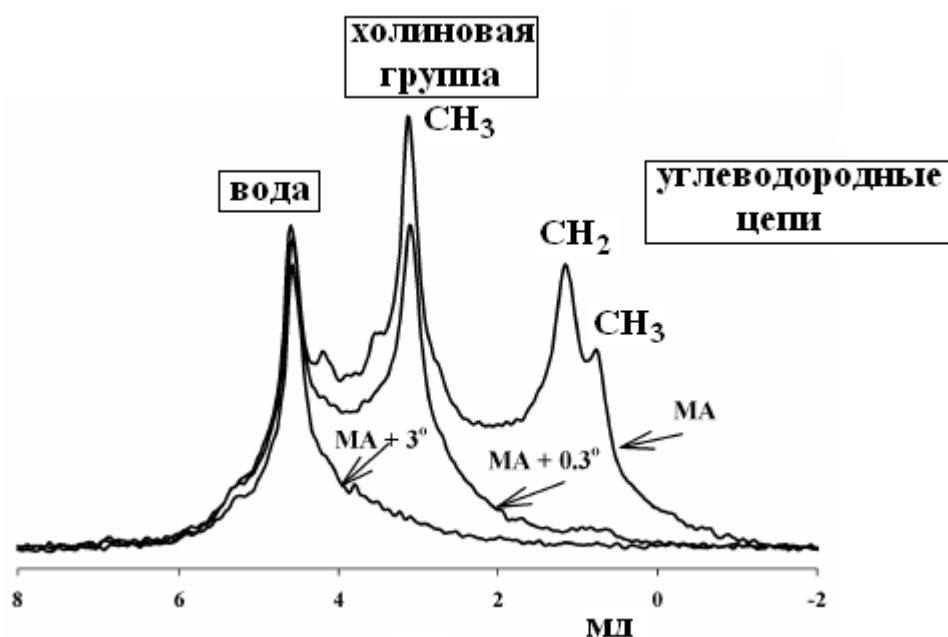


Рис.4.2. Зависимость формы спектра ^1H ЯМР в ориентированных бислоях ДМФХ от угла вблизи «магического угла» (МА).

5. Диффузия и самодиффузия. Измерение самодиффузии методом ЯМР

Термином «самодиффузия» обозначают явление пространственного перемещения молекул вещества в термодинамически равновесной среде. Самодиффузия обусловлена тепловым движением молекул.

В отличие от самодиффузии процесс диффузии происходит в неравновесной среде из-за наличия в ней градиента концентрации или, в общем случае, градиента химического потенциала.

Впервые теоретические результаты, описывающие самодиффузию (СД), были представлены Эйнштейном и Смолуховским [10]. Согласно построенной ими модели, хаотически движущаяся частица за достаточно малый промежуток времени τ_0 перемещается на расстояние l . За время t частица совершит N случайных перемещений, $N = t / \tau_0$. Считается, что в диффузионном режиме движение каждой отдельной частицы совершается независимо от других частиц, и что перемещения одной и той же частицы в разные промежутки времени длительностью τ_0 рассматриваются как независимые друг от друга (процесс Маркова [11]). Таким образом, определяется, что для времен τ_0 выполняется условие $\tau_0 \gg \tau_{\max}$, где τ_{\max} – наибольшее время корреляций, связанных со степенями свободы для наблюдаемой частицы. В таком случае траектории отдельных частиц случайны.

Чтобы математически описать процесс самодиффузии молекулы в рамках статистической физики, вводят плотность условной вероятности $W(\vec{R}, N)$ того, что частица сместится на расстояние \vec{R} за N шагов ($N \gg 1$). Выражение для $W(\vec{R}, N)$ определяют функцией Грина для случайных блужданий:

$$W(\vec{R}, N) = \left(\frac{2\pi}{3} N l^2 \right)^{-3/2} \exp\left(-\frac{3}{2} \frac{\vec{R}^2}{N l^2} \right) \quad (5.1)$$

Выражение (5.1) является решением уравнения диффузии Фика:

$$\frac{\partial}{\partial N} W(\vec{R}, N) = \frac{l^2}{6\tau_0} \Delta W(\vec{R}, N), \quad (5.2)$$

где Δ – оператор Лапласа. Численный коэффициент в правой части уравнения (5.2) называют коэффициентом самодиффузии (КСД) частицы D , и для рассматриваемой модели случайных блужданий он определяется как

$$D = \frac{l^2}{6\tau_0}. \quad (5.3)$$

Параметром, непосредственно характеризующим диффузионное перемещение наблюдаемой молекулы в период времени t , выступает величина среднеквадратичного смещения частицы $\langle \bar{R}^2(t) \rangle$. Результатом теории СД, демонстрирующим связь между $\langle \bar{R}^2(t) \rangle$ и коэффициентом D , является соотношение Эйнштейна [10], получившее многократное экспериментальное подтверждение:

$$\langle \bar{R}^2(t) \rangle = 6Dt. \quad (5.4)$$

С другой стороны, величина $\langle \bar{R}^2(t) \rangle$ на временах $t \gg \tau_{\max}$ может быть найдена через кинетические характеристики частицы – через автокорреляционную функцию скорости молекулы $\langle \vec{V}(t) \cdot \vec{V}(0) \rangle$, где $\vec{V}(t)$ и $\vec{V}(0)$ есть, соответственно, скорости частицы в момент времени t и в начальный момент времени.

$$\begin{aligned} \langle \bar{R}^2(t) \rangle &= \left\langle \int_0^t \int_0^t \vec{V}(\tau_1) \vec{V}(\tau_2) d\tau_1 d\tau_2 \right\rangle = \int_0^t \int_0^t \langle \vec{V}(\tau_1) \vec{V}(\tau_2) \rangle d\tau_1 d\tau_2 = \\ &= 2t \int_0^\infty \langle \vec{V}(\tau_1) \vec{V}(\tau_2) \rangle d\tau \end{aligned} \quad (5.5)$$

Соотнося (5.4) и (5.5), получают строгое выражение для КСД:

$$D = \frac{1}{3} \int_0^\infty \langle \vec{V}(t) \cdot \vec{V}(0) \rangle d\tau. \quad (5.6)$$

Полезным выводом теории СД, в смысле эффективного применения на практике, является формула Эйнштейна-Стокса [10], дающая простую связь между значениями КСД D и геометрическим размером диффундирующей молекулы a через коэффициент ее трения в растворителе f :

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 a}, \quad (5.7)$$

где k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура раствора, η_0 – вязкость чистого растворителя при данной температуре.

Формула (5.7) справедлива для молекул, чьи линейные размеры существенно больше размеров молекул растворителя (другими словами, когда можно считать, что молекула движется в сплошной среде), и когда взаимодействиями исследуемой молекулы с такими же соседними частицами можно пренебречь. Задача теоретического описания СД макромолекул в более концентрированных растворах решается в рамках теорий, которые строятся не только на основах статистической физики, но и учитывают динамические взаимодействия между макромолекулами и молекулами растворителя в системе [12].

Метод ЯМР спектроскопии

Явлением ядерного магнитного резонанса (ЯМР) называют поглощение электромагнитной энергии ядрами с полуцелым спином (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P и др.), помещенных в постоянное магнитное поле [13].

ЯМР методики позволяющие получить информацию о величине КСД макромолекул [12] основываются на возможности изменять направление вектора макроскопической намагниченности системы следующим образом. Воздействуя в течение некоторого времени t на спиновую систему в поле \vec{H}_0 переменным электромагнитным полем резонансной частоты $\nu_0 = \omega_0/2\pi$, магнитная составляющая которого \vec{H}_1 перпендикулярна \vec{H}_0 , вектор намагниченности \vec{M} можно повернуть относительно \vec{H}_0 на угол θ . Подбирая длительность радиочастотного (РЧ) импульса, создающего в образце поле с магнитной составляющей \vec{H}_1 , вектор \vec{M} можно повернуть на угол 90° или

180°. РЧ импульсы, поворачивающие намагниченность на эти углы называют, соответственно, 90°- или 180°-импульсами. Если систему спинов (образец) поместить в катушку (приемно-передающую катушку), ось которой направлена перпендикулярно полю \vec{H}_0 , то с ее помощью можно и создавать поле \vec{H}_1 , и детектировать сигнал индукции, появляющийся после воздействия на спиновую систему 90°-импульсом. Амплитуда полученного сигнала $A(0)$ будет пропорциональна величине макроскопической намагниченности \vec{M} . С течением времени амплитуда такого сигнала ЯМР уменьшается. Система спинов, оказавшаяся при воздействии на нее поля \vec{H}_1 в неравновесном состоянии, после выключения РЧ импульса будет постепенно возвращаться (релаксировать) к своему равновесному (первоначальному) состоянию, благодаря процессам ядерной магнитной (ЯМ) релаксации. Другой причиной, приводящей к уменьшению амплитуды сигнала в катушке, а, следовательно, и перпендикулярной направлению \vec{H}_0 составляющей намагниченности M_{\perp} , является неоднородность постоянного магнитного поля в объеме исследуемого образца. Таким образом, спины, находящиеся в разных магнитных полях, будут прецессировать с различными частотами, что приведет со временем к уменьшению M_{\perp} за счет потери фазовой когерентности между отдельными магнитными ядерными моментами. Если через промежуток времени τ после 90° РЧ импульса подействовать на систему 180°-импульсом, то к моменту 2τ моменты резонирующих ядер снова станут когерентными и в приемно-передающей катушке возникнет сигнал – сигнал спинового эха. Впервые такая импульсная методика для получения сигнала ЯМР была предложена Ханом.

Влияние трансляционной подвижности молекул на сигнал ЯМР

Рассмотрим систему спинов, перемещающихся по объему образца в неоднородном постоянном магнитном поле. Как указывалось выше, в зависимости от своего пространственного положения в таком образце, различные спины прецессируют с различными Ларморовыми частотами. Это приводит к уменьшению составляющей намагниченности M_{\perp} из-за расфазировки спинов. Воздействуя на спиновую систему последовательностью РЧ импульсов $90^{\circ} - \tau - 180^{\circ}$, в момент времени 2τ при условии $2\tau \ll T_2$ получают сигнал спинового эха, амплитуда которого будет практически равна амплитуде сигнала индукции $A(0)$ после первого 90° . Однако если резонирующее ядро за время эксперимента t меняет свое положение в пространстве, перемещаясь, таким образом, в неоднородном магнитном поле с некоторым градиентом $\vec{g}_0 = d\vec{H}_0/d\vec{r}$, то вследствие непрерывного изменения частоты прецессии рассматриваемого магнитного ядерного момента, его перемещение \vec{r} будет характеризоваться относительным изменением фазы прецессии:

$$\Phi(t) = -\gamma \int_0^t \vec{g}_0 \vec{r}(t') dt', \quad (5.8)$$

которую в рассматриваемом случае нельзя будет восстановить последующим действием 180° импульса. В результате амплитуда сигнала спинового эха $A(t)$ будет меньше по сравнению с $A(0)$ в Ψ раз и будет, таким образом, содержать информацию о пространственном перемещении спина и содержащей его молекулы.

