

## СТРУКТУРНИЙ ПЕРЕХІД У РІДИННІЙ СИСТЕМІ ВОДА–ЛІПІДИ

Л.А. БУЛАВІН,<sup>1</sup> Д.В. СОЛОВЙОВ,<sup>1,2</sup> Ю.Є. ГОРШКОВА,<sup>2</sup>  
 О.М. ЖИГУНОВ,<sup>3</sup> О.І. ІВАНЬКОВ,<sup>1,2</sup> В.І. ГОРДЕЛІЙ,<sup>2,4,5,6</sup>  
 О.І. КУКЛІН<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет ім. Тараса Шевченка  
 (Просп. Акад. Глушкова, 4, Київ 03022)

<sup>2</sup>Об'єднаний інститут ядерних досліджень  
 (Вул. Жоліо-Кюрі, 6, Дубна 141980, Росія; e-mail: DSolovjov@nf.jinr.ru)

<sup>3</sup>Institute of Macromolecular Chemistry of the Czech Republic Academy of Sciences  
 (Heyrovskho nam., 2162 06 Praha 6 – Brevnov, Czech Republic)

<sup>4</sup>Біонаноцентр Московського фізико-технічного інституту  
 (Пров. Інститутський, 9, Долгопрудний 141700, Росія)

<sup>5</sup>Institute of Structural Biology J.P.Ebel  
 (41, rue Jules Horowitz, F-38027, Grenoble Cedex 1, France)

<sup>6</sup>Institute of Complex System- 5  
 (Leo-Brandt-Strasse, 52428 Julich, Germany)

УДК 538.911  
 ©2012

У роботі методом малокутового розсіяння рентгенівських променів досліджено мультишарові ліпідні мембрани ДПФХ (1,2-дипальмітоіл-sn-гліцери-3-фосфатидилхолін) та суміші ДПФХ/ПОФХ (1-пальмітоіл-2-олеїл-sn-гліцери-3-фосфатидилхолін) у співвідношенні 3:1 у надлишку води. Отримано температурні залежності періодів повторювання ліпідних бішарів у діапазоні температур 20–55 °С. Порівняльний аналіз кривих розсіяння від мультишарових мембран показав, що нижче температури 40 °С в суміші ліпідів існує додаткове впорядкування з періодом повторювання 66 Å, яке пов'язано, на нашу думку, з поділом фаз ліпідів. Також у суміші спостерігається зникнення так званої ріпл-фази (хвилеподібної фази) ліпиду ДПФХ.

бішару, в якій враховуються слабкі взаємодії між головами ліпідів. Показано, що навіть слабкі взаємодії між головами ліпиду діють аналогічно поверхневому тиску на бішар, що, у свою чергу, впливає на значення температури фазового переходу.

Значну кількість публікацій присвячено вивченню впливу різноманітних домішок на фазові переходи в ліпідах. Так, використовуючи ширококутову дифракцію рентгенівського випромінювання для суміші двох ліпідів з холестериним, автори [6] виявили два різних впорядкування молекул ліпиду при низькій температурі. Проте так і не було з'ясовано, чи відбувається при цьому мікрофазний поділ ліпідів, чи утворюється нова фаза, яка є характерною саме для дослідженої суміші. У роботі [7] запропоновано модель, яка пояснює фазовий перехід циліндричні міцели – бішарові везикули у суміші фосфоліпідів та ПАР. Модель передбачає перший порядок цього переходу, при цьому температура переходу залежить від співвідношення компонентів суміші. На думку авторів, запропонована модель якісно узгоджується з експериментальними даними. Роботу [8] присвячено дослідженню впливу електролітів на розчини ліпідів методами малокутового розсіяння нейтронів та рентгенівських променів і методом диференціальної скануючої калориметрії. Вплив холестерину, анаестетиків, а також поліпептидів на температуру головного фазового переходу (переходу із ріпл-фази в рідкокристалі-

## 1. Вступ

Вивчення фізичних та фізико-хімічних аспектів фазових переходів в мембранах триває вже багато років [1–3]. Така зацікавленість пов'язана як з біологічною важливістю мембран та перспективами їх використання (наприклад, як різноманітних сенсорів, датчиків, фільтрів), так і з фундаментальними проблемами фізики, що стосуються фазових переходів.

