

03;08

Влияние ионов Na^+ , Ca^{2+} и D_2O на кинетику гетерофазных флуктуаций плотности в липидном бислое

© Д.Б. Берг, Д.П. Харакоз

Институт промышленной экологии УрО РАН, Екатеринбург
Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино

Поступило в Редакцию 19 июля 1999 г.

По экспериментально измеренным температурным зависимостям скорости и поглощения ультразвука (7 MHz) рассчитаны температурные зависимости эффективного времени релаксации τ_{eff} процесса зародышеобразования вблизи температуры фазового перехода T_i в фосфолипидных бислоях. Обнаружена слабая чувствительность τ_{eff} к ионному составу среды и сильная — к кривизне бислоя и к замене H_2O на D_2O .

Согласно теории Френкеля, вблизи температуры фазового перехода внутри основной фазы наблюдаются спонтанное появление и распад субкритических зародышей новой фазы, которые являются гетерофазными флуктуациями плотности (ГФП) [1,2]. В бислое амфифильных фосфолипидных молекул, упорядоченных по типу смектического жидкого кристалла, при температурном фазовом переходе наблюдается "кристаллизация–плавление" углеводородных цепочек [3]. Их конформационные изменения влияют на сжимаемость гетерогенной среды, что обнаруживается ультразвуковым методом [4]. В жидкой фазе бислоя вблизи температуры фазового перехода (T_i) обнаружены ГФП в виде двумерных твердофазных зародышей в ламеллярной плоскости липидного бислоя [5]. Кинетика флуктуаций прямо связана с вероятностью формирования критического зародыша и кинетикой перехода в твердое состояние [6]. Известно, что на температуру фазового перехода влияют многие факторы, например, ионный состав водной фазы [3]. Данные по влиянию этих факторов на кинетику гетерофазных флуктуаций отсутствуют.

В данной работе исследовано влияние ионов Na^+ и Ca^{2+} , а также замены H_2O на D_2O и кривизны бислоя на эффективное время

релаксации ГФП в бислоиных везикулах 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДПФХ). Использовался синтетический лиофилизированный ДПФХ фирмы Sigma (США). Чистота препарата более 99%. Большие мильтиламеллярные (многослойные) везикулы (МЛВ) диаметром 500–1000 нм готовились путем растворения липида в органическом растворителе с последующей вакуумной сушкой и диспергированием в водной среде [7] различного солевого и изотопного состава: H₂O (дважды дистиллированная), D₂O (чистота 99.9%), растворы ч.д.а. NaCl (концентрации 10 и 100 мМ) и CaCl₂ (концентрации 11.38 и 113.8 мМ). Таким образом обеспечивалась идентичность состава водной среды внутри и вне каждой везикулы. Концентрация липида в суспензии 1–5 мг/мл. Малые одноламеллярные везикулы (ОЛВ) диаметром 15–50 нм готовились из МЛВ путем "озвучивания" и центрифугирования по методике [8]. Перевод ОЛВ в большие везикулы проводился по методу "замораживания–оттаивания" [9] (5 циклов).

Измерения скорости и поглощения ультразвука проводились на дифференциальном ультразвуковом интерферометре постоянной длины, который состоит из двух идентичных акустических резонаторов [10]. Интервал частот резонансных пиков 6.9–7.3 МГц. Относительная точность измерения скорости звука составляет $1 \cdot 10^{-3}\%$, поглощения — 1%; их температурные зависимости измерялись одновременно на одном образце в режиме нагрева (0.2 К/мин). Сравнением акустических характеристик липидной суспензии и водной среды без липида определялись удельная скорость звука $[u] \equiv (u - u_0)/u_0 c$ и удельное поглощение звука на длину волны $[\alpha\lambda] \equiv (\alpha\lambda - \alpha\lambda_0)/c$, где u и u_0 — скорость звука в суспензии и водной среде, соответственно, $\alpha\lambda$ и $\alpha\lambda_0$ — поглощение на длину волны в суспензии и в водной среде, c — концентрация липида. Значение $[u]$ состоит из двух составляющих: мгновенной, $[u]_\infty$, которая определяется сжимаемостью системы в отсутствие гетерофазных флуктуаций, и релаксационной, $[u]_r$, обусловленной ростом и распадом гетерофазных флуктуаций: $[u] = [u]_\infty + [u]_r$.

