

Д. В. Соловій^{1,2}, Л. А. Булавін², В. І. Горделій^{1,4,5}, Ю. Є. Горшкова¹,
О. І. Іваньков^{1,2}, Ю. С. Ковальов¹, А. І. Куклін^{1,3}, Т. Ю. Ніколаєнко²

¹ Об'єднаний інститут ядерних досліджень, Дубна, Росія

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

³ Біонаноцентр Московського фізико-технічного інституту, Долгопрудний, Росія

⁴ Інститут структурної біології Ж. П. Ебеля, Гренобль, Франція

⁵ Інститут складних систем, Юліх, Німеччина

НЕЙТРОННІ ДОСЛІДЖЕННЯ БАРИЧНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ СТРУКТУРИ ЛІПІДНОГО БІШАРУ

Представлено результати дослідження структури ліпідного бішару, що виконані за допомогою методу малокутового розсіювання нейтронів на реакторі ІБР-2М Об'єднаного інституту ядерних досліджень (Дубна, Росія). Експеримент проводився на спектрометрі малокутового розсіювання нейтронів ЮМО, удосконаленому пристроєм для отримання P–V–T даних досліджуваної речовини. За досліджувану речовину обрана рідинна система D₂O–1,2-дипальмітоїл-sn-гліцero-3-фосфатидилхолін (ДПФХ), що моделює природні мембрани. В експерименті вперше вимірювався просторовий період ліпідного бішару водночас із вимірюванням ізотермічної стисливості зразка при різних тисках. Показано, що перехід ліпідного бішару в досліджуваній системі з ріпл-фази (хвилеподібної гель-фази) у рідкокристалічну фазу відбувається при аномальній зміні ізотермічної стисливості, що відповідає фазовому переходу.

Ключові слова: 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцero-3-фосфатидилхолін, малокутове розсіювання нейтронів, P–V–T дослідження, фазові переходи.

Вступ

Дослідження фазових переходів у модельних ліпідних мембранах мають як фундаментальне, так і прикладне значення. Зазначимо, що ліпідні мембрани є досить вдалою моделлю біологічних мембран, що дає змогу досліджувати вплив різних фізичних факторів на структуру реальних біологічних мембран. Для дослідження фазових переходів у ліпідних мембранах необхідно мати інформацію про властивості модельних ліпідних мембран та вплив температури й тиску на структурні зміни ліпідного бішару. Разом з тим навіть сам характер головного фазового переходу (переходу з гель-фази в рідкокристалічну) у ліпідних мембранах остаточно не з'ясований. Так, автори [1, 2] розглянули можливість опису головного фазового переходу в ліпідних системах як слабого орієнтаційного переходу першого роду, що близький за своїми характеристиками до фазового переходу другого роду. При цьому автори вказують на стрибкоподібне поведіння термодинамічних параметрів, зокрема стисливості й параметра порядку. Існує низка робіт із досліджень фазових переходів у ліпідних мембранах калориметричним [3, 4], рентгенографічним [5, 6], нейтронним [7, 8] методами. Разом з тим кількість робіт, присвячених дослідженню стисливості ліпідних систем поблизу точки фазового переходу, незначна [9].

Зауважимо, що дослідження фазових перехо-

дів під тиском пов'язане з необхідністю використання камер для підтримання тиску (баростатів), що значно послаблює рентгенівські потоки, а тому використання рентгенівського розсіювання, на сьогодні, можливо тільки на синхротронних джерелах і зі специфічними баростатами. Використання нейтронних джерел стає актуальним саме при вирішенні подібних задач. Особливістю спектрометра малокутового розсіювання нейтронів ЮМО є використання усього теплового спектра нейтронів, що дає змогу ефективно зменшити час експозиції.

У представленій роботі вперше одночасно досліджувалися баричні зміни структури та ізотермічної стисливості ліпідного бішару.

Матеріали та методи

Модельна система біологічної мембрани була створена на основі синтетичного 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцero-3-фосфатидилхоліну (ДПФХ), який був люб'язно наданий фірмою Avanti (Бірінгем, Великобританія) і використовувався без подальшого очищення. Мультиламелярні везикули виготовлялись у такий спосіб: порошок ліпиду ДПФХ розчинявся в D₂O. Отримана суміш ретельно перемішувалася за допомогою шейкера. Гомогенізація зразка досягалася шляхом циклічної процедури заморожування-відтаювання. Концентрація ДПФХ у зразку становила 10 % по масі, а загальний об'єм рідинної системи при атмосферному тиску був 3,5 мл. Гомогенний зразок

вміщувався в баростат [10, 11], у якому й проводилися нейтронні та P–V–T дослідження [11 - 13]. Контроль за температурою здійснювався за допомогою термостата Lauda (Германія) з точністю до 0,1 °C. Похибка вимірювання тиску в експерименті становила 1 атм.

