

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФУЗИИ ВОДЫ ЧЕРЕЗ ЛИПИДНЫЕ БИСЛОИ МЕТОДОМ ЯМР

Хакимов А.М., Рудакова М.А., Дорогиницкий М.М., Филиппов А.В.
Казанский государственный университет, e-mail: from201@ksu.ru

В макроскопически ориентированных бислоях липида диолеоилфосфатидилхолина в зависимости от гидратации исследованы состояние адсорбированной воды (по зависимости формы спектра ^1H ЯМР от угла нормали к бислоям относительно направления магнитного поля) и диффузия молекул воды в направлении нормали к бислоям. Значения коэффициентов трансбислойной диффузии воды на 4 десятичных порядка меньше, чем для объемной воды и в 10 раз меньше коэффициентов латеральной диффузии липида при тех же условиях. При концентрациях воды ниже значения, соответствующего гидратации из насыщенных паров χ_{eq} , вся вода входит в гидратные оболочки полярных «голов» липидов или находится в состоянии «быстрого обмена» с гидратной водой, что приводит к исчезновению спинового эхо в узком интервале углов, близких к «магическому углу», $54,7^\circ$. При концентрациях превышающих χ_{eq} сигнал спинового эхо от воды сохраняется при всех ориентациях бислоев, что свидетельствует о том, что часть воды между бислоями («квазисвободной воды») находится в состоянии «медленного обмена» с водой, «связанной» с полярными «головами». При этом наблюдаются два коэффициента диффузии (D): компонента с меньшим D обусловлена трансбислойной диффузией воды, а компонента с большим D – диффузией в «дефектах бислоев». Наблюдается обратная зависимость коэффициента диффузии воды через систему бислоев от степени гидратации, которая описывается при учете в модели Таннера диффузии молекул воды в гидрофобной части бислоя конечной толщины и изменении доли воды между бислоями. Температурная зависимость коэффициента диффузии описывается Аррениусовым законом с кажущейся энергией активации около 41 кДж/моль, что значительно превышает энергию активации для диффузии объемной воды (18 кДж/моль). Проведен анализ полученных экспериментальных данных что позволило учесть роль эффектов проницаемости бислоя для кажущейся энергии активации воды в бислое, которые оказались близкими к значениям для объемной воды.

Введение

Прохождение малых молекул через липидные бислои, в том числе молекул воды, – явление, которое имеет значение для понимания функционирования клеточной мембраны. Однако механизм этого явления недостаточно изучен. Изменение соотношения между водой и липидами (степени гидратации) – важный фактор, определяющий морфологию системы. В гидратированных мультибислоях липидов основная часть воды располагается в области полярных голов и между бислоями. На каждую молекулу липида приходится несколько молекул «связанной» воды, которые образуют гидратную оболочку. При определенной гидратации и в зависимости от липида система может переходить в гексагональные, кубические фазы или образовывать мицеллы [1]. Для липидного бислоя изменение гидратации может привести к изменению температуры фазового перехода гель – жидкий кристалл. [2]. При увеличении концентрации воды толщина бислоя уменьшается, а площадь на молекулу липида увеличивается [3]. Увеличение гидратации приводит к изменению конформации «голов» и увеличению скорости их движения, холиновый диполь становится более поднятым относительно средней ориентации в водном слое и увеличивается скорость локальных движений «головы» [2]. При пониженных концентрациях воды (менее 24 вес.%) происходит замедление латеральной диффузии липидов [4]. Компьютерное моделирование показывает, что дегидратация бислоя приводит к систематическому упорядочиванию цепей [5].

Степень гидратации бислоя оказывает влияние и на состояние молекул воды. Во взаимодействие с молекулами воды могут быть вовлечены эфирные, фосфатные, карбоксильные и амино- группы фосфолипидов [2]. На одну молекулу липида приходится несколько молекул «связанной» воды, которые образуют гидратную оболочку, причем их количество зависит от типа липида и фазового состояния бислоя [2, 6-8]. Состояние воды в системе связано с ее молекулярной подвижностью. Сетка водородных связей объемной воды разрушается вблизи полярных голов [9]. Молекулы «связанной» воды ограничены во вращательной подвижности и имеют времена протонной ЯМР релаксации такие же, как у головных групп липидов [8]. «Связанная» вода характеризуется не только пониженной подвижностью, но и анизотропией вращения, свойственной липидным молекулам. Времена корреляции вращательного движения воды у поверхности липида имеют средние значения между временами корреляции молекул воды «связанной» с молекулами липида и свободной воды [9].

Поскольку система анизотропна, коэффициент диффузии воды зависит от угла к нормали θ , проведенной к бислоям:

$$D = D_L \cdot \sin^2 \theta + D_{\perp} \cdot \cos^2 \theta$$

где D_L и D_{\perp} – составляющие коэффициента диффузии вдоль и поперек бислоев, соответственно [10]. Зависимость D_L от θ была исследована методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля Вассалом [11] и Вестербю с соавторами [12]. При этом было установлено, что D_L примерно на порядок меньше, чем в объеме при тех же условиях, что объяснялось обменом «квазисвободной» воды со «связанной» водой. Коэффициент диффузии воды монотонно увеличивался при увеличении гидратации в соответствии с увеличением доли «квазисвободной» воды [11].

Тот факт, что бислоем проницаем для воды, означает, что часть молекул воды также присутствует в гидрофобной части бислоя. Свойства молекул внутрибислоевой воды обсуждаются в работах: [13-19]. Прохождение малых молекул через липидные бислои – явление, которое не полностью понято, но которое имеет большое значение для понимания проницаемости биологических мембран. В прошлом коэффициенты проницаемости липидного бислоя рассчитывались из теории растворение-диффузия [20]. Этот подход рассматривает мембрану как тонкую статическую гидрофобную пластину, погруженную в водное окружение. Для пересечения мембраны частица должна раствориться в гидрофобной области, диффундировать через нее и выйти во вторую водную фазу. Коэффициент проницаемости может быть вычислен, если известны толщина мембраны, коэффициенты диффузии и распределения.

Альтернативный механизм предполагает, что проникновение через мембрану происходит через временные дефекты, производимые температурными флуктуациями. Образование свободных объемов, способные содержать молекулы воды в углеводородной области липидного бислоя связано с дефекты упаковки жирнокислотных цепей [14].

Для измерения диффузии воды через биологические мембраны использовались различные методики, например перенос радиоактивных молекул, осмотическое набухание везикул и другие [21]. В последние годы для этих целей используется метод ЯМР, который позволяет получить данные о диффузии молекул при минимальном возмущении системы, в условиях близких к термодинамическому равновесию. Оценочные измерения коэффициента диффузии воды D_T поперек стопки макроскопически ориентированных бислоев димиристоилфосфатодилхолина были проведены с помощью метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля [12] и показали, что по D_T порядку величины составляет $\sim 10^{-14}$ м²/с, то есть на несколько порядков меньше коэффициента диффузии воды вдоль бислоев и значительно меньше коэффициента латеральной диффузии липидов при тех же условиях. В работах [22, 23] было показано, что диффузия воды представляет собой суперпозицию двух компонент: одна из компонент относится к диффузии воды поперек системы параллельных бислоев (транsbислоиная диффузия), а другая – к

диффузии воды в «дефектах бислоев». «Дефекты» представляют собой места разрыва плоских мультибислоев заполненные водой по подвижности близкой к «квазисвободной» воде [23]. Влияние гидратации на диффузию воды поперек бислоев не изучалось, между тем оно может быть полезным для понимания состояния воды в мембране и механизма пассивной диффузии в биологических мембранах. Дополнительную информацию о механизме диффузии через бислои можно получить при изучении температурной зависимости коэффициента диффузии.

Экспериментальная часть

Был использован 1,2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), полученный из “Avanti” (Alabaster, AL, США). Для получения макроскопически ориентированных бислоев липид растворяли в смесевом растворителе, состоящем из 20% метанола и 80% пропанола при концентрации 15 мг/мл. Затем по 25 мкл раствора наносили на каждую из 40-60 стеклянных пластинок (5x14 мм²). Растворитель испаряли при атмосферном давлении, а затем при вакууммировании. Стеклянные пластинки были сложены стопкой и помещены во влажную атмосферу для гидратации. После завершения гидратации из паров вода (MQ, pH ~6,5) добавлялась через фильтровальную бумагу с торца стопки пластинок. Перед измерениями образцы герметизировались. Для проверки качества ориентации бислоев использовались скрещенные поляроиды. Более детально технология приготовления и проверки качества ориентации макроскопически ориентированных бислоев описана в литературе [24].

Измерения самодиффузии проводились на ЯМР - диффузомере с частотой 60 МГц на протонах, с максимальным импульсным градиентом $g_{max}=30$ Тл/м, а спектры ¹H ЯМР получали на Varian/Chemagnetic CMX спектрометре с частотой 100 МГц. Для измерения самодиффузии использовалась последовательность «стимулированного эхо». Регистрировались диффузионные затухания $A(k)$, где в качестве $A(k)$ использовалась как амплитуда эхо, так и интегральные значения спектров, $k=\gamma^2\delta^2g^2t_d$, γ – гиромагнитное отношение протона, δ – длительность импульсного градиента, g – амплитуда импульсного градиента, $t_d = (\Delta-\delta/3)$ – время диффузии, Δ – расстояние между вторым и третьим радиочастотными импульсами. Сканировали значения g при фиксированных δ и t_d (или δ при фиксированных g и t_d). При этом $A(k)$ в случае однокомпонентной объемной жидкости следующим образом зависит от параметров эксперимента:

$$A(g) = A(0) \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D), \quad (1)$$

где $A(0)$ – значение $A(k)$ в отсутствии импульсного градиента, D – измеряемый коэффициент самодиффузии. Время диффузии изменялось от 7 до 512 мс. Во всех экспериментах постоянное магнитное поле и импульсный градиент магнитного поля имели одно направление. Для измерения трансбислоиной диффузии воды образцы ориентировали таким образом, чтобы нормаль к бислоям была направлена вдоль импульсного градиента поля. В этом случае сигнал от липидов не наблюдается и в спектре ЯМР протонов присутствует только сигнал от воды [23, 25]. Следует отметить, что при диффузии молекул в неоднородной среде, содержащей ограничения, например полупроницаемые липидные бислои, измеряемый (или «кажущийся») коэффициент диффузии меньше молекулярного (истинного) коэффициента диффузии и может быть зависящим от времени измерения [26]. Он определяется из наклона диффузионного затухания спинового эхо по формуле:

$$D_{app} = -\frac{1}{\gamma^2} \frac{\partial A(\delta, g, t_d)}{\partial (\delta^2 g^2 t_d)}$$

и характеризует среднеквадратичное смещение в неоднородной среде. Относительная ошибка при определении коэффициентов самодиффузии - менее 10%.