Удельное поглощение $[\alpha\lambda]$ состоит из классического поглощения, $[\alpha\lambda]_{cl}$, вследствие сдвиговой вязкости среды, и релаксационного поглощения, $[\alpha\lambda]_r$, обусловленного диссипацией энергии ультразвуковых колебаний при релаксационном процессе: $[\alpha\lambda] = [\alpha\lambda]_{cl} + [\alpha\lambda]_r$. Согласно работе [11], измеряемое поглощение для разбавленных липидных суспензий в диапазоне мегагерцовых частот относится только к релаксационной части: $[\alpha\lambda] \approx [\alpha\lambda]_r$. Она содержит вклады всех

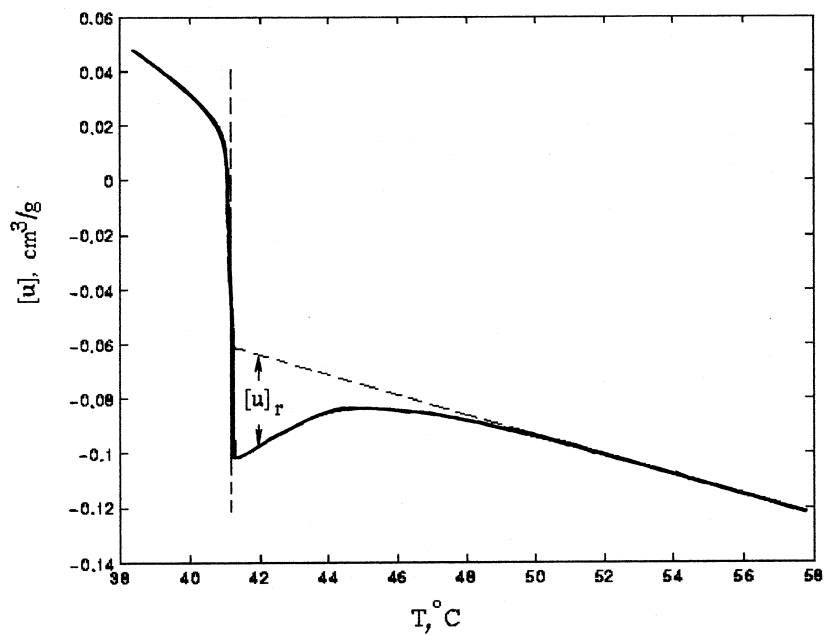


Рис. 1. Удельное значение скорости звука; температура фазового перехода (41.3°C) определяется линейной экстраполяцией низко- и высокотемпературных областей кривой к средней точке фазового перехода (вертикальная линия).

видов флуктуаций, включая гетерофазные. Релаксация ГФП является следствием переменного давления на ультразвуковых частотах.

На рисунках приведена оценка кинетики ГФП в липидном жидкокристаллическом бислое ультразвуковым методом [5].

На рис. 1,2 показаны температурные зависимости удельных значений скорости и поглощения звука (ниже — "скорость" и "поглощение" соответственно) в суспензиях МЛВ ДПФХ в чистой воде. В области фазового перехода форма кривой для скорости существенно отклоняется от простой сигмоидальной, которую можно было бы ожидать из соотношения вкладов двух состояний липида. Отклонение обусловлено релаксационным процессом ГФП, который приводит к