Контроль за роботою спектрометра, доповненого P–V–T пристроєм, та накопичення експериментальних даних проходили за допомогою програмного комплексу “SONIX” [14]. Для вимірювань малокутового розсіювання нейтронів зразком поблизу точки фазового переходу ми використовували істотну перевагу імпульсного реактора на швидких нейтронах ІБР-2М (Дубна, Росія) – високу густину потоку [15], що дало змогу скоротити час вимірювання однієї експериментальної точки до десятка хвилин.

Обробка експериментальних даних із малокутового розсіювання нейтронів реалізовувалася за допомогою програмного комплексу SAS [16]. При аналізі структурних особливостей досліджуваної рідинної системи використовувалася методика, що враховує роздільну здатність установки [17].

Результати та обговорення

При плануванні й проведенні дослідження зміни структури та ізотермічної стисливості ліпідного бішару в рідинній системі ДПФХ-D₂O ми користувалися фазовою діаграмою [18] (рис. 1).

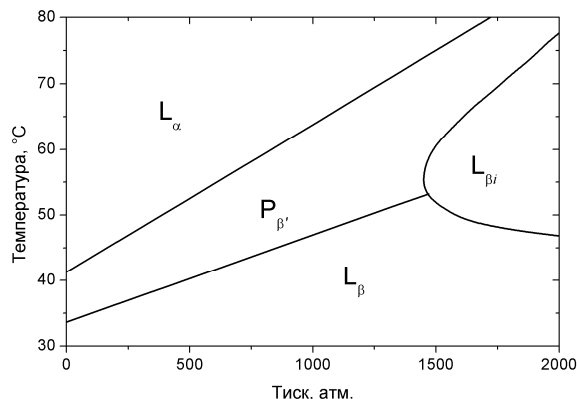


Рис. 1. Фазова діаграма суміші вода - 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-фосфатидилхолін (ДПФХ) [18] за умови надлишку води: L_α – рідкокристалічна фаза; P_{β'}, L_β, L_{βi} – гель-фази; P_{β'} – хвилеподібна гель-фаза (ріпл-фаза).

Як бачимо з рисунка, перехід із рідкокристалічної фази L_α в ріпл-фазу P_β в координатах «температура - тиск» у деякому наближенні є прямою лінією при температурі вище 41 °C, яка при нормальному тиску відповідає головному фазовому переходу ліпиду ДПФХ. Нижче цієї температури вказаний фазовий перехід не існує. Тому для про-

ведення експерименту була обрана температура 50 °C. Вибір більш високої температури міг призвести до того, що фазовий перехід мав реалізуватися при тисках, що лежать за межами використовуваного баростата. При вказаній температурі ми змінювали тиск із кроком 30 атм і проводили вимірювання малокутового спектра розсіювання нейтронів та ізотермічної стисливості.

Вимірювання проводилися в такий спосіб. Спочатку в баростаті зі зразком було створено тиск 400 атм при температурі 50 °C. За таких умов було проведено експеримент із малокутового розсіювання нейтронів у досліджуваній рідинній системі. Надалі тиск поступово зменшували з кроком 30 атм і вимірювання спектра малокутового розсіювання нейтронів повторювали. При цьому вимірювалася зміна внутрішнього об'єму ΔV системи при зміні тиску, що дозволило отримати значення ізотермічної стисливості k_T модельної рідинної системи при 50 °C у відносних одиницях (без нормування на об'єм системи):

$$k_T = - \frac{\Delta V}{\Delta P} \quad (1)$$

Таким чином, були отримані спектри малокутового розсіювання нейтронів у діапазоні тисків (10÷400) атм із кроком 30 атм при фіксованій температурі. Варто відзначити, що вперше експерименти по малокутовому розсіюванню нейтронів і P–V–T вимірювання були проведені водночас на одному й тому ж зразку.

На рис. 2 представлено криві малокутового розсіювання нейтронів ліпідом ДПФХ за умови надлишку D₂O. Ці криві відображають залежність інтенсивності розсіяння I, вказаної у відносних одиницях, від модуля переданого хвильового вектора нейтронів (так званого вектора розсіяння) $q = |\vec{k} - \vec{k}'|$, який визначається за формулою

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda},$$

де θ – кут розсіяння нейтронів; λ – довжина хвилі де Бройля нейтронів.