Результаты и обсуждение

Угловая зависимость формы спектра ^1H ЯМР

Спектры ^1H ЯМР для ориентированных бислоев с концентрацией воды в системе от 4,7 до около 50 вес.% получали путем Фурье-преобразования сигнала спинового эхо. Тонкая пленка липида при температуре около 20°C в атмосфере насыщенных паров воды гидратируется самопроизвольно до содержания воды около 23 вес.%. Таким образом, значение $\chi_{\text{eq}} = 23$ вес.% воды для бислоев ДОФХ можно рассматривать как близкое к равновесной степени гидратации при данной температуре. Близкие значения для бислоев ДОФХ получали и в более ранних работах [25, 27]. Сама процедура приготовления ориентированных бислоев предполагает, что жидкокристаллическая фаза липидов образуется в процессе гидратации сухой пленки липида [24], поэтому гидратация из насыщенных паров до равновесного значения является обязательным этапом приготовления образца. Более низкое содержание воды в бислоях может быть получено путем последующего частичного высушивания образца, а более высокое – путем добавления жидкой воды. Образцы с содержанием воды меньше χ_{eq} , использованные в данном исследовании, имели разную предысторию: часть из них высушивалась от исходной концентрации χ_{eq} , другая часть высушивалась от более высокой концентрации воды, то есть после того, когда к образцу, гидратированному из паров до χ_{eq} , добавлялась вода.

Измерения показали, что между угловыми зависимостями формы спектра ^1H ЯМР, полученными для образцов со степенью χ_{eq} и меньше, с одной стороны, и для образцов с более высокой степенью гидратации, с другой стороны, наблюдается качественное различие, причем это различие не зависит от пути, по которому производится достижение окончательной степени гидратации. На Рис.1а и б показаны типичные угловые зависимости спектров ^1H ЯМР для образцов с содержанием воды ниже и выше χ_{eq} : 22,4 и 41 вес.%. На обоих рисунках при ориентации нормали к бислоям под «магическим углом» к направлению постоянного магнитного поля ($54,7^\circ$) наблюдаются уширенные пики, соответствующие протонам холиновых групп (около 3,1 мд), и метиленовых и метильных групп углеводородных цепей (1,1 и 0,9 мд). Пик от протонов воды (около 4,6 мд) также уширен, причем в большей степени для образца с содержанием воды 41 вес.%. При изменении ориентации образца в интервале углов менее 7° происходит исчезновение пиков от липидов вследствие неусреднения молекулярным движением дипольного взаимодействия протонов и уменьшения их времен поперечной релаксации ЯМР до значений порядка 100 мкс [10]. Амплитуда пика от протонов воды изменяется вместе с амплитудой сигналов от липидов. Для образца с содержанием воды 22,4 вес.% сигнал от воды исчезает при отклонении угла от «магического» на около 30° , а для образца с 41 вес.% воды сигнал от воды наблюдается при любых ориентациях образца. Пик от протонов воды смещается в область слабых полей.

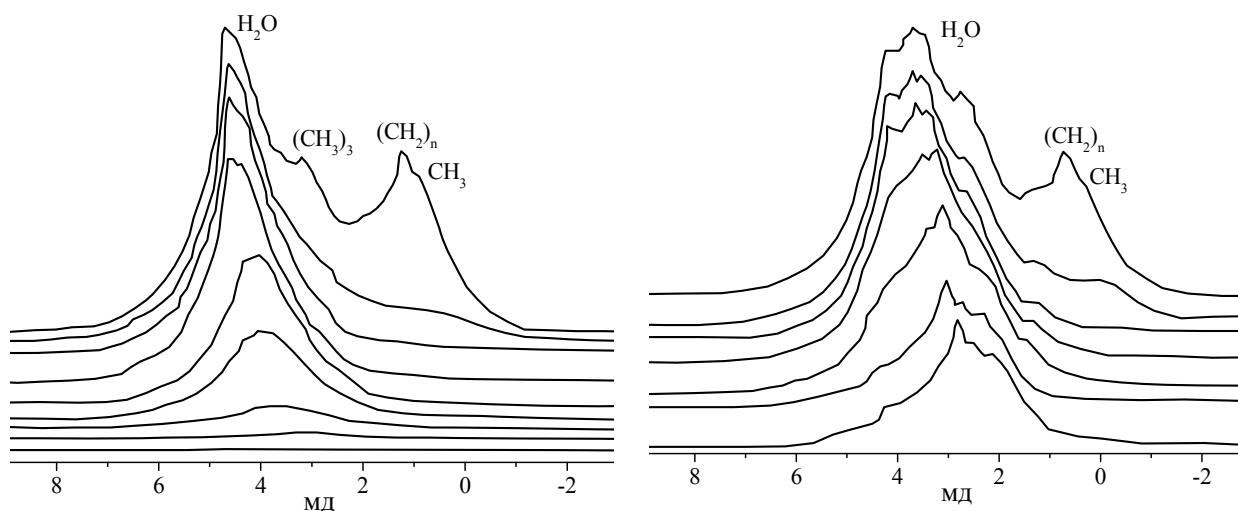


Рис.1. Зависимость формы спектра ^1H ЯМР для ориентированных бислоев ДОФХ при содержании воды а) 22,4 вес.% при углах ориентации относительно магического угла ($54,7^\circ$) сверху вниз: 0; 1,8; 3,6; 7,2; 11; 14; 22; 29 и 54° ; б) 41 вес.% при углах ориентации относительно магического угла сверху вниз: 0; 1,8; 3,6; 7,2; 11; 14; 29 и 58° . Использовалась последовательность спинового эхо, интервал между радиочастотными импульсами $\tau = 5$ мс, а спектры получались путем Фурье-преобразования эхо. Спектры сдвинуты по вертикали для удобства.

Диффузия воды через систему ориентированных бислоев

Типичные диффузионные затухания стимулированного спинового эхо для воды в направлении нормали к бислоям ДОФХ показаны на Рис.2. Все кривые получены для системы, которая первоначально гидратировалась из паров до $\chi_{\text{eq}} = 23$ вес.% (при таких концентрациях спиновое эхо при углах отличных от «магического угла» не наблюдалось). Затем вода добавлялась до концентрации 50 вес % двумя способами: 1) непосредственно из пипетки; 2) через фильтровальную бумагу; измерения производились в течение не более чем двух часов после добавления воды. При первом способе приготовления ДЗ имело вид, показанный кривой 3, а при втором способе - вид кривой 2. После того, как каждый из образцов, приготовленный с введением воды либо непосредственно через пипетку, либо через фильтровальную бумагу, выдерживался в запаянном состоянии при комнатной температуре в течение 1-2 суток, ДЗ имело вид представленный кривой 1; этот вид в последующем не изменялся. Очевидно, что введение воды приводило к механическому возмущению бислоев, а в дальнейшем происходила эволюция системы к равновесию. Коэффициент латеральной диффузии ДОФХ, измеряемый методом ЯМР ИГМП, при гидратации выше 35 вес % не зависит от условий приготовления [4], однако диффузия воды в направлении нормали к бислоям зависит от гидратации (Рис.3). Анализ показывает, что, несмотря на различие формы ДЗ, оно во всех случаях может быть представлено в виде суммы двух компонент, как это описывалось ранее в работах [22, 23]. Используя зависимость ДЗ от времени диффузии и данные микроскопии было показано, что компонента с значением D меньше $\sim 10^{-12}$ м²/с относится к трансбислойной диффузии воды (коэффициент трансбислойной диффузии D_T), а компонента с большими $D \sim 10^{-10}$ - 10^{-11} м²/с - к диффузии воды через дефекты бислоев. Коэффициент трансбислойной диффузии воды определяется проницаемостью бислоя, которая, в свою очередь, зависит от структуры молекул липида, фазового состояния системы (гель или ЖК), присутствия холестерина или других молекул влияющих на упорядоченность углеводородных цепей, и температуры [23, 28]. Следовало бы ожидать, что в идентичных условиях D_T , измеренные с помощью метода ЯМР ИГМП, должны воспроизводиться и служить характеристиками бислоя, также как коэффициенты латеральной диффузии липидов в бислоях. Отметим, что

все диффузионные затухания получаются при условиях, когда степень гидратации больше χ_{eq} . При этом форма спектра не позволяет судить о каком-либо различии в состоянии воды (Рис.1б), а из данных измерения диффузии виден сигнал от двух состояний воды, различающихся кажущимися коэффициентами диффузии (Рис.2,3).

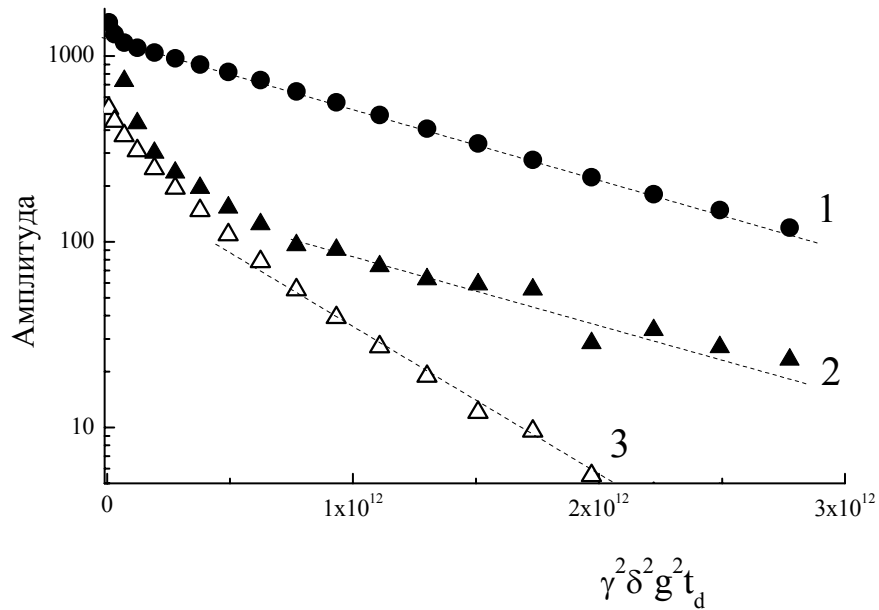


Рис.2. Форма диффузионного затухания воды в направлении поперек бислоев приготовленных при дополнительном введении воды до 50 вес.% из пипетки через фильтровальную бумагу (кривая 2) и непосредственно (кривая 3). Форма диффузионного затухания после достижения образцом равновесия в течение 24 часов при температуре 20°C. Штриховые линии показывают компоненты, соответствующие «медленной» компоненте ДЗ. T=25°C.