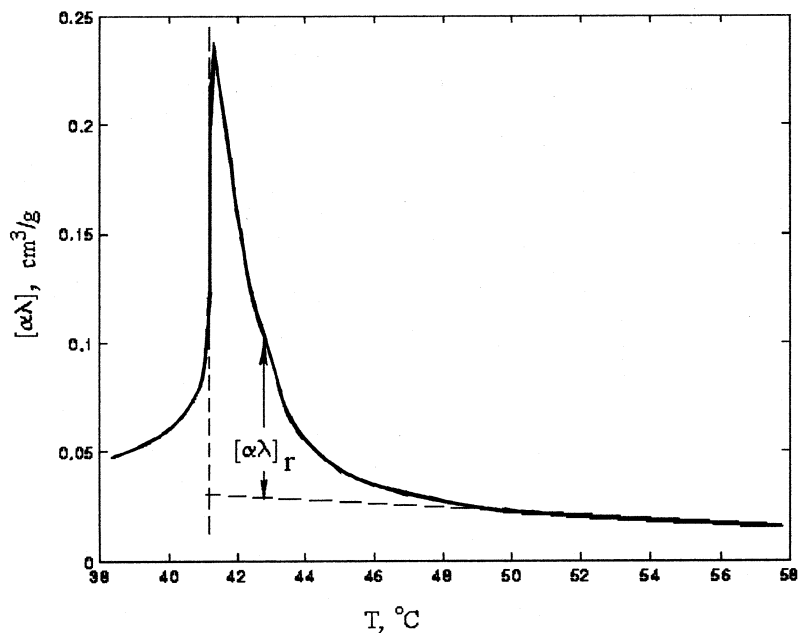


Рис. 2. Удельное значение поглощения.

дополнительной сжимаемости вблизи перехода [5]. Релаксационные составляющие скорости и поглощения могут быть определены путем линейной экстраполяции температурных зависимостей $[u]$ и $[\alpha\lambda]$ из области высоких температур, где релаксационный вклад пренебрежимо мал. Тогда релаксационные части $[u]_r$ и $[\alpha\lambda]_r$ определяются как разность между экспериментальной кривой и экстраполяционной прямой, рис. 1, 2 (детали см. в работах [5] и [12]).

Для процесса с одним временем релаксации отношение величин $[\alpha\lambda]_r$ и $[u]_r$ связано с временем релаксации, τ , следующим соотношением: $\tau = -[\alpha\lambda]_r / (2\pi\omega[u]_r)$, где ω — круговая частота ультразвука [13]. Поскольку реальный процесс описывается спектром времен релаксации ГФП, то это соотношение дает некоторую эффективную величину $\tau_{\text{эф}}$. Это усредненная характеристика той части спектра релаксационных

Значения температур фазового перехода и изменений эффективного времени релаксации гетерофазных флуктуаций плотности в везикулах синтетического дипальмитоилфосфатидилхолина в водных средах различного солевого и изотопного состава и при различной кривизне мембраны

Состав системы	Значение T_t^* , °C	Сдвиг T_t^{**} , °C	Изменение τ_{eff}^{***}
МЛВ в H_2O	41.29	—	—
То же, в присутствии:			
NaCl, 10 mM	41.42	0.13	нет
NaCl, 100 mM	41.49	0.20	нет
CaCl_2 , 11.38 mM	41.90	0.61	слабо уменьшается
CaCl_2 , 113.8 mM	42.90	1.61	нет
МЛВ в D_2O	41.70	0.41	в 2 раза уменьшается
ОЛВ в H_2O	38.23	-3.06	в 1.5 раза уменьшается
МЛВ из ОЛВ	41.36	—	нет

* — точность определения не хуже $\pm 0.04^\circ\text{C}$

** — рассчитывается как разность T_t в исследуемой системе и T_t в больших мультиламеллярных везикулах (МЛВ) в H_2O

*** — относительно значения τ_{eff} для больших мультиламеллярных везикул (МЛВ) в H_2O (рис. 3).

процессов, которые вносят вклад в скорость и поглощение, измеренные на частоте ω .

В ионной среде (рис. 3, таблица) значение температуры фазового перехода (T_t) повышается. Величина сдвига растет с увеличением концентрации соли, что соответствует литературным данным [3]. NaCl в пределах ошибки не влияет на τ_{eff} . В среде с CaCl_2 в концентрации 11.38 mM выявлено незначительное уменьшение τ_{eff} , тогда как при более высокой концентрации соли (113.8 mM) значения τ_{eff} возвращаются к прежним значениям. Это, вероятно, указывает на нелинейную зависимость времени релаксации ГФП от концентрации CaCl_2 . Подобные нелинейные зависимости известны для плотности фосфолипидных монослоев на поверхности воды и кинетики формирования жидкокристаллических текстур в плоском капилляре [14].