Наявність інтенсивних піків на кривих малокутового розсіювання нейтронів при тисках 40 і 100 атм свідчить про те, що досліджувана рідинна система має мультишарове впорядкування. Зміни положення й форми дифракційних піків на кривих малокутового розсіювання нейтронів при зміні тиску свідчить про зміну структури ліпідного бішару. При тиску вище 190 атм, який близький до тиску фазового переходу, дифракційний пік суттєво зменшується і при тиску 340 атм

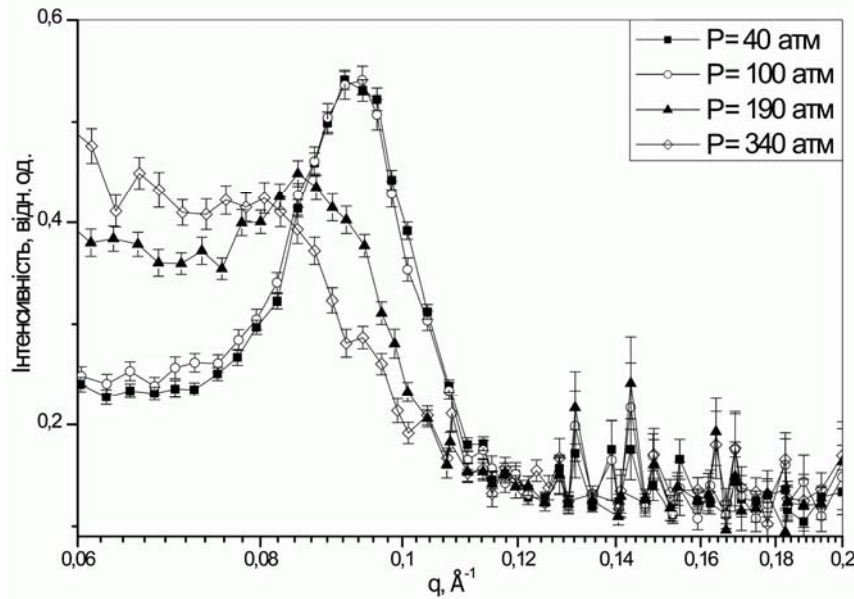


Рис. 2. Криві малокутового розсіювання нейтронів рідинною системою ДПФХ-D₂O при температурі 50 °С при тисках 40 (квадрати), 100 (кола), 190 (трикутники) та 340 атм (ромби).

майже зникає. Це пов'язано з тим, що при температурі 50 °С і тиску 340 атм ДПФХ знаходиться в так званій ріпл-фазі (хвилеподібній гель-фазі), що характеризується слабким упорядкуванням ліпідних мультишарів. При зниженні тиску ліпід переходить у рідкокристалічну фазу, в якій бішари упорядковані, і тоді на кривих малокутового розсіювання нейтронів при тисках 40 та 100 атм дифракційні піки стають більш чіткими.

Обробка масиву даних про малокутове розсіювання нейтронів у рідинній системі

ДПФХ-D₂O, що знаходилася в баростаті під тиском (10÷400) атм, проводилися таким чином. Враховуючи положення піка малокутового розсіювання нейтронів q , за формулою

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

було розраховано просторовий період (період повторюваності) ліпідного бішару D для різних тисків. Результати розрахунків представлено на рис. 3.