У 1975 році запропоновано теоретичну модель ліпідного бішару [4]. За допомогою статистичних методів отримано фазову діаграму ліпідного моношару в координатах площі, що припадає на ліпідну молекулу, та відповідного цій площі поверхневого тиску. У роботі [5] ці ж автори запропонували модель ліпідного

чну фазу) досліджено методом ядерного магнітного резонансу [9] та методом подвійного електрон-електронного резонансу [10]. Дослідження впливу концентрації дихлорфенолу на температуру головного фазового переходу в ліпіді ДПФХ проведено у роботі [11].

Одним із напрямків дослідження фазових переходів у ліпідних мембранах є вивчення впливу на них тиску. Як відомо, різноманітні живі організми можуть існувати як при атмосферному тиску, так і при більш високому. Цій тематиці присвячено роботи професора Вінтера [9, 12–14], в яких використано різноманітні методи дослідження: малокутове розсіяння нейтронів та рентгенівських променів, рентгенівська дифракція, метод ядерного магнітного резонансу, а також  $P$ – $V$ – $T$  дослідження. У роботах наведено фазові діаграми для низки ліпідів, досліджено вплив білків, поліпептидів, деяких поверхнево-активних речовин на температуру фазового переходу. При цьому показано наявність впливу типу вуглецевих хвостів фосfolіпідів на характер упаковки бішару в різних фазах [15].

Раніше нами проведено дослідження водного розчину димеристоїлфосфатидилхоліну (ДМФХ) методом  $P$ – $V$ – $T$  [16] та виявлено критичну поведінку коефіцієнта ізотермічної стисливості у точці головного фазового переходу [17].

Незважаючи на значну кількість робіт, присвячених вивченню фазових переходів у ліпідних мембранах, ролі фазових переходів у життєдіяльності живих організмів досі остаточно не встановлено. Разом з тим, деякі дослідники припускають, що саме завдяки наявності фазових переходів у мембранах підтримується температурна стабілізація живих істот та регулюються кооперативні процеси клітинної діяльності [18].

Метою даної роботи є дослідження впливу температури на структурні зміни в двокомпонентній ліпідній суміші.

У роботі проведено дослідження водного розчину ліпідів ДПФХ та ПОФХ задля оцінки впливу близького ліпідного хвоста (за довжиною ліпідного хвоста) на зміщення температури фазового переходу, характерного за нормального тиску. Дослідження подібних систем важливе для розуміння будови та особливостей функціонування біологічних мембран, адже реальні мембрани є багатокомпонентними, причому деякі нараховують у своєму складі до ста різних ліпідів. Проведені дослідження мають покращити розуміння впливу ліпідного бішару на функціонування мембранних білків, адже особливості фазових переходів у ліпідних

мембранах можуть бути використані для кристалізації мембранних білків.

## 2. Матеріали та методи експериментальних досліджень

Синтетичний 1,2-дипальмітоїл-*sn*-гліцери-3-фосфатидилхолін (ДПФХ) та 1-пальмітоїл-2-олеїл-*sn*-гліцери-3-фосфатидилхолін (ПОФХ), люб'язно наданий фірмою Avanti (Бірінгем), використовувалися без подальшої очистки.

Мультиламелярні везикули готувалися так: ДПФХ та суміш ДПФХ/ПОФХ (у співвідношенні 3 до 1 за масою) розчиняли у воді. Для змішування ліпідів використовували шейкер. Гомогенізацію розчину забезпечували за допомогою циклічних процедур заморожування – відтаювання. Далі розчин вводили у боросилікатний капіляр з діаметром 1,5 мм та товщиною стінок 0,01 мм (W. Muller, Berlin, Germany). Сумарна концентрація ліпідів в суміші становила 100 мг/мл.