В случае броуновского движения (самодиффузии) молекул в образце, величина Ψ определяется функцией *пропагатора* $P(\vec{r}, t)$, которая является

плотностью условной вероятности того, что за время t резонирующее ядро совершит перемещение \vec{r} :

$$\Psi = \int_{-\infty}^{\infty} P(\vec{r}, t) \cos \Phi d\vec{r}. \quad (5.9)$$

Для неограниченной самодиффузии молекул в гомогенной среде пропагатор имеет вид функции Гауссового распределения:

$$P(\vec{r}, t) = (4\pi Dt)^{-3/2} \exp\left[-\vec{r}^2 / (4Dt)\right], \quad (5.10)$$

где D – коэффициент самодиффузии молекул.

Тогда с учетом (5.8) – (5.10) и соотношения Эйнштейна

$$\Psi(t, g_0) = \exp(-\gamma^2 g_0^2 Dt^3) = \exp\left(-\gamma^2 g_0^2 t^2 \langle \vec{r}^2(t) \rangle / 6\right). \quad (5.11)$$

Таким образом, амплитуда сигнала спинового эха в рассматриваемом случае будет функцией не только времен релаксации, но и величины среднеквадратичного смещения резонирующих ядер $\langle \vec{r}^2(t) \rangle$, которое они совершили за время эволюции системы t .

Импульсные последовательности для измерения коэффициентов самодиффузии молекул

Последовательность Хана. Двух-импульсная последовательность Хана является одним из простых способов получения информации о СД молекул в конденсированных средах. Последовательность может быть условно записана следующим образом: $90^\circ - \tau - 180^\circ - 2\tau$ (спиновое эхо).

В методике Хана амплитуда спинового эха для системы диффундирующих спинов имеет вид:

$$A(2\tau, g_0) = A(0) \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \Psi = A(0) \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \exp\left(-\frac{2}{3} \gamma^2 g_0^2 \tau^3 D\right), \quad (5.12)$$

где τ – время между первым и вторым РЧ импульсами, T_2 – время поперечной релаксации, γ – гиромагнитное отношение для резонирующих ядер, g_0 – постоянный градиент магнитного поля.

Требую сохранения амплитуды сигнала эха, величину измеряемого КСД можно уменьшить, если увеличить время эволюции системы τ или градиент магнитного поля g_0 . Изменение τ ограничено условием $\tau \leq T_2$; градиент магнитного поля может быть в принципе увеличен на любую величину, но он должен быть минимально возможным в моменты включения РЧ импульсов и в момент измерения эха, поскольку в противном случае нарушается условие резонанса в пределах образца, и формирование сигнала будет невозможным. Во всех остальных промежутках импульсной последовательности градиент может быть достаточно большим.

Практическим решением задачи измерения сравнительно малых КСД ($D < 10^{-12} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$) стала предложенная Стейскалом и Таннером [14] методика импульсного градиента магнитного поля (ИГМП) g , который в последовательности Хана включают между 90° и 180° РЧ импульсами и между 180° импульсом и моментом измерения сигнала спинового эха. При условии $g\delta \gg g_0\tau$ амплитуда спинового эха определяется соотношением:

$$A(2\tau, g) = A(0) \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \exp\left(-\gamma^2 \delta^2 g^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right), \quad (5.13)$$

где δ – длительность ИГМП, Δ – промежуток времени между ИГМП. Время t_d , за которое формируется «диффузионный вклад» в затухание сигнала спинового эха Ψ , называют временем диффузии, $t_d = \Delta - \delta/3$.

Последовательность стимулированного спинового эха

Проблема увеличения времени диффузии в ЯМР эксперименте до значений больших, чем время спин-спиновой релаксации, вполне успешно решается с помощью последовательности стимулированного эха, в которой определяющую роль в релаксационном уменьшении амплитуды сигнала эха оказывает не T_2 , а величина времени продольной ЯМР релаксации исследуемой системы T_1 . Данная последовательность представлена на Рис.5.1.

В простейшем случае одно-экспоненциальной ЯМ релаксации для однокомпонентной (с точки зрения ЯМР-диффузометрии системы) амплитуда сигнала стимулированного спинового эха при $g_0 \ll g$ удовлетворительно описывается выражением:

$$A(2\tau, \tau_1, g) = \frac{A(0)}{2} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{\tau_1}{T_1}\right) \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 Dt_d) =$$

$$= A(2\tau, \tau_1, 0) \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 Dt_d) \quad (5.14)$$

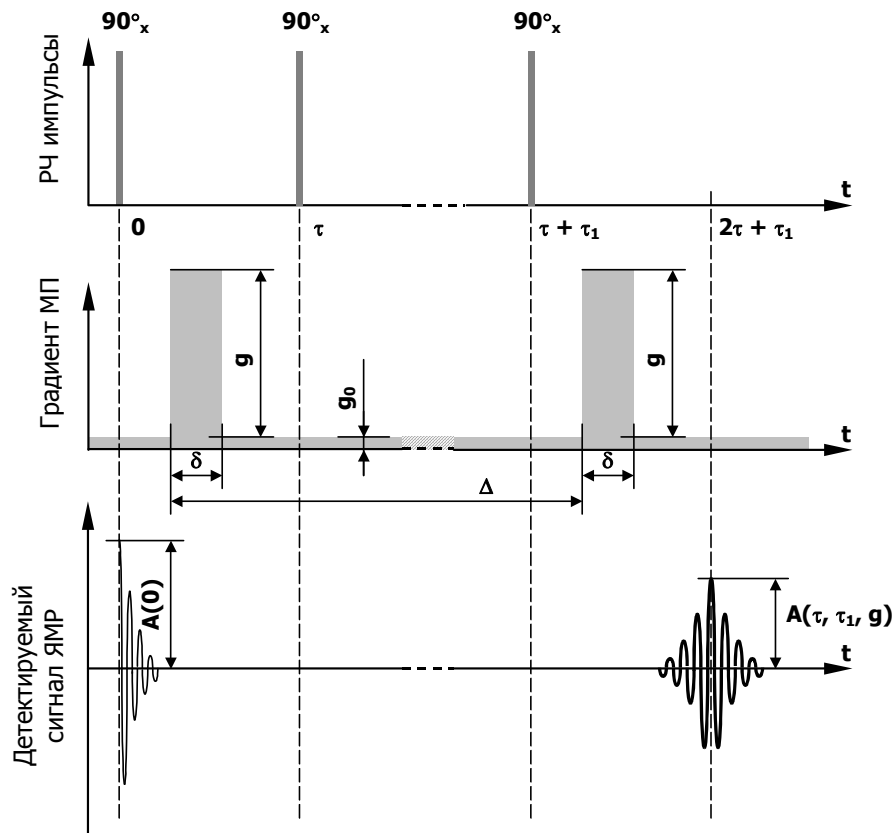


Рис. 5.1. Импульсная последовательность стимулированного спинового эха.

На Рис.5.1. и в выражении (5.14) $A(0)$ – амплитуда сигнала свободной индукции; τ, τ_1 – интервалы времени, соответственно, между первым и вторым, и вторым и третьим 90° РЧ импульсами; γ – гиромагнитное отношение резонирующих ядер; δ, g – длительность и амплитуда ИГМП, соответственно; $A(2\tau, \tau_1, 0)$ – амплитуда сигнала стимулированного спинового эха при $g = 0$; $t_d = \Delta - \delta/3$ – время диффузии; Δ – время между импульсами градиента магнитного поля; D – КСД исследуемых частиц.

6. Физические модели липидного бислоя биологических мембран

Биологические мембраны сложны по составу, они включают сотни видов различных типов молекул – воду, липиды, белки, стероиды, полисахариды и др. Следствием этого является присутствие множества различных межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий, локальная неоднородность состава, усложнение фазовой структуры (присутствие подфаз в пределах ламеллярной жидкокристаллической фазы, присутствие неламеллярных фаз), сложный анизотропный характер локальной и трансляционной подвижности молекул. Кроме того, мембрана является живым органом клетки, а значит, находится в термодинамически неравновесных условиях, взаимодействуя при этом с внутренними структурами клетки и окружением, которые представляют собой растворы (иногда достаточно концентрированные), содержащие малые молекулы, ионы и макромолекулы.

Один из подходов к приготовлению модели биомембраны, на которой можно было бы в «чистом виде» наблюдать интересующие нас процессы и исследовать влияние различных внешних факторов и состава, заключается в

последовательном упрощении реальной живой системы. Мембраны могут быть выделены и отмыты, при этом клетка погибает. Примером тому являются «тени» эритроцитов. Для такого типа моделей прекращаются процессы, связанные с потреблением энергии, однако появляется возможность исследовать пассивный транспорт воды и ионов через мембрану.

Следующий шаг по пути упрощения системы заключается в удалении белков из мембраны и получении липидного бислоя. Это может быть использовано как для исследования влияния липид-липидных взаимодействий, так и для выяснения роли взаимодействий липидов с белками на свойства бислоя. В действительности, можно, используя детергенты удалить периферические белки, однако интегральные белки не могут быть удалены из мембраны без ее разрушения.

Другой подход к приготовлению модели биомембраны заключается в ее реконструкции из липидных и, при необходимости, других компонентов (при обязательном использовании липида в качестве, по крайней мере, одного из компонентов). Этот подход основан на том, что амфифильные молекулы липидов в присутствии воды самопроизвольно, путем «самосборки», образуют жидкокристаллическую фазу, которая при подходящем выборе состава, температуры и гидратации формирует бислой. В этом случае система обычно представляет собой множество однослойных или многослойных везикул в окружении воды. Например, если мы хотим, используя клеточный материал (например, тени эритроцитов), получить бислой без белков, то следует обработать этот материал детергентами (поверхностно активными веществами), при этом мембраны будут разрушены. Далее выделяется часть смеси, содержащая липиды, из которой затем удаляются детергенты и растворители, в результате получается дегидратированная (обезвоженная) смесь мембранных липидов. Эта смесь гидратируется. В зависимости от технологии приготовления таким образом можно получить однослойные или многослойные везикулы.

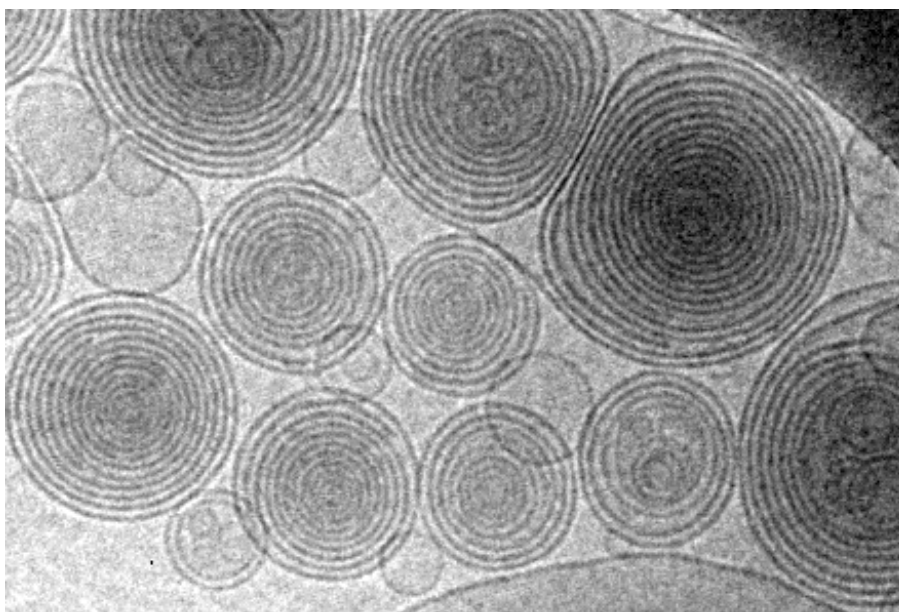


Рис.6.1. Мультибислойные липидные везикулы, образованные при гидратации лецитина.