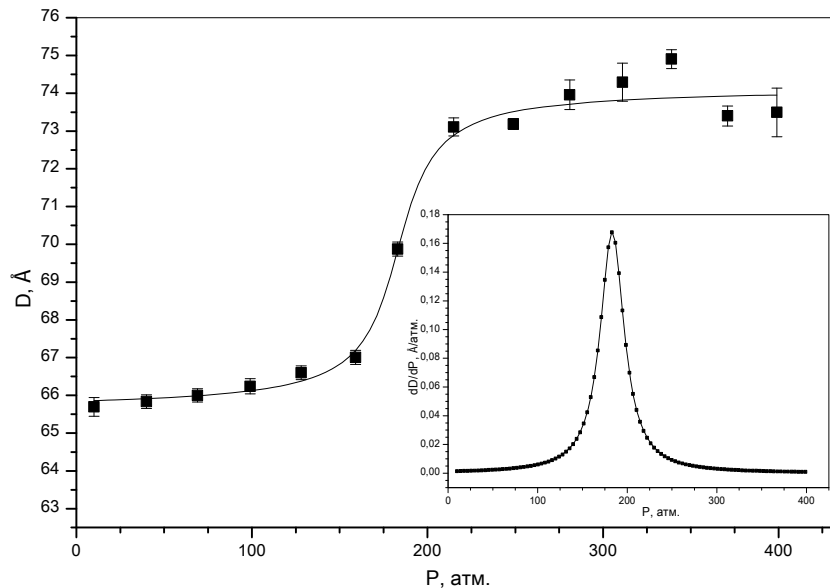


Рис. 3. Барична залежність просторового періоду ліпідного бішару ДПФХ при температурі 50 °С. Лінія відповідає лінії апроксимації експериментальних точок виразом $D = C1 + C2 \cdot \arctan(C3 \cdot P + C4)$. На вставці вказана похідна лінії апроксимації.

Одержані величини просторових періодів D ліпідного бішару свідчать про те, що зі зниженням тиску відбувається перехід ліпиду ДПФХ із ріпл-фази в рідкокристалічну фазу. Завдяки малокутової дифракції нейтронів було визначено просторовий період для ріпл-фази $D_P \approx 73,5 \text{ \AA}$ та просторовий період для рідкокристалічної фази $D_L \approx 65,5 \text{ \AA}$.

Для визначення тиску, за якого при температурі $50 \text{ }^\circ\text{C}$ відбувається фазовий перехід у ДПФХ, ми провели апроксимацію експериментальних точок (див. рис. 3, де результат апроксимації зображено суцільною лінією). Найкраще узгодження з експериментом досягалось при виборі функції апроксимації у вигляді $D = C1 + C2 \cdot \arctan(C3 \cdot P + C4)$, де D – просторовий період ліпідного бішару, P – тиск, а $C1, C2, C3, C4$ – вільні параметри. Для визначення точки перегину кривої апроксимації вона була продиференційована (див. вставку на рис. 3). Максимум на отриманій кривій $dD/dP = f(P)$ відповідає тиску $P_0 = 184 \pm 1 \text{ атм}$. Таким чином, за даними малокутового розсіювання нейтронів фазовий перехід ліпиду ДПФХ із ріпл-фази в рідкокристалічну фазу при температурі $50 \text{ }^\circ\text{C}$ відбувається при тиску $P_0 = 184 \pm 1 \text{ атм}$.

На рис. 4 представлено баричну залежність ізотермічної стисливості рідинної системи ДПФХ- D_2O . Зауважимо, що визначення ізотермічної стисливості системи вимагає математичної обробки експериментальних даних – використання формули (1) при сталій температурі й чисельному диференціюванні, що істотно збільшує похибку координат точок у залежності $k_T(P)$ порівняно із суто експериментальною. Методика обробки експериментальних даних, використана в даній роботі для визначення ізотермічної стисливості системи, характеризується похибкою визначення тиску $\Delta P = 15 \text{ атм}$.

Аномальне зростання ізотермічної стисливості свідчить про наявність фазового переходу у системі ДПФХ- D_2O . Для знаходження координати максимуму ізотермічної стисливості експериментальні точки були апроксимовані за допомогою функції Гаусса. При цьому виявлено, що максимум ізотермічної стисливості знаходився при тиску $P = 196 \text{ атм}$. З урахуванням похибки визначення тиску у залежності $k_T(P)$ ($\Delta P = 15 \text{ атм}$) це значення збігається зі значенням тиску $P_0 = 184 \pm 1 \text{ атм}$, при якому відбувається фазовий перехід з ріпл-фази в рідкокристалічну фазу, знайденим в експерименті з малокутового розсіювання нейтронів.

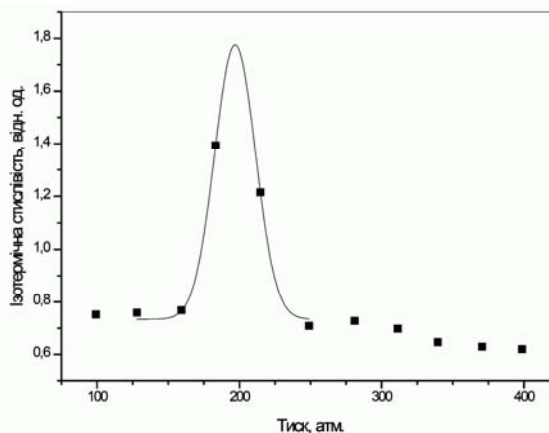


Рис. 4. Барична залежність ізотермічної стисливості системи ДПФХ- D_2O при температурі $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (квадрати). Лінією показана апроксимація піка функцією Гаусса.