Дослідження за допомогою малокутового розсіяння рентгенівських променів проводили в пінхольній камері спектрометра Molecular Metrology SAXS System в Інституті макромолекулярної хімії Чеської академії наук (м. Прага, Чеська Республіка). У цьому спектрометрі використовується мікрофокусне джерело рентгенівського випромінювання Osmic MicroMax 002 з робочою напругою 45 кВ та струмом 0,66 мА. Діаметр пучка випромінювання становив 0,3 мм. Спектрометр мав газовий позиційно-чутливий детектор з діаметром 20 см. Доступний для вимірювання діапазон модуля вектора розсіяння  $q$  становив 0,0045–0,2 Å<sup>-1</sup>.

## 3. Результати досліджень

### 3.1. ДПФХ мембрани

На рис. 1 наведено криві малокутового розсіяння рентгенівських променів водного розчину ДПФХ за умови нормального тиску. Оскільки при обробці даних нас цікавило лише положення максимумів кривої, то нормування на абсолютні значення інтенсивностей розсіяння не проводилося. За підвищення температури після 34,5 °С положення дифракційного піка змінюється, що свідчить про зміну фазового стану ліпідів.

На рис. 2 наведено криві малокутового розсіяння рентгенівських променів розчином ліпідів ДПФХ при температурах 35,2 °С та 36 °С. У даному діапазоні

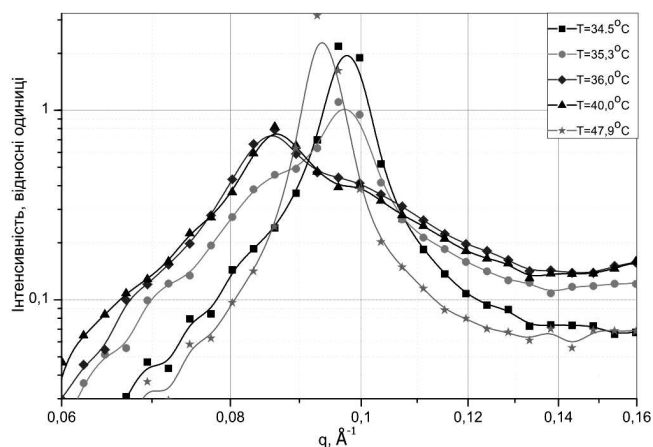


Рис. 1. Малокутове розсіяння рентгенівських променів водного розчину ДПФХ у діапазоні температур 24 – 55 °С за умови нормального тиску

температур ліпід переходить із гелі фази в так звану ріпл-фазу (хвилеподібну фазу) [14]. Дифракційні максимуми розмиті, що свідчить про неоднорідність розчину. Це пов'язано з присутністю двох фаз в ліпіді, кожна з яких характеризується власним періодом повторювання, про що свідчить наявність двох максимумів на кожній кривій.

Обробка даних відбувалась так: з кривих розсіяння (рис. 1) отримано координати максимумів  $q$ , з яких визначено період повторювання ліпідного бішару  $D$  за формулою

$$D = \frac{2\pi}{q}$$

При цьому період повторювання  $D$  обчислено для кожної з досліджених температур. Далі побудовано температурну залежність періоду повторювання ліпідного бішару (рис. 3). Різке збільшення періоду повторювання ліпідного бішару при збільшенні температури від 35,2 °С до 36 °С відповідає переходу дослідженої системи із гелі фази в ріпл-фазу. Як бачимо з рис. 3, за подальшого збільшення температури в околі 41 °С спостерігається зменшення періоду повторення ліпідних шарів, що пов'язане з так званим головним фазовим переходом ліпиду.

### 3.2. ДПФХ/ПОФХ мембрани

Під час обробки кривих малокутового розсіяння суміші ліпідів ДПФХ та ПОФХ використано ті самі підходи, що і для розчину ДПФХ. Виготовлена система також має мультишарову структуру, що підтверджується наявністю піків на кривій розсіяння (див. рис. 4).