При использовании соответствующих детергентов липиды мембраны могут быть разделены на фракции (фосфолипиды, сфинголипиды и др.). Перед гидратацией в смесь липидов может быть добавлен один или несколько белков, стероидов или других молекул. Таким образом могут быть приготовлены бислои различного состава. Для проведения исследований на более однородных по составу системах при приготовлении бислоев используют синтетические липиды.

Монобислойные и мультибислойные везикулы более близки по размерам и форме к клеткам, однако при проведении некоторых экспериментов более удобным или даже исключительно приемлемым оказывается плоский бислой. Например, для измерения латеральной диффузии липидов методом ЯМР требуется ориентация всех участков бислоя с высокой точностью относительно направления магнитного поля. Это может быть достигнуто только при использовании плоских бислоев. Для приготовления плоских бислоев используют подложку – стеклянную или слюдяную пластинку. Пластинка однородно покрывается слоем обезвоженного липида, затем система

гидратируется. При гидратации происходит самосборка системы мультибислоев каждый из которых параллелен плоскости пластинки. Таким способом на одной пластинке может быть получена мультибислоидная система из нескольких тысяч взаимно параллельных бислоев, разделенных слоями воды. Укладывая несколько пластинок с бислоями один на другой можно получить сотни тысяч взаимно параллельных бислоев.

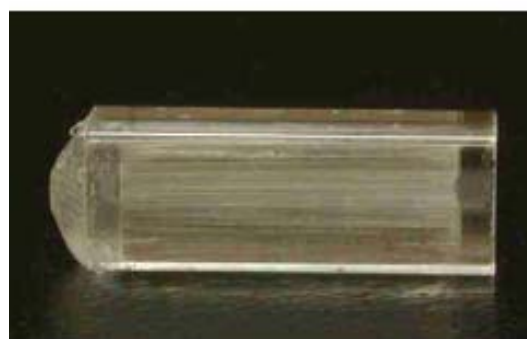
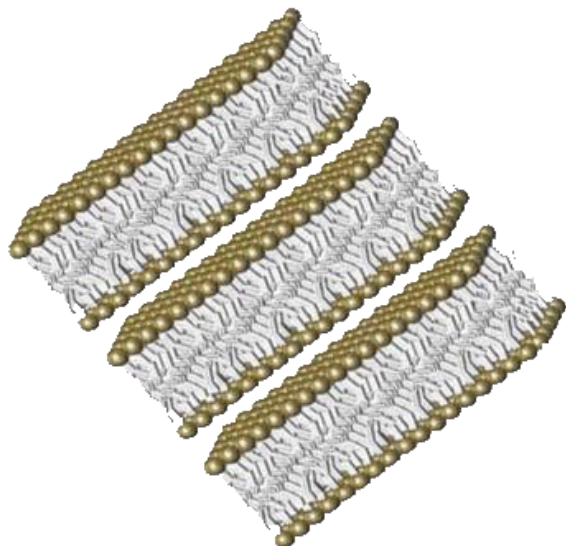


Рис.6.2. Слева – схематическое изображение системы бислоев, ориентированных на стеклянной пластинке. Справа – образец для исследования латеральной диффузии липидов, представляющий собой около 60 взаимно параллельных стеклянных пластинок, около 2000 плоских бислоев на каждой пластинке.

Приготовление везикул. Дегидратированный (обезвоженный) липид, смесь липидов или смесь липидов с протеинами, стеринами или другими веществами растворяется в органическом растворителе, этим достигается совмещение компонентов на молекулярном уровне. Обычно в качестве растворителя используется метанол или смесь метанола с хлороформом. Раствор помещается в колбу с плоским дном или полусферическим дном, затем растворитель выпаривается в потоке газа азота или аргона или в ротационном испарителе. После выпаривания липид содержит небольшое количество

(«следы») растворителя, которые могут повлиять на результаты экспериментального исследования, поэтому колба вакууммируется в течение от часа до нескольких суток для удаления «следов» растворителя. Для ускорения испарения растворителя колбу подогревают до 30-40°C.

Приготовленная и высушенная на дне колбы пленка липида гидратируется при добавлении необходимого количества водного буфера. При малых количествах воды образуются мультибислойные везикулы, а при больших концентрациях – монослойные везикулы, поэтому при приготовлении системы следует принимать во внимание фазовую диаграмму липида, например из литературы. При гидратировании система тщательно перемешивается с помощью шейкера. Для достижения большей однородности система несколько раз проводится через температуру фазового перехода липида путем охлаждения и нагревания. Полученная таким образом система достаточно неоднородна, поэтому для получения монослойных везикул однородных по размерам используют карбонатные фильтры, например фирмы “Millipore”.

Приготовление плоских ориентированных бислоев. Раствор липида готовится так же, как описано выше. Часто в качестве растворителя для замедления испарения растворителя и получения более однородной пленки используют смесь метанола с пропанолом. Стеклянные или слюдяные пластинки раскладывают на подложке, и на каждую пластинку с помощью пипетки наносят раствор липида. После испарения основной массы растворителя подложку с пластинками помещают в вакууммируемую камеру на время от одного до нескольких часов для удаления «следов» растворителя. Высушенные пластинки собирают в стопку и помещают в ампулу ЯМР. Гидратация производится во влажной атмосфере в течение от двух дней до недели. Контроль за ходом гидратации производят, взвешивая образец. После завершения гидратации содержание воды в системе бислоев составляет обычно

23-27 вес.%. В процессе гидратации липид образует жидкокристаллическую фазу, это контролируется по просветлению первоначально мутного образца и по вращению плоскости поляризации света.

7. Латеральная диффузия липидов

Латеральная диффузия – это самодиффузия молекул липидов в плоскости бислоя. Движение молекул липидов ограничено плоскостью, однако в условиях термодинамического равновесия оно представляет собой Брауновское случайное блуждание по поверхности бислоя и средний квадрат смещения описывается соотношением:

$$\langle r^2 \rangle = 6D_L t_d, \quad (7.1)$$

где D_L – коэффициент латеральной диффузии.

Протеины, полисахариды и другие малые гидрофобные молекулы в бислое также перемещаются по поверхности бислоя, и их движение характеризуется коэффициентом латеральной диффузии.

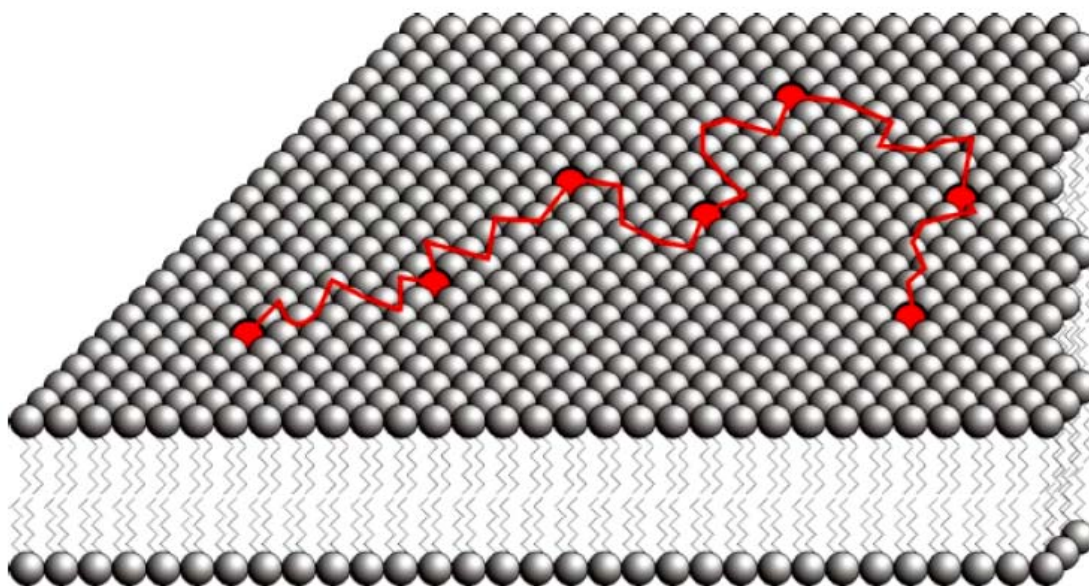


Рис.7.1. Схематическое изображение латеральной диффузии молекулы липида в плоскости бислоя.

Измерения, выполненные методом ЯМР, показывают, что в однокомпонентных бислоях липидов диффузионные затухания стимулированного эхо ЯМР имеет двухкомпонентный вид (Рис.7.2):

$$A(g, \delta, t_d) = P_1 \cdot \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 D_1 t_d) + P_2 \cdot \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 D_2 t_d), \quad (7.2)$$

где D_1 – коэффициент, связанный с диффузией воды между бислоями, D_2 – коэффициент, связанный с латеральной диффузией липидов. Если нормаль к бислоям ориентирована под углом θ к направлению импульсного градиента магнитного поля и составляющие диффузии молекул липида вдоль и поперек бислоя D_L и D_{\perp} , то проекция диффузии молекул на направление импульсного градиента:

$$D = D_L \cdot \sin^2 \theta + D_{\perp} \cdot \cos^2 \theta. \quad (7.3)$$

Для бислоев ориентированных под магическим углом ($54,7^\circ$) $\sin^2\theta=2/3$, а D_{\perp} можно пренебречь, поэтому $D = (2/3) \cdot D_L$.

Затухание сигнала при малых значениях импульсного градиента поля вызвано, в основном, диффузией воды между плоскими бислоями (пунктирная линия) и описывается значением коэффициента самодиффузии 10^{-10} - 10^{-9} м²/с. Компонента, которая наблюдается при бóльших значениях импульсного градиента поля обусловлена латеральной диффузией молекул липида с коэффициентом латеральной диффузии 10^{-13} - 10^{-11} м²/с. Отметим, что для бислоя с одним типом липида форма этой части диффузионного затухания описывается линейной зависимостью в координатах графика (штриховая линия). Это значит, что - либо диффузия всех молекул липида характеризуется единственным коэффициентом латеральной диффузии, - либо бислоем содержит неоднородности с коэффициентом латеральной диффузии липидов в них, отличающимся от среднего значения, однако диффузия молекул липидов между

различными областями бислоя происходит за времена значительно меньшие, чем время измерения диффузии в эксперименте ЯМР ИГМП. Таким образом, эксперимент ЯМР ИГМП не дает оснований считать, что латеральная диффузия в бислоях, образованных одним липидом, неоднородна. Аналогичный вывод можно сделать и на основании данных полученных методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания [15].