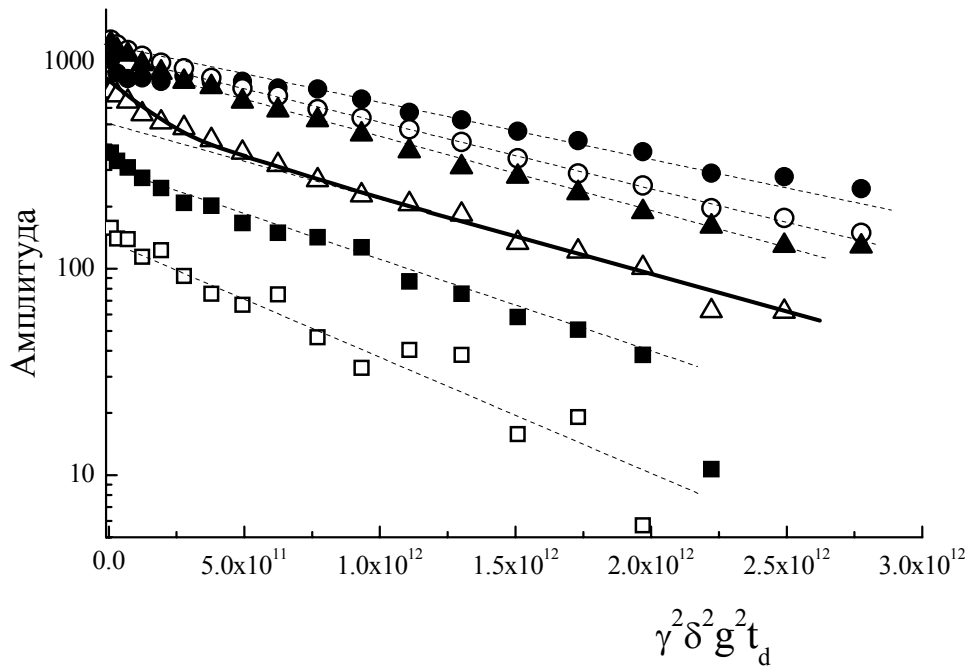


Рис.3. Диффузионные затухания воды поперек бислоев ДОФХ в интервале концентраций воды 52-23 вес.% сверху вниз по мере уменьшения концентрации. Штриховые линии показывают компоненты, соответствующие «медленной» компоненте ДЗ. Сплошная линия – результат

моделирования с помощью соотношения (6) для концентрации воды 34 вес.%.

Сравнение кривых 2 и 3 на Рис.2 показывает, что наблюдается различие в значениях коэффициентов трансбислойной диффузии воды. Мы можем предложить следующее объяснение этих различий. Первоначальное насыщение образца водой из паров приводит к достаточно низким концентрациям воды: 23 вес.% соответствует 13 молекул воды на молекулу ДОФХ, что меньше, чем необходимо для заполнения гидратной оболочки ДОФХ [2]. При этих условиях практически вся вода в системе входит в гидратную оболочку, если и есть «квазисвободная вода, то она при временах эксперимента ЯМР ИГМП находится в состоянии «быстрого обмена» с гидратной водой. Молекулы липидов совершают анизотропное вращение, поэтому при углах отличных от «магического угла» сигнал от липидов, также как и от гидратной воды и воды обменивающейся с гидратной водой не наблюдается. При добавлении воды в бислой, во-первых, появляется «квазисвободная» вода между бислоями, по крайней мере часть которой не находится в состоянии «быстрого обмена» с гидратной водой, поэтому появляется сигнал эхо. Во-вторых, добавление воды в бислой сопровождается появлением неравновесных образований. В работе [23] были рассмотрены структуры этих образований: систему ориентированных бислоев можно рассматривать как множество сплюснутых многослойных везикул с равновесными размерами от нескольких микрон и более. Области контактов везикул представляют собой «дефекты» ориентированных бислоев. Введение воды и сопровождающее механическое воздействие приводят к уменьшению размеров везикул [23] и увеличению концентрация областей контактов («дефектов» бислоев). Более «жесткое» воздействие происходит при прямом введении воды, оно приводит к более мелким везикулам, чем введение воды через фильтровальную бумагу. Система с мелкими везикулами является неравновесной, но с течением времени она приходит в равновесие, при этом число «дефектов» уменьшается, а размеры «сплюснутых мультислойных везикул» возрастают. В течение 1-2 суток система, как следует из наблюдения за кинетикой процесса, достигает равновесия.

Если сравнить ДЗ, полученное при более «мягком» способе введения воды (при использовании фильтровальной бумаги, кр.2), и ДЗ после достижения равновесия (кр.1), видно, что изменяется соотношение между компонентами, соответствующими «дефектам» и трансбислойной диффузии, а измеренные коэффициенты трансбислойной диффузии (штриховые линии) одинаковы. Для случая прямого введения воды через пипетку (кр.3), измеренный коэффициент трансбислойной диффузии больше, чем в равновесии (кр.1). Возможное объяснение – эффекты обмена между молекулами воды в «дефектах бислоев» с водой между бислоями. Если размеры «сплюснутых мультислойных везикул» в направлении вдоль слоев достаточно малы, сравнимы с перемещением молекул воды за время ~500мс (время формирования спинового эхо в эксперименте ЯМР ИГМП), то усреднение может привести к значениям коэффициентов диффузии промежуточным между D_T и коэффициентам диффузии в «дефектах». Отметим тот факт, что в случае более «жесткого» воздействия происходит уменьшение вклада (населенности компоненты) от диффузии воды через бислои (Рис.2, кривая 3).

Зависимость трансбислойной диффузии от гидратации

Результаты исследований диффузии воды в направлении перпендикулярно бислоям приведены на Рис.3. Исследования начинались при содержании воды 52 вес.% после установления равновесия, проводились последовательно в течение нескольких суток по мере испарения воды из образца и заканчивались при содержании воды около 23 вес.%, в условиях когда сигнал от воды становится слишком мал для надежного измерения самодиффузии (Рис.1а).

Из Рисунка 3 видно, что уменьшение содержания воды в системе приводит к уменьшению амплитуды сигнала для воды (начальные точки диффузионных затуханий). Другая особенность - независимо от степени гидратации ДЗ сохраняет двухкомпонентную

форму. Штриховые линии с наклоном соответствующим коэффициентам трансбислойной диффузии показаны на рисунке вблизи ДЗ для разных χ . Видно, что наклон линий, а, следовательно, и D_T несколько увеличивается при уменьшении степени гидратации. Зависимости D_T от содержания воды приведены на Рис.4. Из этого рисунка видно, что D_T монотонно возрастает от $0,6 \cdot 10^{-12}$ до $1,2 \cdot 10^{-12}$ м²/с при уменьшении χ . На первый взгляд такой результат представляется неожиданным. Во-первых, известно, что понижение гидратации приводит к повышению упорядоченности липидного бислоя [5], что обычно ведет к уменьшению проницаемости [22, 23, 28]. Во-вторых, обычно [12, 23] для описания диффузии воды через систему взаимно параллельных ориентированных бислоев липидов, разделенных прослойками воды, используется модель Таннера [29] в которой выражение для трансбислойной диффузии имеет вид:

$$D_T = \frac{k \cdot l}{\frac{k \cdot l}{D_{sr}} + 1}, \quad (2)$$

где k – коэффициент проницаемости, l – расстояние между мембранами, D_{sr} – коэффициент самодиффузии, соответствующий среднеквадратичным смещениям молекул на расстояния меньше, чем расстояние между мембранами. Из этого соотношения следует, что при уменьшении l , что обычно происходит при дегидратации, D_T должно понижаться.

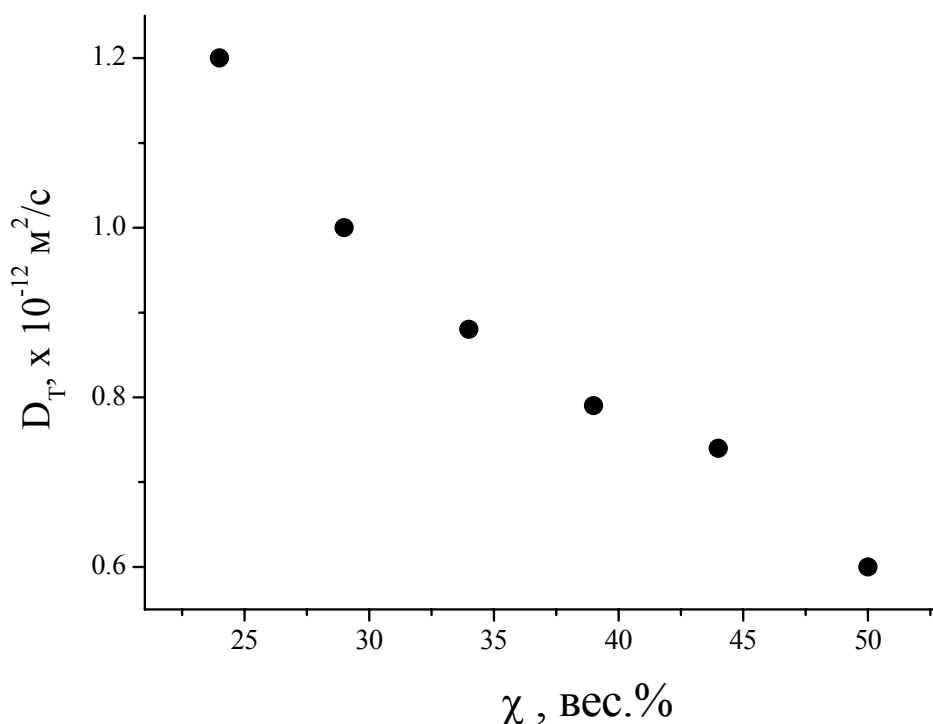


Рис.4. Зависимость коэффициента трансбислойной диффузии воды от концентрации воды в системе плоских ориентированных бислоев ДОФХ. $T=25^\circ\text{C}$.

Возможная причина расхождения эксперимента с предсказаниями модели Таннера – чрезмерная упрощенность модели где каждый бислой представляет собой тонкую мембрану, которая характеризуется единственным параметром – проницаемостью. В действительности толщина водного слоя между бислоями и толщина бислоя сравнимы [30]. Попробуем в модели Таннера учесть конечную толщину бислоя и присутствие в его гидрофобной части воды. «Квазисвободная» вода между бислоями липидов имеет

свойства близкие к свободной воде [30], поэтому при дегидратации образца она испаряется в первую очередь. Поскольку при дегидратации изменяется только масса воды m_w , то для образца с достаточно высокой степенью гидратации толщина водной прослойки должна быть пропорциональна этой массе. Так как массовая доля воды:

$$\chi = \frac{m_w}{m_w + m_l},$$

где m_l - масса липида, то

$$m_w = \frac{\chi}{1 - \chi} m_l.$$

При содержании воды $\chi=0,5$ толщина водной прослойки $l_0=6,4$ нм [30]. Выберем

$$l = l_0 \frac{\chi}{1 - \chi}$$

и подставим в (2). Тогда

$$D_T = \frac{kl_0\chi}{\frac{kl_0\chi}{D_{sr}} + 1 - \chi}.$$

Отсюда:

$$\frac{1}{D_T} = \frac{1}{D_{sr}} - \frac{1}{kl_0} + \frac{1}{kl_0\chi}. \quad (3)$$

В соответствии с выражением (3), величина обратная D_T должна линейно возрастать при увеличении $1/\chi$. Оценки показывают, что при изменении гидратации бислоя от 52% до 23% можно ожидать более чем двухкратное уменьшение коэффициента диффузии.