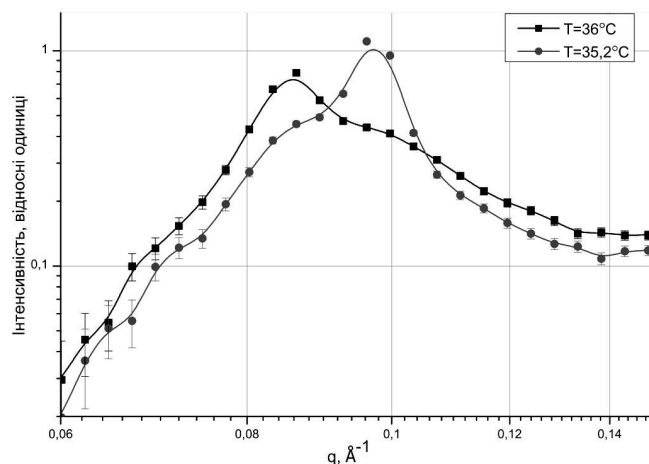


Рис. 2. Криві малокутового розсіяння рентгенівських променів, що ілюструють фазовий перехід ДПФХ з гелі фази в хвилеподібну ріпл-фазу

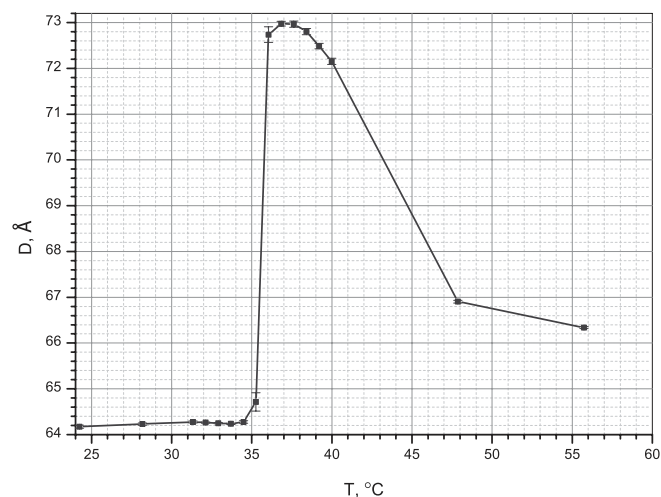


Рис. 3. Температурна залежність періоду повторювання ліпідного бішару ДПФХ

Як бачимо, для суміші ліпідів залежно від температури спостерігаються різні за характером піки малокутового розсіяння рентгенівського випромінювання. Так, вище 34,5 °С піки одинарні, без додаткових максимумів. У діапазоні від 20,3 °С до 34,5 °С піки стають ширшими (рис. 5), і на спектрах можна виділити додатковий окремий пік, який свідчить про наявність ще одного певного впорядкування ліпідних бішарів.

На рис. 6 подано температурну залежність періоду повторювання для суміші ліпідів ДПФХ/ПОФХ (у співвідношенні 3:1). Періоди повторення, що отримані від додаткових піків, на рис. 6 показано кружечками, а ті, які отримані від основних піків – квадратами. Наявність двох періодів повторення в суміші поясню-

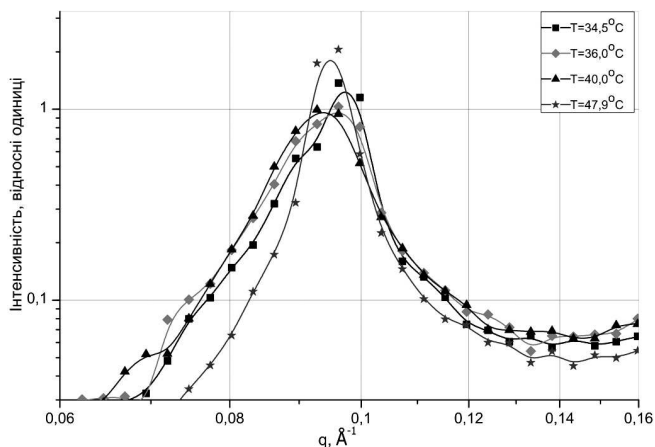


Рис. 4. Малокутове розсіяння рентгенівських променів водного розчину ДПФХ/ПОФХ (3 : 1) у діапазоні температур 20–55 °С за умови нормального тиску