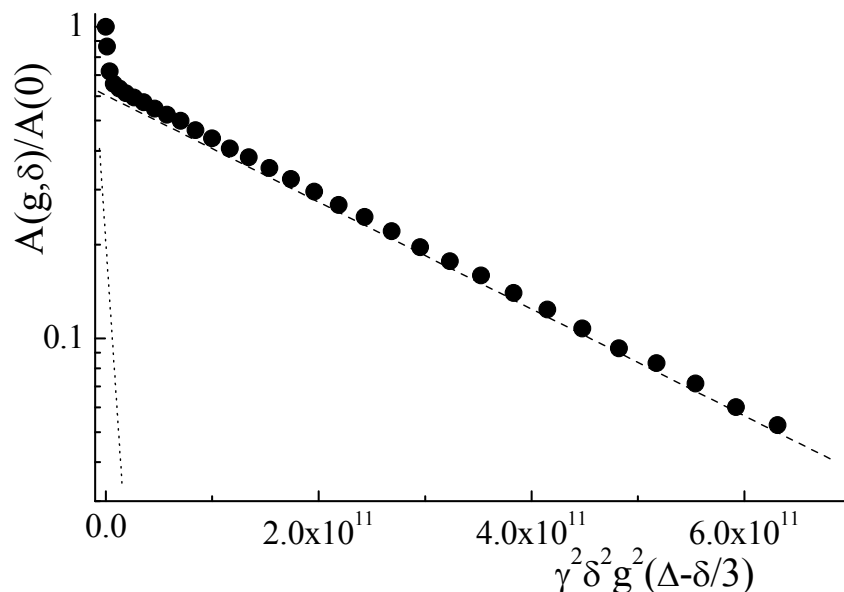


Рис.7.2. Диффузионное затухание стимулированного эхо, полученное для системы плоских бислоев ДОФХ при концентрации воды в системе 25 моль % и $T=25^{\circ}\text{C}$ [16]. Нормаль к бислоям ориентирована под «магическим углом» к направлению постоянного магнитного поля. Штриховая линия показывает участок, соответствующий проекции латеральной диффузии липидов, пунктирная линия – проекция диффузии воды между липидными бислоями на направление импульсного градиента магнитного поля..

Значения коэффициентов латеральной диффузии для некоторых липидов и протеинов представлены в Таблице 7.1.

Таблица 7.1. Значения коэффициентов латеральной диффузии некоторых липидов, холестерина и протеинов.

Система	Температура, °С	D_L , мкм ² /с	Ссылка
<u>Моноолеин</u> -вода	22	11	
<u>ДОФХ</u> -вода	25	9,3	[16]
<u>ПОФХ</u> -вода	25	8,9	[16]
<u>ДМФХ</u> -вода	25	5,7	[16]
<u>ДПФХ</u> -вода	45	11,8	[17]
<u>СМ</u> -вода	45	5,8	[16]
<u>ДМФХ-холестерин</u> -вода	25		[18]
<u>Грамицидин С</u> – <u>ДМФХ</u> – вода	25	3	[19]
<u>Гликофорин</u> – <u>ДМФХ</u> – вода	25	1,3	[20]
<u>Бактериородопсин</u> – <u>ДМФХ</u> – вода	25	8	[21]

Для описания температурной зависимости коэффициента самодиффузии простых жидкостей вдали от температуры перехода в твердое агрегатное состояние часто используют представления Аррениуса, которые были первоначально предложены для описания температурной зависимости скорости химических реакций. При использовании подхода типа Аррениуса температурные зависимости коэффициента диффузии представляют в виде:

$$D = D_0 \cdot \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right), \quad (7.4)$$

где D_0 – постоянная. Из наклона этих зависимостей в координатах $\ln(D) - 1/T$ определяют параметр E_D , энергия активации самодиффузии. Подход Аррениуса является феноменологическим, между тем он может быть полезен для качественного рассмотрения и сравнительного анализа.

Температурные зависимости для трех фосфатидилхолинов в интервале температур от 25 до 60°С показаны на Рис.7.3. Видно, что они хорошо

описываются прямолинейными зависимостями в координатах Аррениуса. Энергия активации самодиффузии уменьшается при увеличении числа углеводородных цепей с двойной связью.

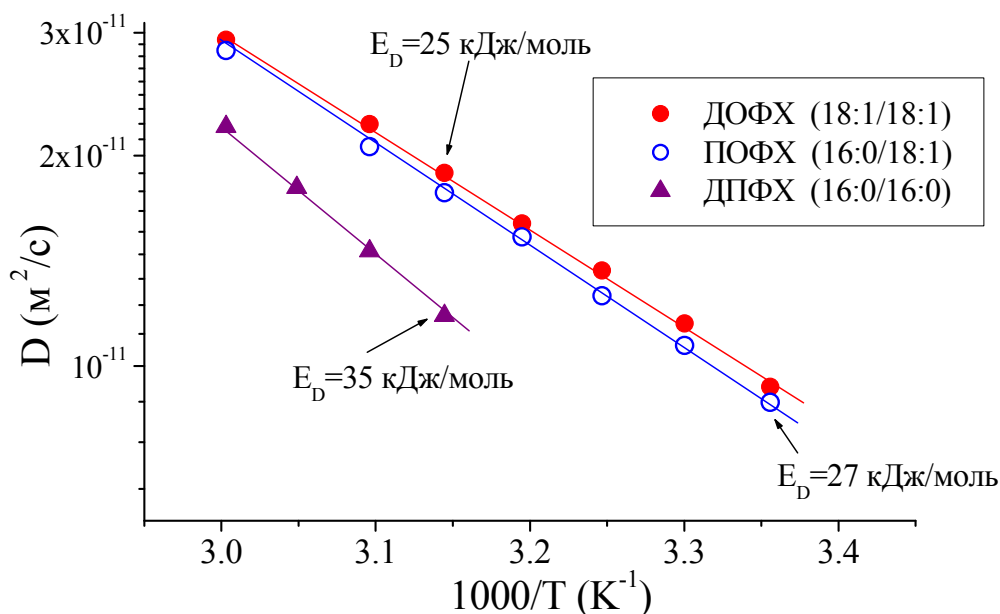


Рис.7.3. Температурные зависимости коэффициента латеральной диффузии для трех фосфатидилхолинов.

8. Описание латеральной диффузии липидов с помощью феноменологических моделей

Для описания латеральной диффузии липидов используются несколько феноменологических подходов. В связи со сложностью липидного бислоя каждая из моделей предполагает определенное упрощение реальной физической ситуации, в соответствии с этим модели могут быть разделены на две основные категории – гидродинамические и теории свободного объема.

Гидродинамическая модель. Гидродинамические модели рассматривают мембрану как двумерную непрерывную жидкость, в которой коэффициент диффузии частицы может быть найден путем решения уравнения Навье-Стокса с граничными условиями в водной фазе вне бислоя. В таком приближении молекулярная структура мембраны не принимается в расчет, а свойства мембраны полностью определяются коэффициентом вязкости, толщиной и двумерной анизотропной природой бислоя. Размер диффундирующей частицы полагается много больше, чем размер молекул растворителя. Гидродинамическое уравнение, описывающее движение жидкости внутри и вне мембранного листа является уравнением Навье-Стокса в пределе малого значения числа Рейнольдса [22]:

$$-\nabla P + \eta_0 \Delta v + F = 0, \quad (8.1)$$

где P – давление, η_0 – вязкость в середине бислоя, v – скорость, F – внешняя сила, приложенная к единице объема жидкости. Коэффициент диффузии молекулы в жидкости вычисляется из уравнения Эйнштейна-Стокса:

$$D = kT / f, \quad (8.2)$$

где f – коэффициент трения молекулы. Это полный аналог случаю трехмерной диффузии, для которого, согласно Стоксу, $f=6\pi\eta_0 r$ для сферы радиуса r . Однако для малых значений числа Рейнольдса из уравнения Навье-Стокса невозможно определить коэффициент трения в бесконечно протяженной двумерной жидкости (парадокс Стокса) [22]. Существуют различные приближения для выхода из этой ситуации. Саффман (1976) исследовал ситуацию, когда вязкость водной фазы значительно меньше вязкости мембраны, и получил выражение для коэффициента трения в виде:

$$f = 4\pi\eta_0 h (-\gamma + \log(\eta_0 h / \eta' R_c))^{-1}, \quad (8.3)$$

где η' – вязкость водной фазы, h – толщина мембраны. Более детальное описание гидродинамических моделей биомембраны можно найти в обзоре [23]. Эксперименты показали, что гидродинамическая модель не применима к описанию диффузии липидов в бислоях фосфатидилхолинов в ЖК фазе [24], однако она может быть использована для описания латеральной диффузии больших интегральных протеинов с радиусом больше 15 Å, которые пронизывают мембрану.

Модель свободного объема. Главный принцип теорий свободного объема заключается в том, что движение молекулы происходит благодаря наличию свободного объема вблизи молекулы. Различие между разными теориями свободного объема заключается в механизме, посредством которого этот свободный объем образуется. Коэн и Турнбул первыми разработали теорию свободного объема для молекулярной диффузии в конденсированных жидкостях (Cohen, 1959). Эта теория основана на концепции, что молекулярная диффузия происходит, когда свободный объем больше, чем критический объем V^* , созданный по соседству с молекулой диффузанта. Вероятность диффузионного прыжка в первом приближении пропорциональна вероятности, что имеется пустое пространства достаточного размера. Свободный объем определяется как

$$V_f = V_{av} - V_0, \quad (8.4)$$

где v_{av} – средний объем, приходящийся на молекулу, v_0 – Ван дер Ваальсов объем молекулы. Полагается, что текучесть жидкости увеличивается линейно с удельным объемом жидкости, то есть плотность – важный фактор, определяющий вязкость жидкости. Ван дер Ваальсов объем молекулы близок к

объему молекулы при температурах ниже температуры перехода в стеклообразное состояние.

Трехмерная модель свободного объема для диффузии в стеклах (Cohen, 1959) была переопределена Галла с соавторами (1979) для применения к двумерной диффузии липидов внутри бислоев. McCarthy and Kozak (1982) вывели выражение для двумерной диффузии липидов в бислоях и монослоях используя приближение свободного объема. Дальнейшая модификация теории включала учет влияния вязких сил в водной фазе и в центре бислоя на коэффициент латеральной диффузии (Vaz, 1985).

Ваз, Глегг и Халлман [24] описали температурную зависимость коэффициента латеральной диффузии в бислоях ПОФХ, ДМФХ ДПФХ с помощью уравнения:

$$D_t = (k \cdot T / f) \exp(-\gamma \cdot a^* / (a_0 (\beta + \alpha_a (T - T_m))))), \quad (8.5)$$

где f – коэффициент трения со стороны воды и центра бислоя, γ – численный фактор, учитывающий перекрывание свободных объемов (между 0,5 и 1), a^* – критический свободный объем, a_0 – площадь приходящаяся на молекулу липида в бислое, $a_0\beta$ – свободный объем при температуре перехода в гель фазу T_m и α_a – коэффициент двумерного температурного расширения в ЖК фазе. При описании экспериментальных температурных зависимостей коэффициентов латеральной диффузии Ваз с соавторами [24] кроме данных, полученных независимо (T_m , a_0 , α_a) подбирали параметры (вязкость на поверхности бислоя и в его середине, которые связаны с коэффициентами трения с водой и в середине бислоя f_1 , f_2). Таким образом, можно считать вывод, что не найдено препятствий для описания экспериментальных результатов моделью свободного объема.