При цьому отриманий нами тиск фазового переходу в ліпіді ДПФХ при температурі $50 \text{ }^\circ\text{C}$ відрізняється від тиску фазового переходу при цій температурі, указаного на фазовій діаграмі в роботі [18] (див. рис. 1). Це пов'язано з тим, що авторами роботи [18] ліпід ДПФХ досліджувався в умовах, відмінних від тих, що реалізувалися в нашому експерименті. У той же час відомо, що фізичні властивості систем “ліпід - вода” є дуже чутливими до таких факторів, як тип розчинника (H_2O чи D_2O), концентрація ліпиду в розчині, точність вимірювання температури та, навіть, методика приготування зразка.

Висновки

Таким чином, за допомогою малокутового розсіювання нейтронів у системі 1,2-дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-фосфатидилхолін- D_2O за умови різних тисків знайдено дифракційні піки, що відповідають певному періоду повторюваності ліпідних бішарів. Показано, що при підвищенні тиску вказана повторюваність зникає, що й свідчить про перехід зразка з рідкокристалічної фази у хвилеподібну гель-фазу. Доповнення баростатом спектрометра малокутового розсіювання нейтронів ЮМО дало змогу за P - V - T даними дослідженого зразка знайти аномалію ізотермічної стисливості досліджуваної рідинної системи й уточнити значення тиску фазового переходу ліпідного бішару з рідкокристалічної фази у хвилеподібну гель-фазу.

Автори вдячні Т. Б. Петуховій та А. П. Сиротіну за допомогу у створенні P - V - T установки, А. Х. Ісламову за плідні обговорення. А. І. Куклін, В. І. Горделій та Ю. С. Ковальов висловлюють подяку ФЦП (державний контракт № P-1160).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Kats E.I., Lebedev V.V., Muratov A.R.* Weak crystallization theory // *Physics Reports*. - 1993. - Vol. 228. - P. 1 - 91.
2. *Pikin S., Kharakoz D., Tiktopulo L. et al.* Molecular aspects of the main phase transition in lipid systems as a weak first-order phase transition: 1. Model of thermodynamic behavior of lipid membranes // *Crystallography Reports*. - 2005. - Vol. 50. - P. 308 - 315.
3. *McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N.* Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines // *Biochemistry*. - 1993. - Vol. 32. - P. 516 - 522.
4. *Lentz B.R., Freire E., Biltonen R.L.* Fluorescence and calorimetric studies of phase transitions in phosphatidylcholine multilayers: kinetics of the pretransition // *Biochemistry*. - 1978. - Vol. 17. - P. 4475 - 4480.
5. *Czeslik C., Reis O., Winter R. et al.* Effect of high pressure on the structure of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes: a synchrotron-X-ray diffraction and FT-IR spectroscopy study using the diamond anvil technique // *Chemistry and Physics of Lipids*. - 1998. - Vol. 91. - P. 135 - 144.
6. *Solov'ev D., Kuklin A., Utrobin P. et al.* X-ray scattering and volumetric P-V-T studies of the dimyristoylphosphatidylcholine-water system // *Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*. - 2011. - Vol. 5. - P. 7 - 10.
7. *Winter R., Pilgrim W.C.* A SANS Study of High Pressure Phase Transitions in Model Biomembranes // *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*. - 1989. - Vol. 93. - P. 708 - 717.
8. *Gordeliy V.I., Ivkov V.G., Ostanevich Yu M. et al.* Detection of structural defects in phosphatidylcholine membranes by small-angle neutron scattering. The cluster model of a lipid bilayer // *Biochim Biophys Acta*. - 1991. - Vol. 1061. - P. 39 - 48.
9. *Tosh R.E., Collings P.J.* High pressure volumetric measurements in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers // *Biochim Biophys Acta*. - 1986. - Vol. 859. - P. 10 - 14.
10. *Куклин А.И., Утробин П.К., Иваньков О.И. et al.* Установка высокого гидростатического давления на малоугловом спектрометре ЮМО // *Сообщение ОИЯИ*. - 2008. - P13-2008-19.
11. *Kuklin A.I., Soloviov D.V., Rogachev A.V. et al.* New opportunities provided by modernized small-angle neutron scattering two-detector system instrument (YuMO) // *Journal of Physics: Conference Series*. - 2011. - Vol. 291. - P. 012013.
12. *Kuklin A.I., Islamov A.K., Gordeliy V.I.* Two-detector System for Small-Angle Neutron Scattering Instrument // *Neutron News*. - 2005. - Vol. 16. - P. 16 - 18.
13. *Kuklin A.I., Islamov A.K., Kovalev Y.S. et al.* Optimization two-detector system small-angle neutron spectrometer YuMO for nanoobject investigation // *Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*. - 2006. - Vol. 6. - P. 74 - 83.
14. *Kirilov A.S., Litvinenko E.I., Astakhova N.V. et al.* Evolution of the SONIX Software Package for the YuMO Spectrometer at the IBR-2 Reactor, Instruments and Experimental Techniques // *Pribory i tekhnika eksperimenta*. - 2004. - Vol. 47. - P. 334 - 336.
15. *Kuklin A., Rogov A., Gorshkova Y. et al.* Analysis of neutron spectra and fluxes obtained with cold and thermal moderators at IBR-2 reactor: Experimental and computer-modeling studies // *Physics of Particles and Nuclei Letters*. - 2011. - Vol. 8. - P. 119 - 128.
16. *Soloviev A.G., Sioloviova T.M., Stadnik A.V. et al.* The Package for Small-Angle Neutron Scattering Data Treatment // *JINR Communication*. - 2003. - P10-2003-86.
17. *Soloviev A.G., Litvinenko E.I., Ososkov G.A. et al.* Application of wavelet analysis to data treatment for small-angle neutron scattering // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. - 2003. - Vol. 502. - P. 500 - 502.
18. *Winter R.* Exploring the Energy and Conformational Landscape of Biomolecules Under Extreme Conditions // *High-Pressure Crystallography* / Ed. by E. Boldyreva, P. Dera. - Netherlands: Springer, 2010. - P. 573 - 590.