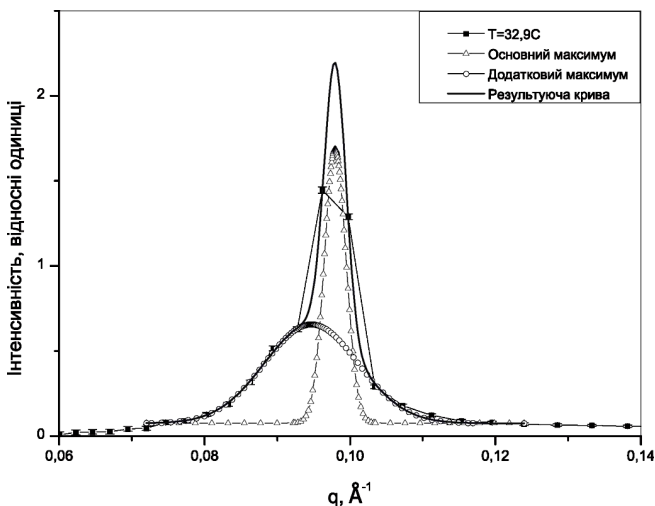


Рис. 5. Характерна крива малокутового розсіяння рентгенівського випромінювання сумішшю ліпідів ДПФХ/ПОФХ, при температурі 32,9 °С

ємо тим, що до певної температури ліпіди не змішуються, утворюючи гомогенний розчин. Температура, за якої зникає додаткове структурне впорядкування, відповідає температурі головного фазового переходу ДПФХ (див. рис. 3). Нижче цієї температури ДПФХ знаходиться в так званій гелі фазі, що характеризується щільним пакуванням молекул ліпиду, тому і не відбувається змішування ліпідів. Вище температури головного фазового переходу ліпідний бішар переходить в рідкокристалічну фазу і стає схожим на двовимірну рідину – молекули ліпиду можуть достатньо вільно рухатись всередині бішару, тоді стає можливим змішування ліпідів. Нижче температури 20,3 °С

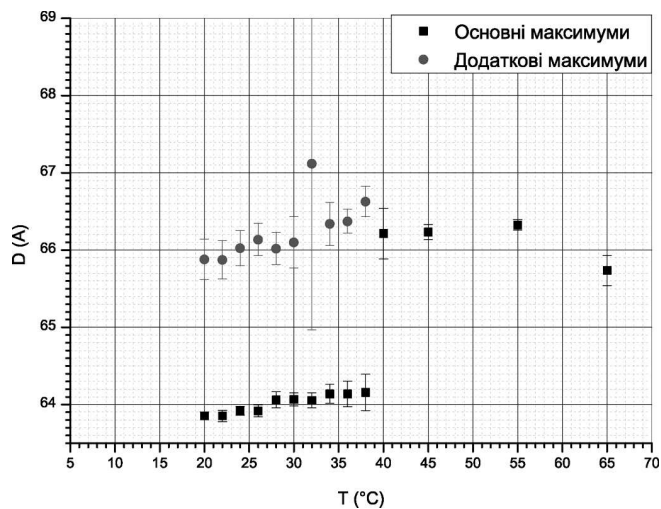


Рис. 6. Температурна залежність періоду повторювання ліпідного бішару суміші ліпідів ДПФХ/ПОФХ. Кругечками показано значення періоду повторення, що відповідають положенню малих піків, квадратами – значення періоду повторення від основних піків