Рассмотрим другую возможность, которая гипотетически могла бы привести к зависимости D_T от степени гидратации. До сих пор при анализе ДЗ использовалась формула (1) пригодная для объемной жидкости. В действительности, так как мы применяем стеклянные пластины в качестве подложки при формировании ориентированных липидных бислоев, которые расположены параллельно относительно друг друга и образуют дополнительно набор непроницаемых препятствий, более корректно вместо выражения (1) для каждой диффузионной компоненты использовать выражение для диффузии между плоскопараллельными ограничениями [31, 32]:

$$\frac{A(g)}{A(0)} = \frac{2(1 - \text{Cos}(\gamma\delta ga))}{(\gamma\delta ga)^2} + \quad (4)$$

$$4(\gamma\delta ga)^2 \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{n^2\pi^2 t_d D_s}{a^2}\right) \times \frac{1 - (-1)^n \text{Cos}(\gamma\delta ga)}{\left[(\gamma\delta ga)^2 - n^2\pi^2\right]^2},$$

где a - расстояние между ограничениями. В условиях $D_s t_d \gg a^2$ когда среднеквадратичные смещения молекул оказываются много больше чем расстояние между пластинами зависимость от коэффициента диффузии пропадает и в формуле (4) сохраняется только первый член. При наличии двух компонент (в нашем случае это вода, с более низким коэффициентом диффузии, проходящая через набор полупроницаемых мембран, и вода, расположенная в областях “дефектов”) ДЗ может иметь вид суммы (4) с различающимися коэффициентами самодиффузии:

$$\frac{A(g)}{A(0)} = P \left[\frac{2(1 - \text{Cos}(\gamma\delta ga))}{(\gamma\delta ga)^2} + 4(\gamma\delta ga)^2 \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 t_d D_T}{a^2}\right) \times \frac{1 - (-1)^n \text{Cos}(\gamma\delta ga)}{[(\gamma\delta ga)^2 - n^2 \pi^2]^2} \right] + (1-P) \left[\frac{2(1 - \text{Cos}(\gamma\delta ga))}{(\gamma\delta ga)^2} + 4(\gamma\delta ga)^2 \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 t_d D_s}{a^2}\right) \times \frac{1 - (-1)^n \text{Cos}(\gamma\delta ga)}{[(\gamma\delta ga)^2 - n^2 \pi^2]^2} \right] \quad (5)$$

где P – населенность сигнала, связанная с трансбислошной диффузией, D_s – коэффициент самодиффузии, измеряемый для областей «дефектов». Оценки показывают, что при условиях эксперимента, времени диффузии около 500 мс и расстоянии между пластинами около 20 мкм, форма ДЗ не зависит от величины коэффициента диффузии если он равен или превышает $1 \cdot 10^{-10}$ м²/с. Это условие не выполняется для трансбислошной диффузии, но выполняется для воды в дефектах бислоев, поэтому формула (5) упрощается:

$$\frac{A(g)}{A(0)} = P \left[\frac{2(1 - \text{Cos}(\gamma\delta ga))}{(\gamma\delta ga)^2} + 4(\gamma\delta ga)^2 \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 t_d D_T}{a^2}\right) \times \frac{1 - (-1)^n \text{Cos}(\gamma\delta ga)}{[(\gamma\delta ga)^2 - n^2 \pi^2]^2} \right] + (1-P) \left[\frac{2(1 - \text{Cos}(\gamma\delta ga))}{(\gamma\delta ga)^2} \right] \quad (6)$$

На Рис. 3 показана аппроксимация ДЗ с помощью формулы (6). Видно, что соотношение хорошо описывает экспериментальное диффузионное затухание. При сушке и уменьшении толщины водных прослоек можно было бы ожидать уменьшения расстояния a между стеклянными пластинками, что в свою очередь могло повлиять на ДЗ. По результатам моделирования ДЗ с помощью выражения (6) оказалось, что при сушке изменение расстояния a между стеклянными пластинами, практически не оказывает влияние на измеряемый коэффициент диффузии. Обе методики расчета, базирующиеся на формулах (2) и (4), дают близкие результаты. Расхождения не превышают точности измерений. Таким образом, присутствие непроницаемой подложки не оказывает влияния на результат измерения диффузии. Единственной причиной наблюдаемых эффектов гидратации на диффузию воды является рассмотренная выше – присутствие воды в гидрофобной части бислоя конечной толщины.

Паула с соавторами [13] показали, что проницаемость воды через липидный бислой может быть описана с помощью модели «растворения-диффузии». Согласно этой модели гидрофобная часть бислоя имеет очень низкую концентрацию растворенной нем воды. В качестве оценки для растворимости воды в гидрофобной части бислоя можно использовать растворимость воды в *n*-гексадекане (коэффициент распределения $P_w = 0,42 \cdot 10^{-4}$ [17]). Коэффициент проницаемости через бислой рассчитывается, как $k = \frac{D_{wl} \cdot P_w}{d}$, где D_{wl} – коэффициент диффузии воды в бислое, d – толщина бислоя.

Вследствие быстрого молекулярного обмена молекул воды между гидрофобной и гидрофильной частями бислоя средний измеряемый коэффициент диффузии воды можно найти, как:

$$D_{\perp} = \frac{V_w n \cdot D_w + V_l \cdot n_l \cdot D_{wl}}{V_w n + V_l \cdot n_l} = \frac{D_w + \frac{d}{l} \cdot P_w \cdot D_{wl}}{1 + \frac{d}{l} P_w},$$

где V_w и V_l объемы водной и липидной фазы, n и n_l концентрация воды в этих фазах, D_w – «кажущийся» коэффициент диффузии поперек бислоев в водной фазе, ограниченной малопроницаемыми липидными слоями. Попробуем выразить его через формулу Таннера:

$D_w = kl / (1 + kl / D_0)$. Независимо от того понимаем ли мы под D_0 коэффициент диффузии свободной воды или $D_{||}$, величина kl / D_0 оказывается пренебрежимо малой по сравнению с единицей ($k \approx 10^{-4}$ м/с, $l \approx 10^{-9}$ м и $D_0 \approx 10^{-10}$ м²/с). Тогда $D_w = kl$. С другой стороны, проницаемость k может быть выражена через характеристики липидного слоя. Согласно модели «растворение – диффузия» $kd = P_w D_{wl}$ [20], если не пренебрегать малыми величинами то получим точную, но не очень удобную для анализа формулу:

$$D_{\perp} = \left(\frac{klD_0}{D_0 + kl} + \frac{d^2}{l} \cdot k \right) / \left(1 + \frac{d}{l} \cdot P_w \right). \quad (7)$$

Пренебрегая $\frac{d}{l} P_w$ найдем, что:

$$D_{\perp} = kl + \frac{d^2}{l} \cdot k. \quad (8)$$

Считая, что толщина водного слоя зависит от степени гидратации как $l = l_0 \frac{\chi}{1 - \chi}$, где l_0 -

толщина водного слоя при 50% содержании воды после преобразований получим, что зависимость коэффициента диффузии от степени гидратации w должна описываться формулой:

$$D_{\perp} = A / \left(\frac{1}{\chi} - 1 \right) + B / \chi - B, \quad (9)$$

где $A = kl_0$ и $B = kd^2 / l_0$. Действительно такая зависимость хорошо описывает экспериментальные данные (Рис.5) и позволяет найти проницаемость бислоя. По нашим оценкам $kl_0 = 0,34 \cdot 10^{-12}$ м²/с. Тогда проницаемость бислоя $k = 0,5 \cdot 10^{-4}$ м/с. Привлекая литературные данные можно сделать и другие оценки. Если взять коэффициент распределения $P_w = 1,3 \cdot 10^{-3}$ [21] (таким же, как и в оливковом масле) получим для воды в липидной фазе $D_{wl} = 2,6 \cdot 10^{-10}$ м²/с. Наоборот, если D воды в бислое в 5 раз меньше, чем в объемной воде, как получается в ходе моделирования в [33], коэффициент распределения молекул воды между липидной и водной фазами $7 \cdot 10^{-4}$. В обоих случаях «время жизни» молекул воды в липидной фазе очень мало. Если оценить это время, как

$$\tau = \frac{d^2}{2D_{wl}},$$

то получим ~ 80 нс и ~ 40 нс, соответственно. Существуют работы, в которых коэффициент диффузии в гидрофобной части бислоя даже выше, чем в объемной воде вследствие меньшего числа водородных связей приходящихся на молекулу воды [19]. Тогда «время жизни» окажется еще меньше. Поскольку, в силу специфики метода ЯМР с ИГМП время диффузии довольно велико (больше миллисекунды), реализуются условия быстрого обмена и диффузионное затухание не «чувствует» присутствие воды в гидрофобной области липида: никакой соответствующей компоненты ДЗ в итоге не появляется. Учитывая еще и малое содержание воды в липидном слое (доли процента) можно объяснить и трудность обнаружения сигнала от таких молекул в методе ЯМР высокого разрешения. Тем не менее, эта «невидимая» вода вследствие относительно высокой подвижности на наш взгляд и приводит к неожиданному увеличению кажущегося коэффициента диффузии воды поперек системы ориентированных бислоев.

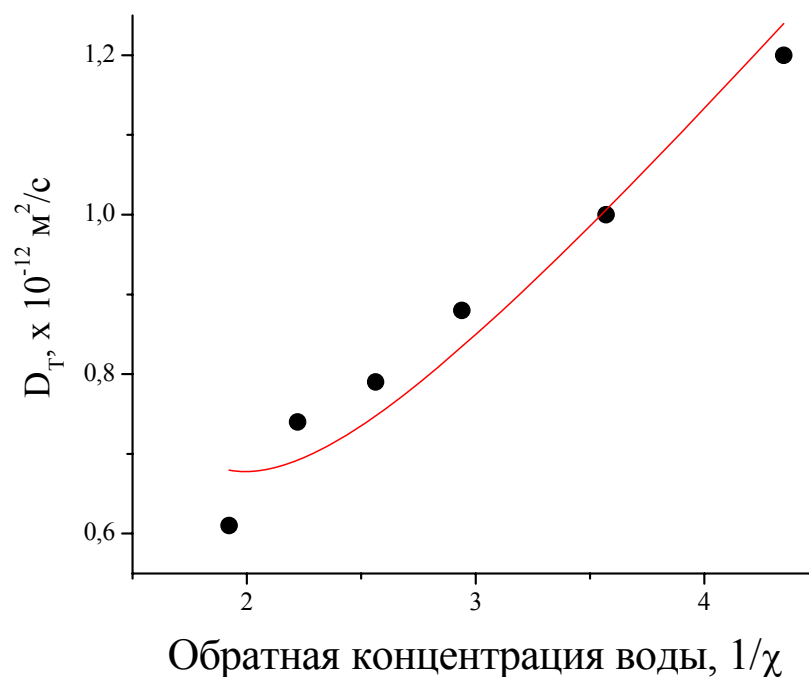


Рис.5. Зависимость коэффициента диффузии воды через систему бислоев ДОФХ от величины обратной доле воды в системе (точки). Сплошная линия – расчет согласно соотношению (9). $T=25^\circ\text{C}$.