Модель свободного объема была успешно применена Альмейдой с соавторами для описания эффектов холестерина на латеральную диффузию ДМФХ [15]. Было показано, что выше T_m бислой может существовать в двух

состояниях, которые отличаются свободными объемами: одно из состояний имеет широкое распределение свободных объемов, а другое – относительно более узкое. В бислоях фосфолипидов добавление холестерина и понижение температуры эквивалентны, более того, изменение свободного объема – общий фактор этих двух процессов. Более детальное описание гидродинамических моделей биомембраны можно найти в обзоре [23]. В последнее время на страницах «Biophysical Journal» происходило обсуждение предсказательных возможностей модели свободного объема для диффузии фосфолипидов [25-27].

9. Диффузия липидов в условиях латерального фазового разделения

В области физиологических температур и концентраций воды биомембрана находится в жидкокристаллическом (ЖК) фазовом состоянии. В последние годы получили распространения представления, что ЖК липидный бислой неоднороден не только по составу, но и по фазовому состоянию. Межмолекулярное взаимодействие приводит к образованию доменов фазы, которая промежуточна по степени упорядоченности между обычным ЖК состоянием однородного липидного бислоя (называемого также неупорядоченной ЖК фазой и обозначаемого l_d) и твердым состоянием бислоя или гель-фазой (s). Эта новая фаза называется упорядоченной ЖК фазой и обозначается l_o .

Домены упорядоченной ЖК фазы получили название “rafts”, в переводе с английского «плоты». Полагают, что “rafts” играют особую роль во встраивании протеинов в биомембрану, перемещении липидов и протеинов в бислое, переносе больших молекул через мембрану, передаче сигнала, почковании вирусов и других процессах [28-30]. На основании данных по разделению компонент мембраны с помощью детергентов было предположено, что домены

“rafts” имеют более высокую по сравнению с окружающим бислоем концентрацию сфинголипидов и холестерина. Несмотря на большое число работ по исследованию “rafts”, до сих пор нет определенности в вопросах, касающихся механизмов образования доменов в клеточных мембранах, их размеров и стабильности, взаимодействия молекул, приводящего к образованию “rafts”. Особенный интерес представляет диффузия молекул липидов в мембране в присутствии доменов, так как локальное изменение состава и наличие фазовых границ может дать важную информацию о взаимодействиях и структуре.

Латеральная диффузия в присутствии холестерина. Особую роль в образовании мембранных доменов “rafts” играет холестерин. За последние 70 лет выполнено огромное число исследований холестерина в липидных мембранах, однако полного понимания роли холестерина на функции мембраны на молекулярном уровне не было достигнуто. Одно из уникальных физико-химических свойств холестерина – конденсирующий эффект. Методами ЯМР на ^2H было показано, что присутствие холестерина в жидкокристаллической фазе резко увеличивает упорядочивание углеводородных цепей липидов. С другой стороны, присутствие холестерина в гель-фазе уменьшает упорядоченность цепей. Проницаемость ЖК бислоя в присутствии холестерина уменьшается. Еще одно важное свойство холестерина – устранение фазового перехода между ЖК и гель-фазой.

Детальная фазовая диаграмма ДПФХ-холестерин была получена в 1990 году методом ЯМР спектроскопии на ^2H [31]. На этой фазовой диаграмме впервые была получена двухфазная область, образуемая при перекрывании двух однофазных областей – одна из областей с низким содержанием холестерина - I_d фаза, вторая – с высоким содержанием холестерина - I_o фаза. Эта фазовая диаграмма была воспроизведена теоретически [32].

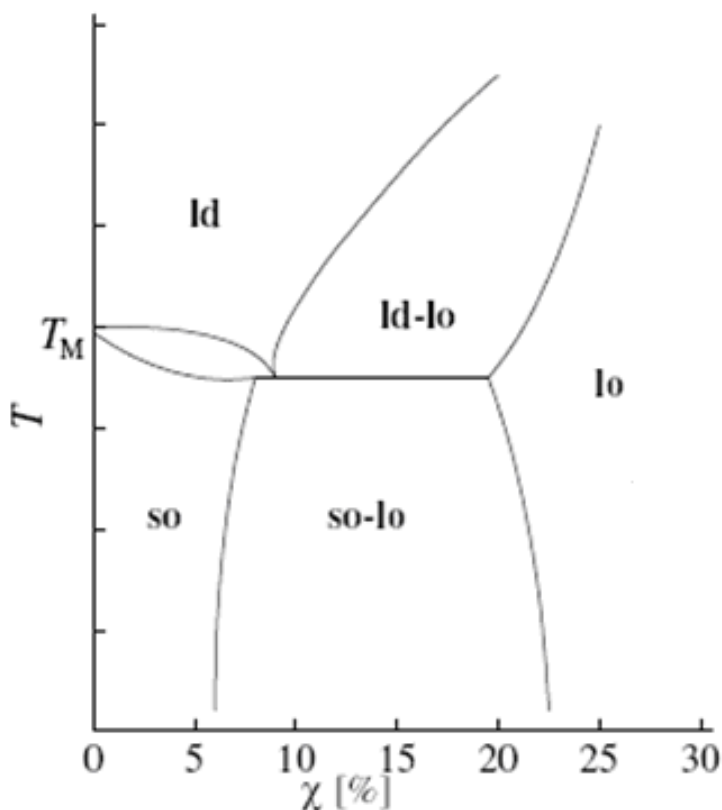


Рис.9.1. Фазовая диаграмма системы ДПФХ-холестерин. χ - молярная концентрация холестерина [31]. Аналогичные фазовые диаграммы имеют место и для бислоев других насыщенных липидов.

Присутствие l_d и l_o фаз может быть обнаружено и по данным дифференциальной сканирующей микроскопии (Рис.9.2). Из рисунка видно, что при увеличении концентрации холестерина в мембране основной пик с высокой кооперативностью смещается в область низких температур, при этом появляется более высокотемпературный пик с низкой кооперативностью и низким тепловым эффектом. Этот пик соответствует l_o фазе.

Латеральная диффузия липидов в бислоях с холестерином исследовалась методами ЯМР и флуоресценции начиная с 70-х годов [15, 24, 33-35]. При этом было показано, что холестерин изменяет диффузию фосфолипидов. Совершенствование аппаратуры ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля и использование синтетических липидов в последние годы позволило провести новую серию исследований, в которых были установлены зависимости коэффициента латеральной диффузии липидов от температуры, насыщенности

углеводородных цепей, концентрации холестерина, гидратации бислоя, типа фосфолипида [16, 17, 36].

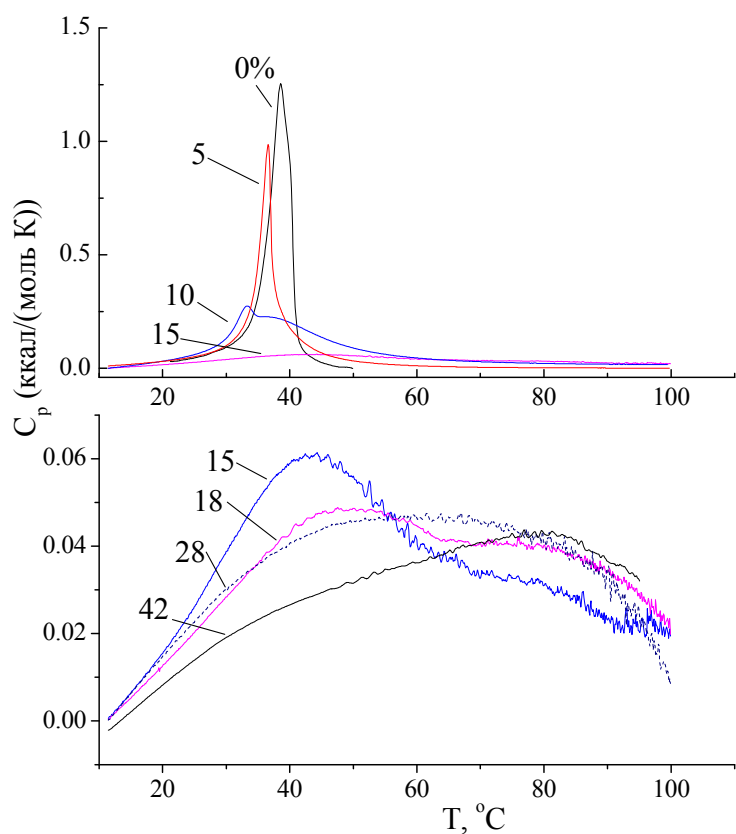


Рис.9.2. Термограммы бислоев сфингомиелин/холестерин полученные методом ДСК при различных мольных концентрациях холестерина в системе.

Исследовали латеральную диффузию в бислоях различных фосфатидилхолинов и сфингомиелинов в зависимости от концентрации холестерина и концентрации воды. Во всех случаях, включая двухфазную область одновременного присутствия l_d и l_o фаз, диффузионные затухания для липидов имели однокомпонентный вид. Однако для случаев фосфолипидов с насыщенными цепями и фосфолипидов с двойными связями в углеводородной цепи вид зависимостей коэффициента латеральной диффузии от температуры и концентрации холестерина был различен.

Для ДОФХ наблюдалось монотонное повышение D_L при повышении температуры, которое имело вид близкий к линейному в координатах Аррениуса (Рис.9.3а). Энергия активации самодиффузии, оцененная из этих

зависимостей, при увеличении концентрации холестерина возрастала монотонно от 27 до 32 Дж/моль. Повышение концентрации холестерина приводило к линейному понижению D_L (Рис.9.3б). Аналогичные зависимости были характерны и для бислоев ПОФХ/холестерин.

Для насыщенных фосфолипидов вид зависимостей был значительно более сложным, причем в наибольшей степени эффекты были выражены в бислоях сфингомиелина с холестерином (Рис.9.4а,б). Между зависимостями D_L от концентрации холестерина и фазовой диаграммой (Рис.9.4б) наблюдается хорошая корреляция, при этом можно выделить три области концентраций с различным характером зависимости. При малых концентрациях холестерина (0-5 моль %, область l_d фазы) D_L практически не зависит от концентрации (для насыщенных фосфатидилхолинов в этой области происходит небольшое понижение D_L).

В области l_o фазы (более 20 моль % холестерина) зависимость D_L также слабая, при этом коэффициент диффузии уменьшается при высоких температурах (выше T_m чистого липида) и увеличивается при низких (ниже T_m чистого липида). Такое поведение наблюдалось и в более ранних исследованиях [37] и компьютерном моделировании [38]. Дело в том, что при высоких температурах добавление холестерина в ЖК бислои приводит к его большему упорядочению, а при низких температурах молекулы холестерина действуют как пластификатор, внедряясь между молекулами фосфолипида, при этом подвижность молекул липида увеличивается.