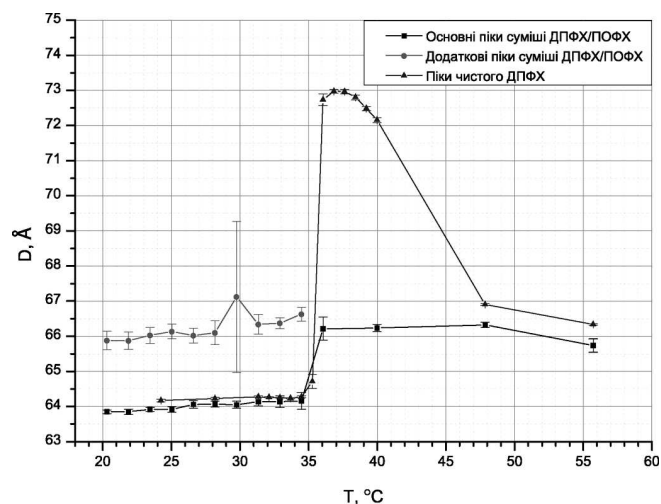


Рис. 7. Температурні залежності періодів повторення ліпідного бішару ДПФХ (трикутники) та ліпідної суміші ДПФХ/ПОФХ (кругечки відповідають додатковим пікам, квадрати – основним)

та вище температури 47,8 °С періоди повторення ліпідного бішару ПОФХ (трикутники) та суміші ліпідів ДПФХ/ПОФХ (квадрати) збігаються (рис. 7). Це свідчить про те, що основні піки на кривій малокутового розсіяння суміші ДПФХ/ПОФХ пов'язані саме з ДПФХ. Таку гіпотезу також підтверджує порівняння інтенсивностей основного та додаткового піків (рис. 5) – основний пік відповідає ліпиду ДПФХ, якого в суміші знаходиться більше, ніж ПОФХ. Тому ін-

тенсивність розсіяння від ліпиду ДПФХ має бути більшою, ніж від ПОФХ, якого в суміші менше. Значення періоду повторення, що відповідають положенню малих піків (показано кружечками на рис. 7) ( $\sim 66 \text{ \AA}$ ), відповідає періоду повторення ліпідного бішару ПОФХ в рідкокристалічній фазі. У дослідженій суміші ліпід ПОФХ знаходиться саме в рідкокристалічній фазі, оскільки температура основного фазового переходу для цього ліпиду становить  $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ . При порівнянні температурних залежностей періодів повторення суміші ліпідів та чистого ліпиду (див. рис. 7), крім наявності додаткового впорядкування, також спостерігаємо зникнення проміжної ріпл-фази чистого ліпиду ДПФХ.

#### 4. Висновки

Показано, що за умови нормального тиску ліпідна суміш ДПФХ/ПОФХ (3:1) при температурі, нижчій від  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ , не є гомогенною. У цей час ліпідні статистично незалежні, що підтверджується наявністю двох структурних піків у спектрі малокутового розсіяння рентгенівських променів. Вище  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  зазначений спектр містить єдиний максимум, проте метод малокутового розсіяння рентгенівських променів не дозволяє з'ясувати чи у цей час ліпідні статистично залежні, а тому ліпідні бішари мають єдиний період повторення, чи вони є статистично незалежні, але ліпідні бішари мають близькі за величиною періоди повторення, які техніка експерименту не дозволяє розрізнити. Виявлено, що додавання ліпиду ПОФХ до ДПФХ не змінює температури фазового переходу останнього, але приводить до зникання проміжної ріпл-фази ДПФХ з періодом повторення близько  $73 \text{ \AA}$ .

1. R.L. Biltonen, *J. Chem. Thermodyn.* **22**, 1 (1990).
2. J.F. Nagle and S. Tristram-Nagle, *Biochim. Biophys. Acta - Reviews on Biomembranes* **1469**, 159 (2000).
3. S. Tristram-Nagle and J.F. Nagle, *Chem. Phys. Lipids* **127**, 3 (2004).
4. J.F. Nagle, *J. Chem. Phys.* **63**, 1255 (1975).
5. J.F. Nagle, *J. Membr. Biol.* **27**, 233 (1976).
6. T.T. Mills, *Biophys. J.* **65**, 682 (2008).
7. D. Andelman *et al.*, *Europhys. Lett.* **25**, 231 (1994).
8. K. Fukada and N. Miki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **82**, 439 (2009).
9. R. Winter, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **50**, 163 (2003).
10. Y.-W. Chiang, A.J. Costa-Filho, and J.H. Freed, *J. Phys. Chem. B* **111**, 11260 (2007).