Температурная зависимость трансбислойной диффузии воды.

На Рис. 6. представлены диффузионные затухания стимулированного спинового эхо для воды, полученные при ориентации нормали к бислоям вдоль направления градиента магнитного поля в интервале температур от 20°C до 60°C . Штриховые линии показывают участки ДЗ, соответствующие трансбислойной диффузии. Видно, что эти участки хорошо описываются экспоненциальной зависимостью вида (1) и, следовательно, могут быть охарактеризованы единственным коэффициентом диффузии при каждой температуре. Температурная зависимость коэффициентов трансбислойной диффузии D_T показана на Рис. 7 в Аррениусовых координатах. Здесь же для сравнения приведены температурные зависимости коэффициентов диффузии объемной воды (1) и коэффициентов латеральной диффузии ДОФХ. При каждой температуре D_T на 4 десятичных порядка меньше, чем в объемной воде и на 1 порядок меньше, чем коэффициент латеральной диффузии липидов. Температурная зависимость имеет вид близкий к Аррениусову. Кажущиеся энергии активации E_D были оценены из наклонов температурных зависимостей коэффициентов самодиффузии с использованием соотношения:

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right) \quad (10)$$

Проведенные оценки показывают, что E_D для всех представленных процессов, характеризующих трансляционную подвижность в бислоях ДОФХ, существенно различаются. E_D самодиффузии объемной воды и трансбислойной диффузии через мембраны ДОФХ составляют 18 и 41 кДж/моль, соответственно. Ясно, что механизмы диффузии воды в объеме и в анизотропной среде, образованной липидными бислоями, различны. Значение для объемной воды согласуется с литературными данными [11]. Однако для диффузии воды вдоль бислоев при гидратации близкой к насыщению характерно достаточно небольшое возрастание E_D , всего лишь до 23 кДж/моль [11]. Изменение энергии активации диффузии при прохождении молекул воды через бислои не

анализировалось, тем больший интерес представляет выяснение причины резкого возрастания E_D .

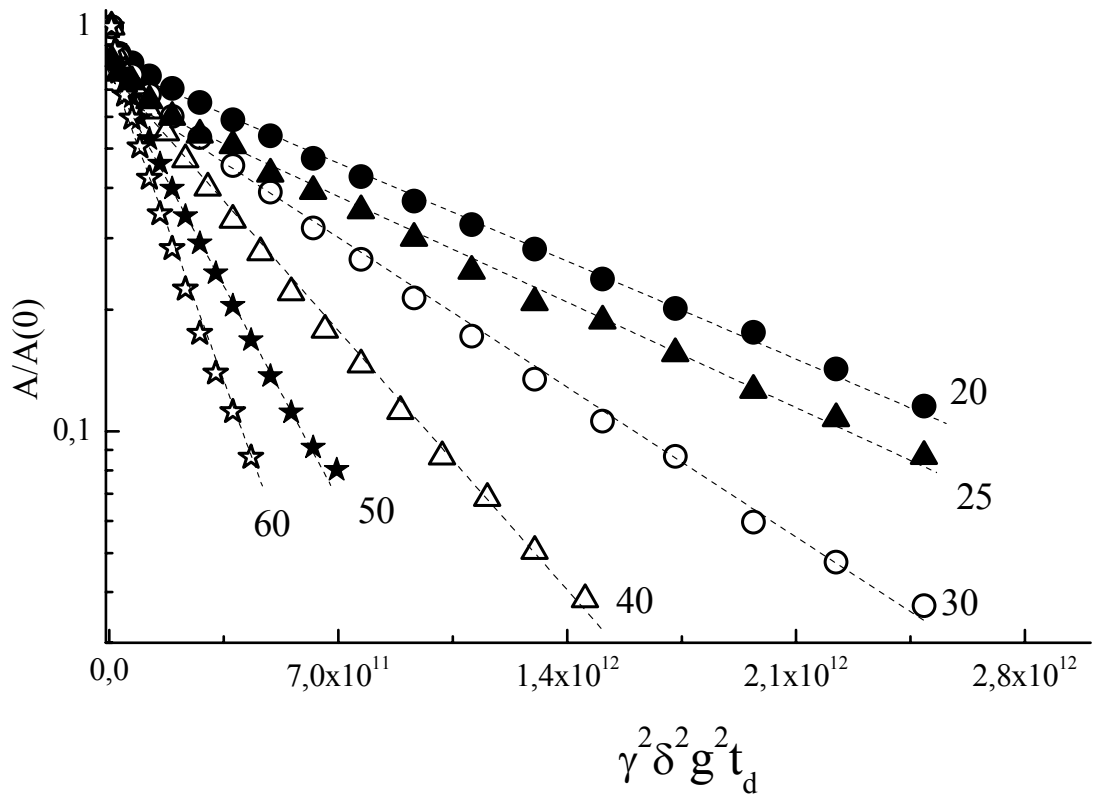


Рис.6. Диффузионные затухания воды в направлении нормали к бислоям при температурах от 20 до 60°C. Штриховые линии показывают участки ДЗ для трансбислойной диффузии воды.

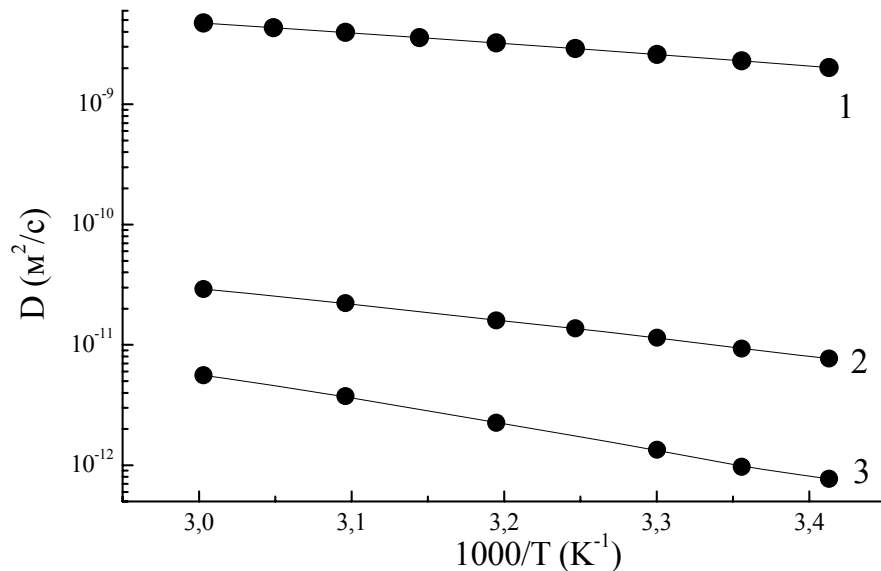


Рис.7. Температурные зависимости коэффициентов диффузии воды: в объеме (1), трансбислойной диффузии через бислои ДОФХ (3). Коэффициенты латеральной диффузии в бислоях ДОФХ при предельной гидратации (2). Энергии активации диффузии, оцененные из наклонов зависимостей, составляют 18 кДж/моль (объемная вода), 41 кДж/моль (диффузия воды через бислои) и 27 кДж/моль (латеральная диффузия липидов).

Модель динамических мембранных пор

На данный момент одним из преобладающих представлений о механизмах пассивного транспорта в липидных биомембранах является теория гидрофильных пор. Предполагается, что диффузия гидрофильных молекул и ионов через мембрану осуществляется за счет существования в липидном бислое пор (дефектов), природа которых может быть различной и до конца не ясна (флуктуации плотности липидного бислоя, «кинки», наличие механического напряжения на поверхности мембраны). «Времена жизни» таких пор, их геометрия и размеры оценены пока только при помощи методов компьютерного моделирования и не всегда эти значения совпадают в статьях различных авторов. Тем не менее, проведенные теоретические величины не противоречат существующим экспериментальным данным, в основном касающимся измерения проницаемости биомембран [13,20,11, 12, 34].

Нами анализируется диффузия воды через систему плоскопараллельных мультибислоев фосфолипида с толщиной L , в которой липидные бислои выстроены в систему из K плоско параллельных мембран, с толщиной $\{2l_k\}_{k=1\dots K}$, разделенных расстояниями $\{a_k\}_{k=1\dots K}$. (см. Рис. 8). Рассматриваемая модель является обобщенной и поэтому пригодной и для систем плоскопараллельных мембран другой природы.

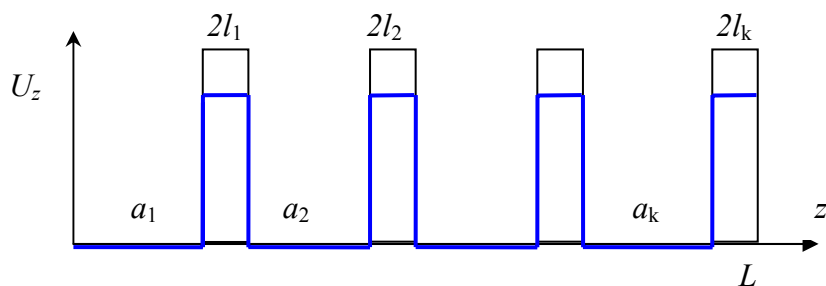


Рис.8. Слой толщины L , который содержит K плоских мембран, разделенных расстояниями $\{a_k\}_{k=1\dots K}$, и имеющих толщины $\{2l_k\}_{k=1\dots K}$. Потенциал в мембранах u , пористость κ .

Толщина L (линейный размер всей рассматриваемой системы - ориентированной модельной биомембраны) будет равна расстоянию между соседними стеклянными пластинами подложки. Заметим, что для изучаемых нами липидных бислоев величина $2l_k$ одинакова и определяется типом липидов, их фазовым состоянием, степенью гидратации и температурой [21]. Расстояние $\{a_k\}_{k=1\dots K}$ - есть толщина водной прослойки в биомембране, значение которой также не ограничено в рамках предложенной модели, а ее среднее может также определяться целым набором, как и толщина липидного бислоя.