В двухфазной области (5-20 моль % холестерина) значение D_L для некоторой произвольной концентрации c^* определяется средним от коэффициентов латеральной диффузии в l_d и l_o фазах согласно «правилу рычага»:

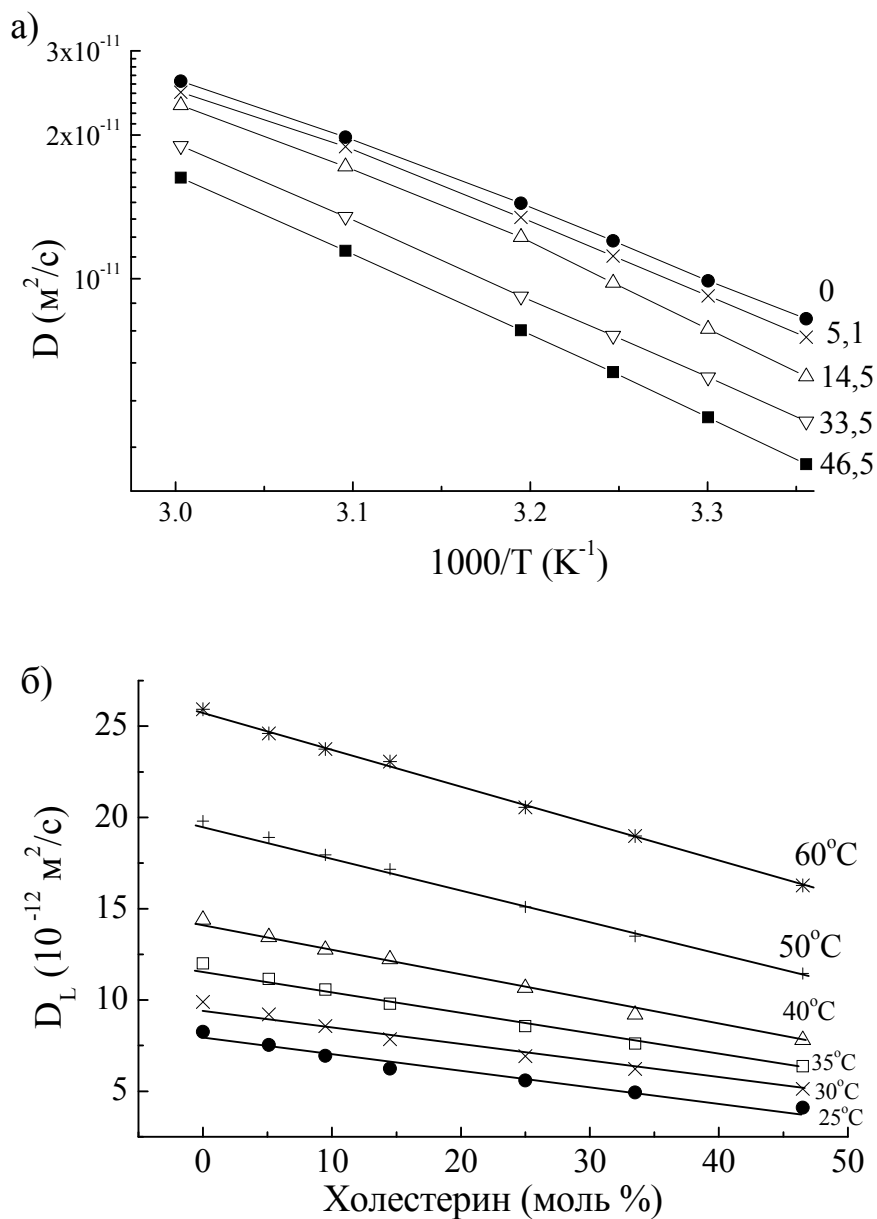


Рис.9.3. Зависимости коэффициента латеральной диффузии ДОФХ в бислоях ДОФХ с холестерином от температуры и концентрации холестерина (моль %).

$$D(c^*) = \frac{D_d \cdot (c^* - c_o) + D_o \cdot (c_d - c^*)}{c_d - c_o}, \quad (9.1)$$

где c_o и c_d – концентрации холестерина, соответствующие ЖК упорядоченной и ЖК неупорядоченной фазам на границах двухфазной области, а D_o и D_d –

соответствующие им коэффициенты диффузии. Правило рычага определяет линейную зависимость D_L от концентрации при постоянной температуре.

Тот факт, что в двухфазной области, когда присутствуют две фазы с коэффициентами латеральной диффузии, различающимися в 2-3 раза, наблюдается однокомпонентное диффузионное затухание свидетельствует о том, что между l_d и l_o фазами происходит молекулярный обмен быстрый по сравнению с временами эксперимента ЯМР ИГМП (10 – 100 мс). То есть за время меньше 10 мс молекулы фосфолипида успевают многократно совершить переход между ЖК упорядоченной и неупорядоченной фазами.

Вид температурных зависимости сфингомиелина отличается от Аррениусового (Рис.9.4а). Для «чистого» бислоя отклонения наблюдаются при приближении к T_m , вследствие размытого фазового перехода и образования частью молекул сфингомиелина доменов гель-фазы. Это связано с распределением молекул сфингомиелина по длине и насыщенности углеводородных хвостов. Такое же поведение наблюдается при малых концентрациях холестерина, соответствующих l_d фазе. Для бислоев с высокой концентрацией холестерина, соответствующей l_o фазе, зависимости имеют вид близкий к Аррениусовой форме. Наиболее сильное отклонение от Аррениусовой зависимости происходит в двухфазной области, при этом сами зависимости описываются «правилом рычага» (пунктирные линии).

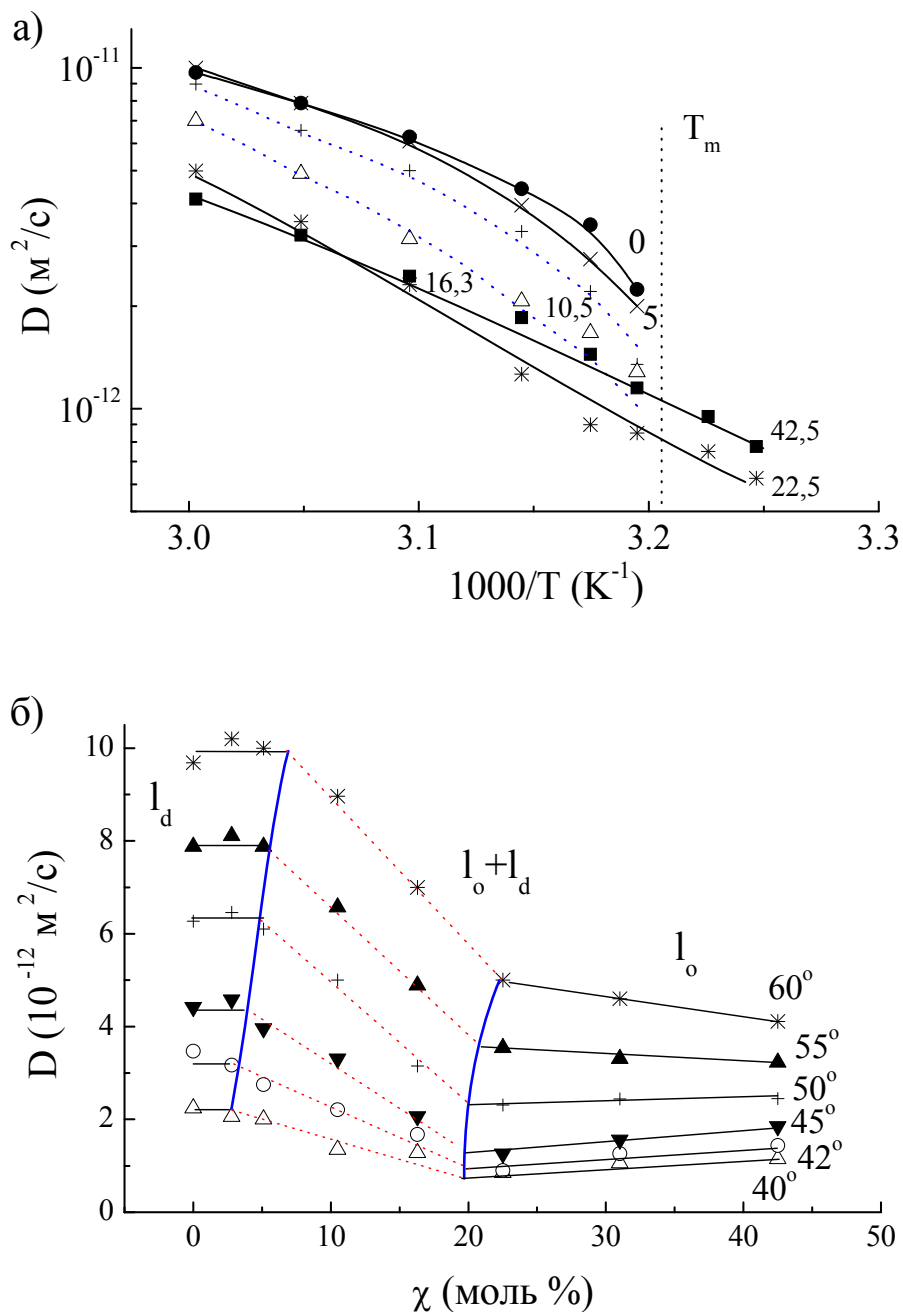


Рис.9.4. Зависимости коэффициента латеральной диффузии сфингомиелина в бислоях сфингомиелина с холестерином от температуры и концентрации холестерина (моль %). Участки зависимостей в двухфазной (l_d и l_o) области описаны с помощью «правила рычага» - пунктирные линии.

Интересно было бы исследовать для насыщенных фосфолипидов зависимость энергии активации от концентрации холестерина. Однако для двухфазной области изменение температуры приводит к изменению

соотношения между фазами – в этом случае оценка энергии активации не имеет смысла. В области I_d фазы из-за сложной формы температурных зависимостей D_L оценить энергии активации самодиффузии удастся только при высоких температурах. Оценки показывают, что E_D возрастает от 40 до 64 кДЖ/моль при переходе от I_d к I_o фазе и далее увеличение концентрации холестерина в I_o фазе приводит к уменьшению E_D до 57 кДЖ/моль.

Латеральная диффузия холестерина, меченного атомами фтора ^{19}F , в бислоях ДМФХ с содержанием холестерина 38 моль % изучалась по данным ЯМР ИГМП на ^{19}F в температурном интервале от 25 до 60°C [18]. Было установлено, что коэффициенты латеральной диффузии холестерина и фосфолипида, несмотря на различие в размерах и молекулярных массах молекул, совпадают. Авторы объясняют это тем, что для молекул обоих типов, вероятно, работает некоторый общий механизм. Например, образуется некоторая «кооперативная единица» включающая как молекулы фосфолипида, так и молекулы холестерина. Альтернативное объяснение – диффузия в бислое в большей степени обуславливается некоторым его свойством общим для всех молекул (например, свободным объемом), чем индивидуальными характеристиками молекул.