**Д. В. Соловьев, Л. А. Булавин, В. И. Горделий, Ю. Е. Горшкова,
О. И. Иваньков, Ю. С. Ковалев, А. И. Куклин, Т. Ю. Николаенко**

НЕЙТРОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БАРИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ СТРУКТУРЫ ЛИПИДНОГО БИШАРА

Представлены результаты исследования структуры липидного бисара, выполненные при помощи метода малоуглового рассеяния нейтронов на реакторе ИБР-2М Объединенного института ядерных исследований (Дубна, Россия). Эксперимент проводился на спектрометре малоуглового рассеяния нейтронов ЮМО, усовершенствованном устройством для получения P-V-T данных исследуемого вещества. В качестве исследуемого вещества была выбрана жидкостная система D₂O-1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (ДПФХ), моделирующая природные мембраны. В эксперименте измерялся пространственный период липидного бисара одновременно с измерениями изотермической сжимаемости образца при разных давлениях. Показано, что переход липидного бисара в исследуемой системе из рипл-фазы (волнообразной гель-фазы) в жидкокристаллическую фазу происходит при аномальном изменении изотермической сжимаемости, соответствующей фазовому переходу.

Ключевые слова: 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин, малоугловое рассеяние нейтронов, P-V-T исследования, фазовые переходы.

**D. V. Soloviov, L. A. Bulavin, V. I. Gordeliy, Yu. E. Gorshkova,
O. I. Ivankov, Y. S. Kovalev, A. I. Kuklin, T. Yu. Nikolaienko**

**NEUTRON SCATTERING INVESTIGATIONS
OF THE LIPID BILAYER STRUCTURE PRESSURE DEPENDENCE**

Lipid bilayer structure investigation results obtained with small angle neutron scattering method at the Joint Institute for Nuclear Research IBR-2M nuclear reactor (Dubna, Russia) are presented. Experiment has been performed with small angle neutron scattering spectrometer YuMO, upgraded with the apparatus for performing P-V-T measurements on the substance under investigation. D₂O-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) liquid system, presenting the model of natural live membrane, has been taken as the sample for investigations. The lipid bilayer spatial period was measured in experiment along with isothermal compressibility simultaneously at different pressures. It has been shown, that the bilayer structural transition from ripple (wavelike gel-phase) phase to liquid-crystal phase is accompanied with anomalous rise of isothermal compressibility, indicating occurrence of the phase transition.

Keywords: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, small angle neutron scattering, P-V-T investigations, phase transitions.

Надійшла до редакції 07.02.2012.