Необходимо отметить еще два наиболее существенных параметра, характеризующих каждую мембрану в системе, в рамках данной модели. Это пористость мембраны κ и средний потенциал внутри мембраны u обусловленный возможностью взаимодействия молекулы диффузанта с молекулами мембраны.

В соответствии с представленной моделью

$$\kappa(z) = \begin{cases} 1, & z \in a_k; \\ \kappa, & z \in 2l_k; \end{cases} \quad D(z) = \begin{cases} D_0, & z \in a_k; \\ D_p, & z \in 2l_k; \end{cases} \quad u(z) = \begin{cases} 0, & z \in a_k; \\ u_k, & z \in 2l_k; \end{cases} \quad (11)$$

Проницаемость p отдельной мембраны определяется как [11, 22]:

$$P = \frac{\kappa D_p}{2l}, \quad (12)$$

Общее сопротивление системы мембран R проницаемости диффузанта определяется, как величина обратная коэффициенту проницаемости и может быть выражена как сумма сопротивлений всех частей системы [33]:

$$R = \frac{1}{P} = \int_0^L \frac{e^{\beta U(z)}}{\kappa(z) D(z)} dz. \quad (13)$$

где $\beta = 1/RT$.

Выполнив интегрирование с учетом условий заданной геометрии (см. Рис. 8) и введем средние величины: среднее сопротивление r (обратную средней проницаемости мембраны p), среднюю толщину прослойки между мембранами a , среднюю толщину мембраны $2l$:

$$r = \frac{1}{p} = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K \frac{1}{p_k} = \frac{e^{\beta U}}{\kappa D_p} 2l, \quad a = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K a_k, \quad 2l = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K 2l_k, \quad (14)$$

и среднюю пористость всей системы κ^* :

$$\kappa^* = \frac{aK + 2l\kappa e^{-\beta U} K}{L}. \quad (15)$$

Удобно ввести параметр $\nu = \kappa e^{-\beta U}$. В модели пор если можно пренебречь взаимодействием между молекулами диффузанта и мембраны он равен пористости системы. В случае модели растворение – диффузия $\nu = e^{-\beta U}$ играет роль коэффициента распределения диффузанта между веществом мембраны и жидкостью в прослойке. Проницаемость системы P согласно результату интегрирования выражения (13) подчиняется следующему уравнению:

$$\frac{1}{P} = \frac{Ka}{D_0} + \frac{K}{p}. \quad (16)$$

Рассмотрим средний коэффициент диффузии внутри системы при больших временах диффузии D_∞ . Согласно формуле (12) можно положить, что

$$P = \frac{\kappa^* D_\infty}{L}. \quad (17)$$

Подставляя (12) и (17) в формулу (16) получим выражение, связывающее коэффициент диффузии при больших временах диффузии D_∞ и при малых временах D_0 с проницаемостью мембраны p .

$$\frac{L^2}{(aK + 2l\nu K) D_\infty} = \frac{Ka}{D_0} + \frac{K}{p}. \quad (18)$$

Используя $L = aK + 2lK$ выражение (18) можно представить в виде:

$$\frac{(a + 2l)^2}{(a + 2l\nu) D_\infty} = \frac{a}{D_0} + \frac{1}{p}. \quad (19)$$

Если выразить проницаемость p через коэффициент диффузии внутри пор мембраны D_p (12), то

$$\frac{(a + 2l)^2}{(a + 2l\nu) D_\infty} = \frac{a}{D_0} + \frac{2l}{\nu D_p}. \quad (20)$$

При малой пористости мембраны, когда величиной $a\nu/D_0$ можно пренебречь формулу можно записать как:

$$\frac{(a+2l)^2}{D_\infty} = \frac{a^2}{D_0} + \frac{(2l)^2}{D_p} + \frac{a}{p} \quad (21)$$

Полученная формула позволяет связать коэффициент диффузии при больших временах диффузии D_∞ с коэффициентом диффузии в прослойке между мембранами и характеристиками самой мембраны (пористостью, толщиной и коэффициентом диффузии в порах). Формула применима и в случае модели растворение – диффузия. Тогда v является коэффициентом распределения диффузанта между веществом мембраны и окружающей жидкостью. Если пренебречь толщиной мембраны, то после деления на a формула (21) превращается в хорошо известную формулу Таннера[29]:

$$\frac{1}{D_\infty} = \frac{1}{D_0} + \frac{1}{ap}. \quad (22)$$

Анализ эксперимента при использовании модели пор

Рассмотрим теперь вопрос применимости модели пор к изучаемым системам. В работе Леонтиадоу с соавторами [35] путем молекулярно-динамического моделирования бислоя дипальмитоилфосфатидилхолина изучались процессы образования пор в липидном бислое. Моделирование показало, что поры имеют форму “песочных часов” с внутренним радиусом ~ 0.7 нм. При отсутствии градиента давления в поре содержится ~ 92 молекулы воды. Но такие поры не стабильны и живут не дольше 100 нс. Наиболее устойчивым является термодинамическое состояние при котором поры отсутствуют. Наоборот при малом напряжении (10-50 бар) поры становятся стабильными (по крайней мере их время жизни превышает 160 нс - время моделирования). При давлении, превышающем 50 бар, поры становятся нестабильными – увеличиваясь в размерах, они разрывают бислой. Поток воды через отдельную нерасширенную пору оценивается в пределах $2 \div 7 \times 10^{-13}$ см³/с (что относительно близко к величине 1.1×10^{-12} см³/с измеренной для грамицидинового канала, который имеет экстремально высокую проницаемость для воды). Коэффициент проницаемости для бислоя везикулы дипальмитоилфосфатидилхолина составляет около 10^{-4} см/с. Примерно 10^8 пор/см² или 1 пора на 10^6 молекул липидов достаточно чтобы обеспечить такую проницаемость. Правда для объяснения низкой проницаемости ионов через мембрану придется предположить что на см² приходится только 1 пора! Свободная энергия образования поры оценивается как 40 кДж/моль [35] и это, по предположению авторов, нижняя граница. Согласно нашим данным коэффициент проницаемости бислоя ДОФХ составляет 0.27×10^{-4} м/с. По аналогии с оценками для бислоев дипальмитоилфосфатидилхолина это соответствует около $0.5 \cdot 10^{10}$ пор/см² или 1 пора на 20000 молекул липида. Если массовая концентрация воды в бислое $v = 2.5 \times 10^{-4}$ (считая что в поре примерно 100 молекул воды), то используя формулу (5) получим значение для коэффициента диффузии воды в порах 10^{-10} м²/с, что весьма близко к величине коэффициента диффузии воды при движении вдоль бислоя [11, 12]. Таким образом, модель пор дает разумные оценки по содержанию воды в бислое и величине коэффициента диффузии воды в порах. Между тем, ее слабым местом остается неспособность объяснить столь большую разницу в проницаемости воды и ионов через мембрану [14]. Кроме того, совпадение нижней границы энергии образования поры 40 кДж/моль с экспериментально измеренной энергией активации поперечного КСД, составляющей 41 кДж/моль, при применении данной модели, предполагало бы очень малую величину энергетического барьера ≈ 1 кДж/моль (значительно меньше энергии активации в чистой воде) при переходе молекулы сквозь образовавшуюся пору в липидном бислое.

Анализ эксперимента при использовании модели «растворение-диффузия»

Другая модель, описывающая проницаемость молекул через биомембрану – это модель «растворение-диффузия» [20] согласно которой для прохождения через мембрану

молекула предварительно должна войти (или раствориться) в мембране. Паула с соавторами [13] показали, что эта модель может применяться для описания диффузии воды через бислои. Согласно модели гидрофобная часть бислоя имеет очень низкую концентрацию растворенной воды. В качестве оценки для растворимости воды в гидрофобной части бислоя можно использовать растворимость воды в *n*-гексадекане (коэффициент распределения $\nu=0.42 \cdot 10^{-4}$ [17]). Коэффициент проницаемости через бислой рассчитывается, как $p = \nu D_{wl} / 2l$, где D_{wl} - коэффициент диффузии воды в бислой, $2l$ - толщина бислоя. Тогда можно (ввиду их обобщенности) применить те же рассуждения и формулы (4-14), что и при анализе модели пор, только ν будет являться не пористостью, а коэффициентом распределения диффузанта. Величину U будем полагать равной ΔG - средней разности свободной энергии воды между водной и липидной фазами в гидрофобной части бислоя. Соответственно вместо КСД в порах будем использовать D_{wl} - коэффициент самодиффузии воды в липидном бислой. Поскольку при времени диффузии $t_d=500$ мс среднее квадратичное смещение молекул воды в поперечном направлении к бислоям, оцениваемое как $\sqrt{6D_{\perp}t_d}$ в наших экспериментах превышает 1.4 мкм, что соответствует преодолению более чем 100 липидных мембран. Поэтому можно считать $D_{\infty} = D_{\perp}$. Оценка с помощью соотношения (22) для бислоев ДОФХ при 25°C дает для проницаемости бислоя $p=0.5 \cdot 10^{-4}$ м/с [36, 37].

Для поперечной диффузии в рамках модели «растворение – диффузия» пренебрегая величиной a / D_0 по сравнению с $2l / \nu D_{wl}$ из соотношения (20) получим:

$$\frac{(a + 2l)^2}{(a + 2\nu)D_{\perp}} = \frac{2l}{\nu D_{wl}} = \frac{1}{p}. \quad (23)$$

Если воспользоваться формулой (23) и учесть, что температурные коэффициенты расширения для липида $\alpha_l=80 \cdot 10^{-5} \text{ K}^{-1}$ [30] и воды $\alpha_w=15 \cdot 10^{-5} \text{ K}^{-1}$ достаточно малы, чтобы ими пренебречь {их вклад около процента на фоне семикратного увеличения измеряемого КСД}, то полученное значение энергии активации должно совпадать с энергией активации коэффициента проницаемости p . Другими словами, полученное нами экспериментальное значение $E_D=41$ кДж/(моль·К) соответствует энергии активации для коэффициента проницаемости, E_p .