11. A. Csiszar *et al.*, *Chem. Phys. Lipids* **126**, 155 (2003).
12. O. Reis, R. Winter, and T.W. Zerda, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1279**, 5 (1996).
13. R. Winter, *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.* **6**, 303 (2001).
14. R. Winter, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1595**, 160 (2002).
15. R. Winter and W.C. Pilgrim, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **93**, 708 (1989).
16. A.I. Kuklin *et al.*, *J. Phys.: Conf. Ser.* **291**, 012013 (2011).
17. D. Solov'ev *et al.*, *J. Surf. Investig.* **5**, 7 (2011).
18. Д.П. Харакоз, *Успехи биологической химии* **41**, 333 (2001).

Одержано 17.01.12

#### СТРУКТУРНИЙ ПЕРЕХОД В ЖИДКОСТНОЙ СИСТЕМЕ ВОДА–ЛИПИДЫ

*Л.А. Булавин, Д.В. Соловьев, Ю.Е. Горшкова, А.Н. Жигунов, А.И. Иваньков, В.И. Горделий, А.И. Куклин*

#### Резюме

В работе методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей исследованы мультислойные мембраны ДПФХ (1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин) и смеси ДПФХ/ПОФХ (1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин) в соотношении 3:1 по весу в избытке воды. Получены температурные зависимости периодов повторяемости липидных слоев в диапазоне температур  $20\text{--}55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Сравнительный анализ кривых рассеяния от мультислойных мембран показал, что ниже температуры  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  в смеси липидов существует дополнительное упорядочение с периодом повторяемости  $66 \text{ \AA}$ , которое мы связываем с разделом фаз липидов. Также в смеси наблюдается исчезновение так называемой ріпл-фазы (волнообразной фазы) липида ДПФХ.

#### STRUCTURAL TRANSITION IN A LIPID–WATER LIQUID SYSTEM

*L.A. Bulavin<sup>1</sup>, D.V. Solov'ev<sup>1,2</sup>, Yu.E. Gorshkova<sup>2</sup>, A.N. Zhigunov<sup>2</sup>, O.I. Ivan'kov<sup>1,2</sup>, V.I. Gordelii<sup>2,4,5,6</sup>, O.I. Kuklin<sup>2,4</sup>*

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv (4, Academician Glushkov Ave., Kyiv 03022, Ukraine),

<sup>2</sup>Joint Institute for Nuclear Research (6, Joliot-Curie Str., Dubna 141980, Russia; e-mail: DSolovjov@nf.jinr.ru),

<sup>3</sup>Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic (Heyrovskho nam., 2162 06 Praha 6 – Brevnov, Czech Republic),

<sup>4</sup>Research and Educational Center "Bionanophysics", Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskii lane, Dolgoprudny 141700, Moscow Region, Russia),

<sup>5</sup>Institut de Biologie Structurale J.P. Ebel  
(41, rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble Cedex 1, France),  
<sup>6</sup>Institute of Complex System  
(5, Leo-Brandt-Straße, 52428 Jülich, Germany)

#### S u m m a r y

Small-angle X-ray scattering technique has been used to study multilayer lipid membranes of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and the 3:1-mixture DPPC/1-palmitoyl-2-ole-

oyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in excess water. The temperature dependences of the repetition period for lipid bilayers in the temperature range 20–55 °C are obtained. A comparative analysis of the scattering curves obtained for multilayer membranes showed that, below a temperature of 40 °C, there emerges an additional ordering with a repetition period of 66 Å in the lipid mixture, which we associate with the lipid phase separation. A disappearance of the so-called ripple (wave-like) phase of DPPC lipid in the mixture is also observed.