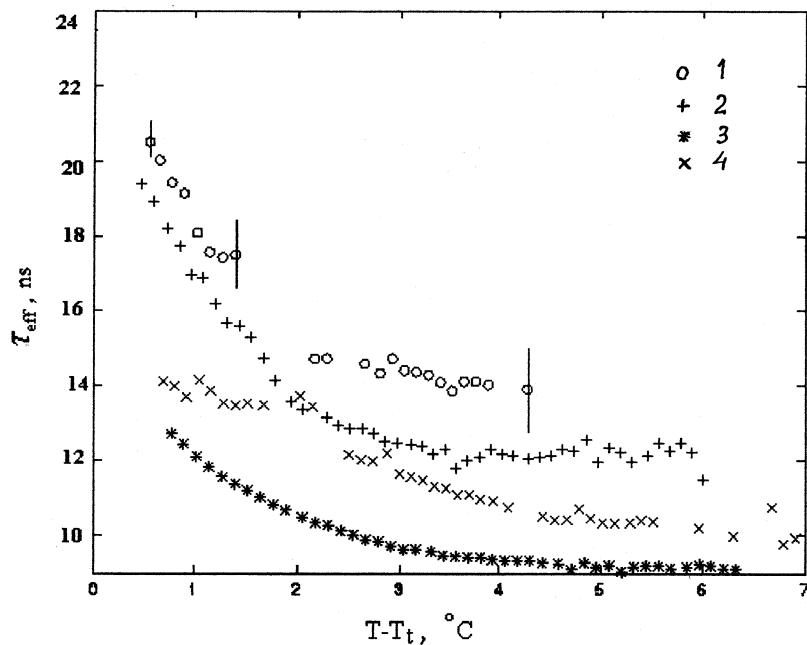


Рис. 3. Значения эффективных времен релаксации; $T - T_t$ — разность между температурой измерения (T) и температурой фазового перехода (T_t); 1 — МЛВ в H_2O , 2 — МЛВ в H_2O и $CaCl_2$ (11.38 mM), 3 — МЛВ в D_2O , 4 — ОЛВ в H_2O .

Замена H_2O на D_2O приводит к незначительному увеличению T_t в больших мультислойных везикулах, τ_{eff} уменьшается почти вдвое (рис. 3). Для малых однослойных в H_2O значения T_t и τ_{eff} меньше, чем для больших везикул в H_2O .

После слияния малых везикул в большие T_t и τ_{eff} принимают те же значения, что и для больших в H_2O — большая кривизна и напряженность бислоя в малых везикулах влияют как на значение T_t [3], так и на τ_{eff} ГФП.

Таким образом, кинетика гетерофазных флуктуаций слабо чувствительна к изменению ионного состава среды. В то же время заметное влияние на нее оказывают кривизна поверхности бислоя и замена H_2O на D_2O .

Список литературы

- [1] Френкель Я.И. Кинетическая теория жидкостей / Ред. Семенов Н.Н., Глауберман А.Е. Л., Наука. 1975.
- [2] Ubellonde A.B. Melting and Crystal Structure. Clarendon Press: Oxford, 1965. 460 p.
- [3] Sevc G., Marsh D. Phospholipid Bilayers. New York: J. Willey-Interscience, 1987. 442 p.
- [4] Mitaku S., Date T. // Bioch. Bioph. Acta. 1982. V. 688. P. 411–417.
- [5] Kharakoz D.P., Colotto A., Lohner C., Laggner P.J. // Phys. Chem. 1993. V. 7. P. 9844–9851.
- [6] Харакоз Д.П. // Биофизика. 1995. Т. 40. С. 1354–1356.
- [7] Maunard V.M., Dunn F. // Chem. Phys. Lipids. 1985. V. 37. P. 1–12.
- [8] Mendelsohn R., Sunder S. // Bioch. Bioph. Acta. 1976. V. 419. P. 563–569.
- [9] Бергельсон Л.Д. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука. 1981. 256 с.
- [10] Сарвазян А.П., Харакоз Д.П. // Приборы и техника эксперимента. 1981. № 3. С. 203–206.
- [11] Mitaku S., Jipiro T., Kataoka R. // Bioph. J. 1983. V. 42. P. 137–144.
- [12] Харакоз Д.П., Шильников Г.В., Пожарский Э.В. // Биофизика. 1997. Т. 42. С. 395–399.
- [13] Kharakoz D.P. // J. Acoust. Soc. Amer. 1992. V. 91. P. 287–289.
- [14] Попов Е.В., Кононенко Е.В. // Поверхность. 1993. № 5. С. 123–126.