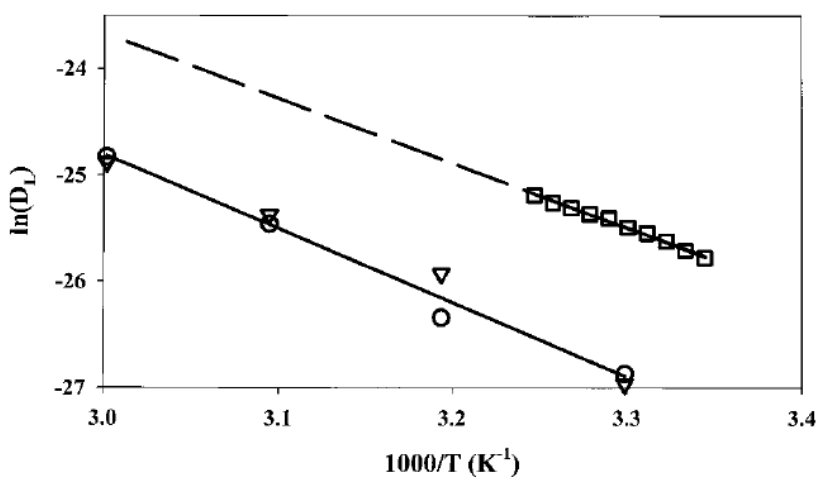


Рис.9.5. Зависимость D_L для ^{19}F меченого холестерина (o) и ДМФХ (∇) в бислоях ДМФХ с холестерином и «чистых» бислоях ДМФХ (\square).

Латеральная диффузия в трехкомпонентных бислоях: «каноническая смесь» .

«Каноническая смесь липидов» близка по составу к фракции клеточных мембран, нерастворимой с помощью детергента Triton-100, которая, как полагают, образует домены упорядоченной фазы в этих мембранах. Состав этой смеси – фосфолипид с ненасыщенными цепями (ДОФХ или ПОФХ), сфингомиелин и холестерин в молярных отношениях 1:1:1. При изменении температуры и доли холестерина, то есть в системе с соотношением компонентов 1:1:х, где х изменяется от 0 до 40 моль % можно получить бислои с различным соотношением неупорядоченной и упорядоченной ЖК фаз [39]. Фазовая диаграмма для такой системы имеет вид, представленный на Рис.9.6. Особенностью этой системы является то, что образование l_0 фазы имеет очень низкий тепловой эффект и не может быть обнаружено методом ДСК.

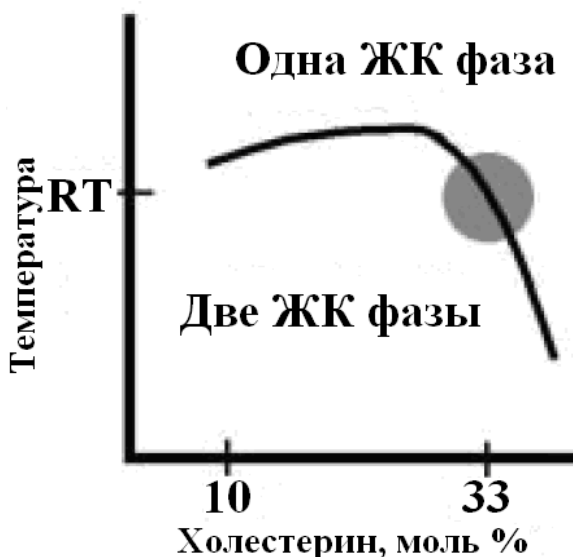


Рис.9.6. Схематическая фазовая диаграмма трехкомпонентного бислоя ДОФХ: сфингомиелин: холестерин с соотношением компонентов 1:1:х [39]. Серый круг – состав «канонической смеси липидов для образования мембранных доменов упорядоченной жидкокристаллической фазы “rafts”. RT – комнатная температура.

Исследование латеральной диффузии производилось в бислоях ДОФХ: сфингомиелин: холестерин с соотношением компонентов 1:1:х, где х изменяли в интервале от 0 до 40 моль % и температурном интервале 20 – 60°C [17, 40]. Форма диффузионного затухания (ДЗ) для липидов в общем случае была многокомпонентной и зависела от концентрации холестерина и температуры.

Для анализа ДЗ использовали программу глобального анализа данных (CORE, COmponent REsolved spectroscopy), при этом производится выделение диффундирующих компонентов, основываясь на затухании амплитуды интегрального сигнала и зависимости формы ^1H ЯМР спектра от бислоев в зависимости от величины приложенного импульсного градиента магнитного поля [41]. Этот анализ показал, что форма ДЗ при каждой температуре и концентрации не зависит от времени диффузии, а любое из ДЗ может быть либо однокомпонентным, либо двухкомпонентным. В том случае, когда наблюдаются две компоненты, эти компоненты различаются формой спектра (Рис.9.7), составом и коэффициентами латеральной диффузии. Обе спектральные компоненты имеют два доминирующих пика, соответствующие метиленовым протонам углеводородных цепей при 1,1 мд и метильным протонам холиновых групп при 3,1 мд. Также виден сигнал от протонов $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ ненасыщенных цепей ДОФХ при 5,2 и 2,0 мд, причем этот сигнал присутствует только в спектре «быстрой компоненты».

Присутствие двух компонент указывает на фазовое разделение в системе. Размеры фаз достаточно велики – это следует из того, что нет зависимости ДЗ от времени диффузии. За время измерения молекулы не испытывают ограничения на границах раздела фаз и обмен между фазами отсутствует. Используя соотношение Эйнштейна для среднеквадратических смещений ($\Delta x^2 = 2Dt$), время диффузии и значения коэффициентов латеральной диффузии можно оценить нижний предел размера фаз как > 4 мкм.

На Рис.9.8 показаны в координатах концентрация холестерина – температура показаны области, в которых наблюдается однокомпонентная и двухкомпонентная латеральная диффузия. Границы области двухфазности близки к тому, что наблюдалось ранее методом флуоресцентной микроскопии [39, 42]. Это является еще одним доказательством того, что метод ЯМР ИГМП позволяет регистрировать латеральное фазовое разделение в трехкомпонентном

липидном бислое. Главное преимущество метода, что он дает возможность не только обнаружить двухфазность, но и измерить коэффициенты латеральной диффузии липидов в каждой из фаз.

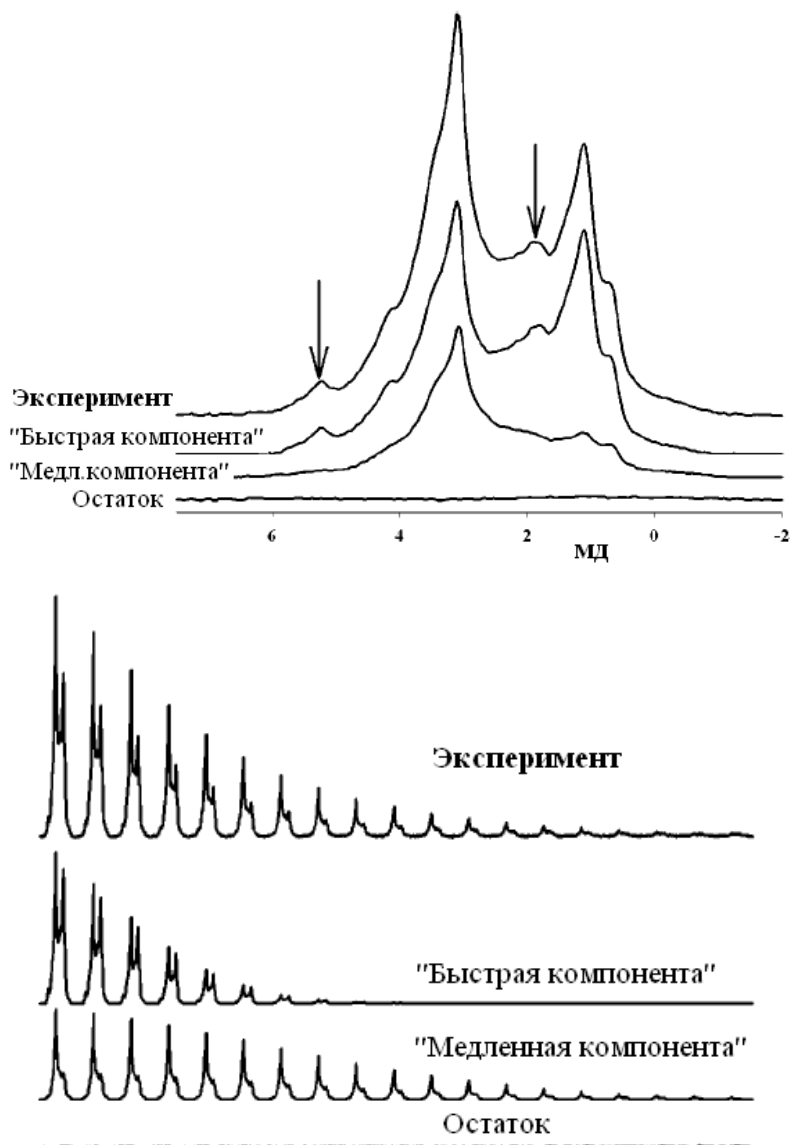


Рис.9.7. На верхнем рисунке показан экспериментальный спектр для фосфолипидов (ДОФХ и сфингомиелин), полученный для образца с концентрацией холестерина 29 моль % и результат разложения этого спектра с помощью программы "CORE" на «быструю» ($5 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$) и «медленную» ($1 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$) компоненты. $T=35^\circ\text{C}$. Время диффузии 60 мс. Стрелки показывают линии протонов $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ групп ДОФХ. На нижнем рисунке наборы экспериментальных спектров и спектров диффузионных компонент, полученных с помощью программы "CORE".

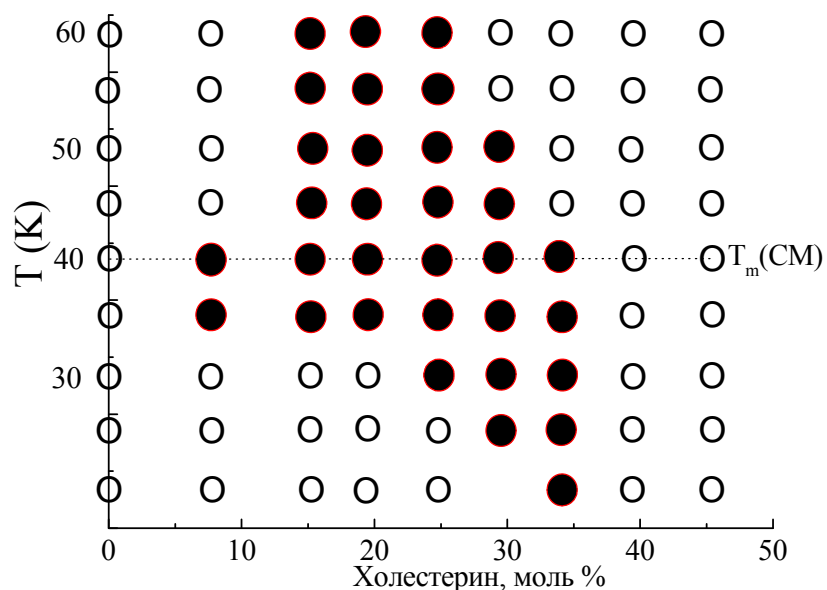


Рис.9.8. «Фазовая диаграмма» системы ДОФХ/сфингомиелин/холестерин, построенная на основании компонентного анализа латеральной диффузии. Открытые символы соответствуют однокомпонентной, а заполненные символы – двухкомпонентной латеральной диффузии.