Тогда согласно (23) поперечный КСД будет удовлетворять формуле:

$$D_{\perp} = \nu D_{wl} \frac{\left(1 + \frac{a}{2l}\right)^2}{\nu + \frac{a}{2l}}. \quad (24)$$

Пользуясь Аррениусовой зависимостью можно записать, что

$$D_{\perp} = D_{0\perp} \exp(-E_{\perp} / RT) \text{ и } D_{wl} = D_{0l} \exp(-E_{wl} / RT). \quad (25)$$

Согласно работе [22] коэффициент распределения может быть записан как:

$$\gamma = \exp(-\Delta G / RT), \quad (26)$$

где ΔG - разность свободной энергии воды между водной и липидной фазами в гидрофобной части бислоя. Для дипальмитоилфосфатидилхолина по результатам компьютерного моделирования было получено $\Delta G=22.9$ кДж/моль. Известно экспериментальное значение $\Delta G=24.9$ для системы вода – гексадекан. Логарифмируя выражение (24) и подставив формулы (25,26) для поперечного коэффициента самодиффузии получим:

$$E_{\perp} = E_{wl} + \Delta G. \quad (27)$$

Оценки энергий активации диффузии воды внутри бислоя при использовании соотношения (27) дают $E_{wl}=18$ кДж/моль и 16 кДж/моль для бислоев при

вышеприведенных ΔG для дипальмитоилфосфатидилхолина и системы вода – гексадекан, соответственно. В статье [28] величина E_{wl} измеренная для трансбислойной диффузии воды через мембраны диолеоиллецитина также равна 18 кДж/моль. Таким образом величина энергии активации для молекул воды в бислое практически не отличается от энергии активации в объемной воде.

Полученные результаты по коэффициентам проницаемости и распределения хорошо согласуются с литературными данными. Поэтому можно считать, что применение модели растворение-диффузия в изучаемой системе вполне оправданно.

Поскольку изучаемые системы являются анизотропными, то среднеквадратичные смещения молекул воды в направлениях вдоль и поперек бислоев различаются очень сильно [11]. Диффузию воды в направлении нормали к бислоям удастся исследовать только при концентрациях воды больше χ_{eq} – соответствующей равновесной гидратации из насыщенных паров (около 23 вес.% [27]). При этом наблюдаются два коэффициента диффузии (D): компонента с меньшим D обусловлена трансбислойной диффузией воды, а компонента с большим D – диффузией в «дефектах бислоев» [23]. Тем не менее, несмотря на наличие дефектов, для продольной диффузии наблюдается только одна компонента с КСД меньшим, чем у объемной воды. Энергия активации для продольного КСД, как уже обсуждалось выше, больше чем у объемной воды но меньше энергии для трансбислойной диффузии. Возникает вопрос: каким образом существование дефектов может повлиять на величину продольного КСД и его энергии активации? Ведь при значениях времен диффузии в эксперименте ЯМР ИГМП около 500 мс среднеквадратичные смещения молекул воды вдоль бислоя составят ~ 50 мкм. Тогда можно ожидать, что обмен с водой содержащейся в трещинах и других дефектах (возможные виды искажения ориентированных липидных систем демонстрирует Рис.9.) ориентированных поперек градиента магнитного поля, вследствие стерических ограничений будет занижать продольный коэффициент диффузии по сравнению со значением для объемной воды. Сбоку у изображенных на Рис. 9 «сплюснутых» везикул липидные бислои ориентированы преимущественно поперек стеклянной подложке. Поэтому в пограничных с трещинами водных прослойках продольные смещения молекул воды будут затруднены. Если с-длина, b- ширина изображенной везикулы, то оценим долю областей с ограничениями, как

$$\theta = \frac{b^2}{2bc} = \frac{b}{2c} \text{ (считаем для простоты структуры прямоугольными).}$$

Так как расстояние между стеклами b около 20 мкм, ширина трещин порядка 1 мкм, а среднее расстояние между трещинами ~100мкм [23] то $\theta \approx 10\%$. Поэтому «дефекты» могут быть одним из факторов снижающих продольный КСД по сравнению с объемной водой. Однако возникает закономерный вопрос – почему присутствие стерических препятствий не приводит к усложнению формы ДЗ, измеренного в продольном направлении и к появлению компоненты с КСД близким к КСД в поперечном направлении? Такая ситуация возможна либо если объемная доля «дефектов» незначительна, либо при существовании благоприятных условий для быстрого обмена между водой в области дефектов и водой в области с «правильной» геометрией, когда бислои выстроены параллельно подложкам. Скорее всего, в реальных системах играют роль оба обстоятельства одновременно. Вне трещин в области чередования липидных и водных слоев для продольной диффузии, вследствие большего коэффициента диффузии и меньшего числа барьеров, возникают лучшие условия для быстрого молекулярного обмена с «дефектами», чем для поперечной самодиффузии (Рис. 9).

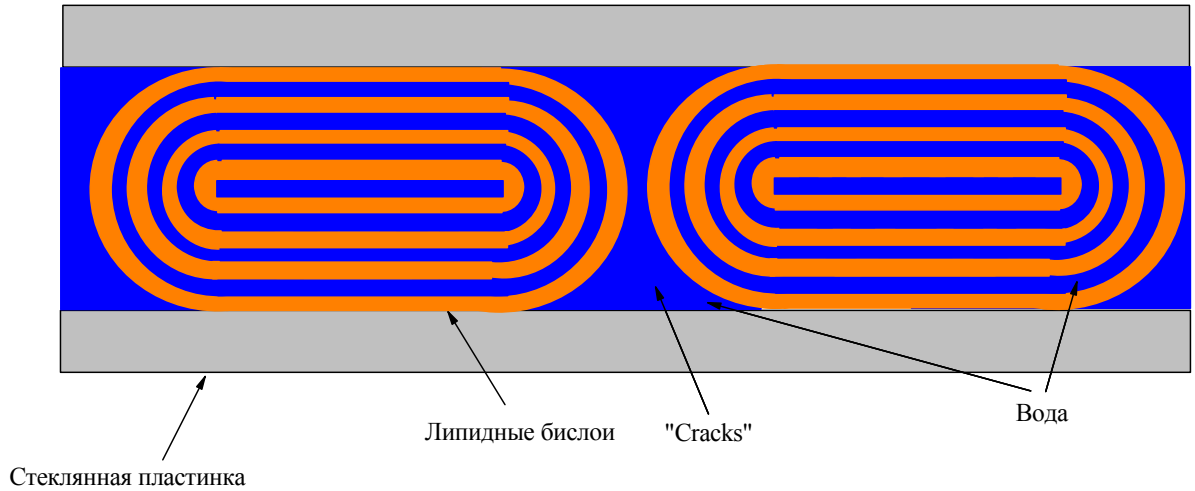


Рис.9. Модель расположения бислоев и воды в системе ориентированных на плоской подложке липидных бислоев, «сплюснутых» мультибислоиных везикул [23]. В центре рисунка показан «дефект» бислоя типа «cracks».

Поскольку рассмотренная модель системы мембран может быть применена при анализе самых разных по природе полупроницаемых перегородок возникает соблазн использовать ее и при изучении влияния дефектов на продольный КСД. Ведь как видно из Рис. 9 в пограничной с трещинами области поперек направлению диффузии располагаются липидные бислои толщины $2l$, число которых возрастает от края (поверхности стеклянной пластины) к центру. Поскольку для продольной самодиффузии геометрически эта область (в продольном направлении) мало чем отличается от центральной части рассматриваемой системы чередующихся липидных бислоев и водных прослоек, пронизываемых молекулами воды в поперечном направлении, то можно ожидать, что продольный КСД внутри указанной зоны будет близок к D_{\perp} . С другой стороны, размер водных прослоек в продольном направлении меняется в довольно широком диапазоне. Если в пограничной области он равен a (совпадает с толщиной прослоек в центре системы), то в центральной части «сплюснутых везикул» сравним с их длиной (расстоянием между дефектами), а в области дефектов это ширина «трещин». Поэтому можно ожидать, что средняя толщина водных прослоек в продольном направлении a_{\square} , определяемая так же как в (14) окажется существенно больше a . Тогда мы можем воспользоваться уравнением (20), приняв $D_{\infty} = D_{\square}$.

$$\frac{(a_{\square} + 2l)^2}{(a_{\square} + 2l\kappa)D_{\square}} = \frac{a_{\square}}{D_0} + \frac{2l}{\kappa D_{wl}}. \quad (28)$$

Последний член равенства выразим через поперечный КСД согласно формуле (16):

$$\frac{(a_{\square} + 2l)^2}{(a_{\square} + 2l\kappa)D_{\square}} = \frac{a_{\square}}{D_0} + \frac{(a + 2l)^2}{(a + 2l\kappa)D_{\perp}}. \quad (29)$$

Ввиду малости пренебрежем $2l\kappa$ и получим:

$$a_{\square} \left(\frac{1}{D_{\square}} - \frac{1}{D_0} \right) = \frac{(a + 2l)^2}{aD_{\perp}}. \quad (30)$$

Считая, что D_0 – коэффициент самодиффузии воды в объеме ($2.7 \cdot 10^{-9}$ м²/с при 30°C), D_{\perp} – измеряемый экспериментально коэффициент диффузии вдоль бислоев (8×10^{-10}

м²/с) и D_{\perp} - измеряемый экспериментально коэффициент диффузии поперек системы бислоев ($6 \cdot 10^{-13}$ м²/с), получим что среднее расстояние между мембранами $a_{\square} \approx 48$ мкм при $a \approx 2l = 6.4$ нм [30]. Однако это расстояние может оказаться заниженным из-за неучета “связанной” с молекулами липида воды. До сих пор предполагали, что только поперечные мембраны препятствуют продольному движению молекул воды, тогда как “связанная” вода в этой модели вообще не принималась во внимание. Можно предположить, что содержание связанной воды соответствует равновесной гидратации из насыщенных паров χ_{eq} (около 23 вес.% [27]). При концентрациях ниже χ_{eq} , вся вода входит в гидратные оболочки полярных «голов» липидов или находится в состоянии «быстрого обмена» с гидратной водой, что приводит к исчезновению спинового эхо в узком интервале углов, близких к «магическому углу», 54.7° [36]. При концентрациях превышающих χ_{eq} сигнал спинового эхо от воды сохраняется при всех ориентациях бислоев. Считая, что вследствие быстрого обмена между примерно равными по доле связанной и свободной водой, D_0 получится вдвое меньше чем в обычной воде, получим $a_{\square} \approx 75$ мкм. Этот результат хорошо согласуется со средним расстоянием ~ 100 мкм между дефектами [34].

До сих пор рассматривалось возможное влияние «дефектов» на продольный КСД. Попробуем теперь оценить влияние неидеальности системы на энергию активации продольного КСД. Пользуясь Аррениусовой зависимостью можно записать, что $D_{\perp} = D_{0\perp} \exp(-E_{\perp} / RT)$, $D_{\square} = D_{0\square} \exp(-E_{\square} / RT)$ и $D_0 = D_{00} \exp(-E_0 / RT)$. Ввиду отсутствия прямых экспериментальных данных будем предполагать, что энергия активации для КСД воды на очень малых временных масштабах совпадает с КСД объемной воды. Тогда выражение (30) можно преобразовать:

$$\frac{\exp(E_{\square} / RT)}{D_{0\square}} - \frac{\exp(E_0 / RT)}{D_{00}} = \frac{(a + 2l)^2 \exp(E_{\perp} / RT)}{a_{\square} a D_{0\perp}}. \quad (32)$$

Пусть $\alpha = \frac{D_{0\square}}{D_{00}}$, $\beta = \frac{(a + 2l)^2 D_{0\square}}{a_{\square} a D_{0\perp}}$. В результате получим нелинейное уравнение:

$$\exp(E_{\square} / RT) - \alpha \exp(E_0 / RT) = \beta \exp(E_{\perp} / RT). \quad (33)$$

Параметры α и β можно найти, решая уравнение (33). Графически (Рис.10) это сводится к аппроксимации графика экспоненциальной функции $\beta \exp(E_{\perp} / RT)$ (выглядит как прямая линия на Рис.10) суммой двух экспонент $\exp(E_{\square} / RT) - \alpha \exp(E_0 / RT)$ в изучаемом интервале температур. Параметр β задает положение линии по вертикали, а α -определяет наклон и кривизну второго графика. Оказалось, что $\beta = 2.1 \cdot 10^{-4}$ и $\alpha = 5.3$. Тогда используя экспериментальные данные для энергий активации D_0 [11] $D_{0\perp}$ найдем, что $a_{\square} \approx 88$ мкм. Полученная через энергии активации величина a_{\square} довольно близка к рассчитанной непосредственно из коэффициентов самодиффузии. Таким образом средняя протяженность водных прослоек в направлении вдоль стеклянных пластин a_{\square} независимо от способа расчета оказывается лишь немного меньше среднего расстояния между дефектами (100мкм). Заметим что, используя значение $\alpha = 5.3$, можно найти величину D_{00} и применяя Аррениусову зависимость $D_0 = D_{00} \exp(-E_0 / RT)$ найти величину коэффициента $D_0 = 1.45 \cdot 10^{-9}$ при 30°C . Как видим этот КСД действительно не совпадает с коэффициентом в объемной воде (примерно вдвое меньше). Поэтому приведенные ранее оценки влияния “связанной” воды на D_0 можно считать удачными. Следовательно уменьшение продольного коэффициента самодиффузии по сравнению с объемной водой вполне может быть объяснено одновременным влиянием “дефектов” и “связанной” воды.

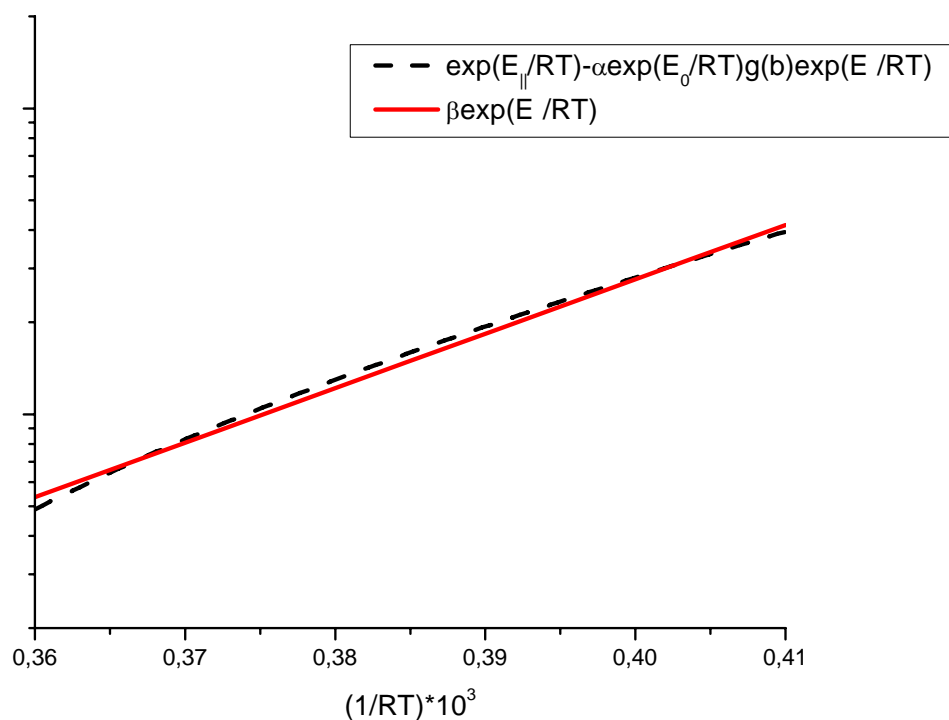


Рис.10. Результат графического решения уравнения (33) при $\alpha=5.3$ и $\beta=1/4800$

Заключение

Степень гидратации липидного бислоя определяет возможность измерения диффузии через систему бислоев методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля. Для концентраций воды, меньше и близких к значению, получаемому при гидратации из насыщенных паров, практически все молекулы воды входят в гидратные оболочки или находятся в состоянии «быстрого обмена» с гидратной водой, времена поперечной ЯМР релаксации воды при углах ориентации бислоев отличных от «магического угла» настолько малы, что спиновое эхо не формируется. При более высокой степени гидратации, которая достигается при введении жидкой воды, между бислоями образуется фракция воды, которую удастся регистрировать независимо от угла ориентации. Введение воды приводит к механическому возмущению системы, однако равновесие восстанавливается с течением времени, так что влияние предыстории исчезает. Между степенью гидратации и коэффициентом диффузии воды через систему бислоев наблюдается обратная зависимость, которая не описывается с помощью модели Таннера. Учет диффузии молекул воды в гидрофобной части бислоя и изменение доли воды между бислоями позволяют описать наблюдаемую зависимость. Оценены проницаемость бислоя, коэффициент распределения молекул между водной и липидной фазами и коэффициент диффузии воды в гидрофобной области бислоя. Используемая методика эксперимента и предложенный анализ для оценки проницаемости бислоев могут оказаться перспективными для исследования трансбислойной диффузии других малых молекул, например лекарственных средств, что может иметь важные практические приложения. Используя данные ЯМР с ИГМП по температурной зависимости КСД воды через липидные бислои удалось получить информацию о разности свободной энергии воды между водной и липидной фазами в гидрофобной части бислоя. Рассмотрены вопросы неидеальности изучаемых систем и влияния дефектов на измеряемые КСД диффузанта поперек и вдоль мембран. Приведена оценка влияния «связанной» воды на подвижность молекул воды.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РНП2.1.1.3222 и Российского Фонда Фундаментальных Исследований. Авторы благодарят профессора Й.Линдблома и доцента Г.Орадда (Университет Умео, Швеция) за предоставленную возможность измерения ^1H ЯМР спектров.

Литература

- 1 R. Koynova, M. Caffrey, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1376**, 91 (1998).
- 2 A.S. Ulrich, A. Watts, *Biophysical Journal*, **66**, 1441 (1994).
- 3 K. Hristova, S.H. White, *Biophysical Journal*, **74**, 2419 (1998).
- 4 A. Filippov, G. Oradd, G. Lindblom, *Langmuir*, **19**, 6397 (2003).
- 5 R.J. Mashl, H.L. Scott, S. Subramaniam, E. Jacobsson, *Biophysical Journal*, **81**, 3005 (2001).
- 6 C. Faure, L. Bonakdar, E.J. Dufourc, *FEBS Letters*, **405**, 263 (1997).
- 7 Z. Zhou, B.G. Sayer, D.W. Hughes, R.E. Stark, R.M. Epand, *Biophysical Journal*, **76**, 387 (1999).
- 8 F. Volke, S. Eisenblatter, J. Galle, G. Klose, *Chemistry and Physics of Lipids*, **70**, 121 (1994).
- 9 H. Bursing, S. Kundu, P. Vohringer, *Journal of Chemical Physics*, **107**, 2404 (2003).
- 10 G. Oradd, G. Lindblom, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **42**, 123 (2004).
- 11 S.R. Wassall, *Biophysical Journal*, **71**, 2724 (1996).
- 12 P. Wasterby, G. Oradd, G. Lindblom, *Journal of Magnetic Resonance*, **157**, 156 (2002).
- 13 S. Paula, A.G. Volkov, A.N. Van Hoek, T.H. Haines, D.W. Deamer, *Biophysical Journal*, **70**, 339 (1996).
- 14 J. Milhaud, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1663**, 19 (2004).
- 15 D. Bemporad, C. Luttmann, J.W. Essex, *Biophysical Journal*, **87**, 1 (2004).
- 16 T.H. Haines, *FEBS Letters*, **346**, 115 (1994).
- 17 M. Jansen, A. Blume, *Biophysical Journal*, **68**, 997 (1995).
- 18 P. Jedlovszky, M. Mezei, *Journal of Physical Chemistry B*, **105**, 3614 (2001).
- 19 S.J. Marrink, H.J.C. Berendsen, *Journal of Physical Chemistry*, **98**, 4155 (1994).
- 20 A. Finkelstein, in *Theory and Reality. Distinguished Lecture. Series of the Society of General Physiologists* (John Willey, 1988), Vol. 4, p. 1.
- 21 T.F. Weiss, *Transport* (The MIT Press, Cambridge, 1995).
- 22 M.A. Rudakova, A.V. Filippov, *Applied Magnetic Resonance*, **29**, 451 (2005).
- 23 M.A. Рудакова, А.В. Филиппов, Р.С. Гиматдинов, *Биофизика*, **50**, 878 (2005).
- 24 G. Oradd, G. Lindblom, in *NMR of orientationally ordered liquids*, edited by d.L.K. Burnell E. (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2003), p. 399.
- 25 A. Filippov, G. Oradd, G. Lindblom, *Biophysical Journal*, **84**, 3079 (2003).
- 26 P.N. Sen, *Concepts of Magnetic Resonance*, **23A(1)**, 1 (2004).
- 27 А.В. Филиппов, М.А. Рудакова, Г. Орадд, Й. Линдблом, *Биофизика*, **52**, 476 (2007).
- 28 A. Carruthers, D.L. Melchior, *Biochemistry*, **22**, 5797 (1983).
- 29 J.E. Tanner, *Journal of Chemical Physics*, **69**, 1748 (1978).
- 30 S. Tristram-Nagle, H.I. Petrache, J.F. Nagle, *Biophysical Journal*, **75**, 917 (1998).
- 31 M. Appel, G. Fleischer, D. Geschke, J. Karger, M. Winkler.
- 32 W.S. Price, *Concepts of Magnetic Resonance* **9**, 299 (1997).
- 33 D. Bemporad, J.W. Essex, *Journal of Physical Chemistry*, **108**, 4875 (2004).
- 34 M.A. Rudakova, A.V. Filippov, V.D. Skirda, *Applied Magnetic Resonance*, **27**, 519 (2004).
- 35 H. Leontiadou, A.E. Mark, S.J. Marrink *Biophysical Chemistry*, **86**, 2156 (2004).
- 36 А.М. Хакимов, М.А. Рудакова, А.В. Филиппов *Биофизика*, **52**, 840 (2007).
- 37 А.М. Хакимов, М.М. Дорогиницкий, М.А. Рудакова, А.В. Филиппов *Биофизика*, **53**, 271 (2008).