На Рис.9.9 показаны зависимости D_L от концентрации холестерина в трехкомпонентных и двухкомпонентных смесях липидов. Видно, что отношение коэффициентов латеральной диффузии компонент составляет от 2 до 5 раз. Интересная особенность этих зависимостей – слабая зависимость D_L от концентрации для обеих, l_d и l_o фаз. Другая особенность – близость коэффициентов латеральной диффузии «быстрой компоненты» к D_L системы ДОФХ/холестерин, в то время как D_L «медленной компоненты» близка к D_L системы сфингомиелин/холестерин. Более детальное рассмотрение этих зависимостей позволило установить, что в результате латерального фазового разделения трехкомпонентной смеси липидов ДОФХ/сфингомиелин/холестерин образуются две фазы в примерно одинаковой степени содержащие холестерин [17]. Латеральное фазовое разделение может быть объяснено в терминах упорядоченности липидов и совместимости ДОФХ в упорядоченной фазе. Интерпретация экспериментальных данных основана на предположениях, что

латеральная диффузия в бислоях определяется упорядоченностью липидов, и что нет специфических взаимодействий между молекулами исследуемых систем. В рамках таких предположений оказывается, что насыщенный липид СМ образует более упорядоченную фазу, а добавление холестерина значительно увеличивает упорядоченность. Движущая сила перед фазовым разделением на l_o и l_d фазы – уменьшение возможности ДОФХ встроиться в высокоупорядоченную фазу. Роль холестерина в процессе фазового разделения заключается в увеличении упорядоченности первоначально однородной липидной мембраны до такой степени, что система, наконец, претерпевает фазовое разделение, при котором большая часть ДОФХ «выдавливается» из l_o фазы.

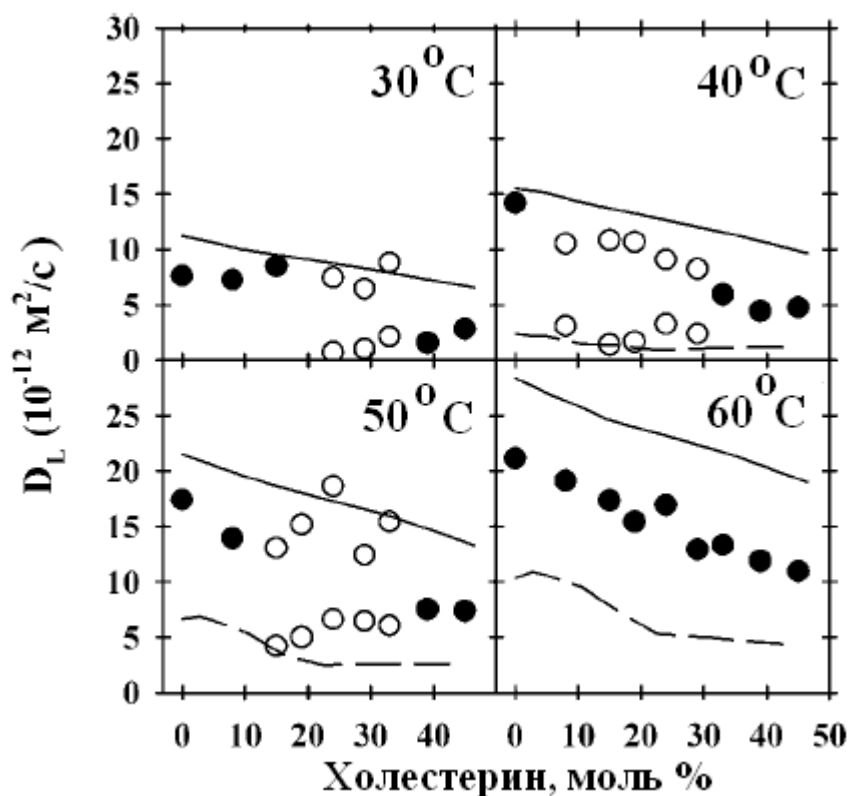


Рис.9.9. Коэффициенты латеральной диффузии для бислоев ДОФХ/сфингомиелин/холестерин как функция холестерина при разных температурах: заполненные символы – однокомпонентная диффузия, пустые символы – двухкомпонентная диффузия. Линии показывают зависимости D_L для бислоев: ДОФХ/холестерин (сплошные) и сфингомиелин/холестерин (штриховые).

Литература

1. Singer S.J., Nicolson G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175:720 - 731.
2. Guidotti G.: *Annual Reviews of Biochemistry* 1972; 41:731.
3. Щипунов Ю.А.: Самоорганизующиеся структуры лецитина. *Успехи химии* 1997; 66:328-352.
4. Koynova R., Caffrey M.: Phases and phase transitions of the sphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; 1255:213 - 236.
5. Koynova R., Caffrey M.: Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1376:91 - 145.
6. Koynova R., Caffrey M.: An index of lipid phase diagrams. *Chem Phys Lipids* 2002; 115:107-219.
7. Seiter C.H.A., Chan S.I.: Molecular motion in lipid bilayers. A nuclear magnetic resonance line width study. *J Am Chem Soc* 1973; 95:7541 - 7553.
8. Chan S.I., Feigenson G.W., Seiter C.H.A.: *Nature* 1971; 231:110.
9. Feigenson G.W., Chan SI: Nuclear magnetic relaxation behavior of lecithin multilayers. *J Am Chem Soc* 1974; 96:1312 - 1319.
10. Эйнштейн А., Смолуховский М: Брауновское движение. Москва, ОНТИ, 1936.
11. Леонтович М.А.: Статистическая физика. Ленинград, Наука, 1944.
12. Маклаков А.И., Скирда В.Д., Фаткуллин Н.Ф.: Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров. Казань, Издательство Казанского университета, 1987.
13. Эрнст Р., Броденхаузен Д., Вокаун А.: ЯМР в одном и двух измерениях. Москва, Мир, 1990.
14. Stejskal E.D., Tanner J.E: Self-diffusion measurements: spin-echoes in presence of time dependent field gradient. *J Chem Phys* 1965; 42:288 - 292.
15. Almeida P.F.F., Vaz W.L.C., Thompson T.E.: Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoilphosphatidylcholine/cholesterol bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry* 1992; 31: 6739-6747.
16. Filippov A., Oradd G., Lindblom G.: The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers. *Biophys J* 2003; 84:3079 - 3086.
17. Lindblom G., Oradd G., Filippov A.: Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol. An NMR study of dynamics and lateral phase separation. *Chem Phys Lipids* 2006; 141:179-184.
18. Oradd G., Lindblom G., Westerman P.W.: Lateral diffusion of cholesterol and dimyristoylphosphatidylcholine in a lipid bilayer measured by pulsed field gradient NMR spectroscopy. *Biophys J* 2002; 83:2702 - 2704.
19. Tank D.W., Wu E.S., Meers P.R., Webb W.W.: Lateral diffusion of gramicidin C in phospholipid multibilayers. Effects of cholesterol and high gramicidin concentration *Biophys J* 1982; 40:129-135.

20. Vaz W.L.C., Kapitza H.G., Stuempel J., Sackmann E., Jovin T.M.: Translational mobility of glycerophorin in bilayer membranes of dimyrisoylphosphatidylcholine. *Biochemistry* 1981; 20:1392-1396.
21. Peters R., Cherry R.: Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: experimental test of the Saffman-Delbrueck equation. *Proceedings of Natural Academy of Sciences USA* 1982; 79:4317-4321.
22. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М.: Курс теоретической физики, 1959.
23. Glegg R.M., Vaz W.L.C.: Translational diffusion of proteins and lipids in artificial lipid bilayer membranes. A comparison of experiment with theory; in Watts A. (ed): *Progress in Protein-Lipid Interactions*. Elsevier Science Publishers, 1985, pp 173-229.
24. Vaz W.L.C., Clegg R.M., Hallmann D.: Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phase phosphatidylcholine multibilayers. A comparison of experiment with theory. *Biochemistry* 1985; 24:781 - 786.
25. Almeida P.F.F., Vaz W.L.C., Thompson TE: Lipid diffusion, free area, and molecular dynamics simulations. *Biophys J* 2005; 88:4434–4438.
26. Falck E., Patra M., Karttunen M., Hyvonen M.T., Vattulainen I.: Lessons of slicing membranes: Interplay of packing, free area, and lateral diffusion in phospholipid/cholesterol bilayers. *Biophys J* 2004; 87:1076–1091.
27. Falck E. Patra M. Karttunen M. Hyvonen M.T., Vattulainen I.: Response to comment by Almeida et al.: Free area theories for lipid bilayers -Predictive or Not? *Biophys J* 2005; 88:745–752.
28. Brown D.A.: Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* 1998; 164:103 - 114.
29. Simons K., Ikonen E.: Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387:569 - 572.
30. Simons K., Toomre D.: Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2000; 1:31 - 39.
31. Vist M.R., Davis J.H.: Phase equilibria of cholesterol /dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry* 1990; 29:451 - 464.
32. Ipsen J.H., Kalstrom G., Mouritsen O.G., Wennerstrom H.W., Zuckermann M.J.: Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol systems. *Biochem Biophys Acta* 1987; 905:162 - 172.
33. Alecio M.R., Golan D.E., Veatch W.R., Rando R.R.: Use of a fluorescent cholesterol derivative to measure lateral mobility of cholesterol in membranes. *Biochemistry* 1982; 21:5171 - 5174.
34. Lindblom G., Johanson B.-A., Arvidson G.: Effect of cholesterol in membranes. Pulsed nuclear magnetic resonance measurements of lipid lateral diffusion. *Biochemistry* 1981; 20:2204 - 2207.
35. Kuo A.-L., Wade C.G.: Lipid lateral diffusion by pulsed nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 1979; 18:2300 - 2308.

36. Filippov A., Oradd G., Lindblom G.: Influence of cholesterol and water content on phospholipid lateral diffusion in bilayers. *Langmuir* 2003; 19:6397 - 6400.
37. Almeida P.F.F., Vaz W.L.C., Thompson T.E.: Lateral diffusion and percolation in two-phase, two-component lipid bilayers. Topology of the solid-phase domains in-plane and across the lipid bilayer. *Biochemistry* 1992; 31:7198 - 7210.
38. Polson J.M., Vattulainen I., Zhu H., Zuckermann M.J.: Simulation study of lateral diffusion in lipid-sterol bilayer mixtures. *European Physical Journal* 2001;.E5:485 - 497.
39. Veatch S.L., Keller S.L.: A close look at the canonical "raft mixture" in model membrane studies. *Biophys J* 2003; 84:725 - 726.
40. Filippov A., Oradd G., Lindblom G.: Lipid lateral diffusion in ordered and disordered phases in raft mixtures. *Biophys J* 2004; 86:891 - 896.
41. Stilbs P., Paulsen K., Griffiths P.C.: Global least-squares analysis of large, correlated spectral data sets: application to component-resolved FT-PGSE NMR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry* 1996; 100:8180 - 8189.
42. Veatch S.L., Keller S.L.: Organization in lipid membranes containing cholesterol. *Physical Review Letters* 2002; 89:268101-268101 - 268101-268104.