

**Тема 6. Фазовые переходы липидов в мембранах**

Тема 6. Фазовые переходы липидов в мембранах	1
Метод ДСК.....	1
Параметры кривых теплоемкости.....	2
Кривые плавления	2
$C = \frac{dq}{dT} = f(T)$	3
Методы измерения кривых плавления	3
Анализ кривых ДСК.....	3
Измерение флуоресценции зондов	4
Фазовое равновесие.....	4
Кооперативность фазовых переходов	5
Влияние размера кооперативной единицы на форму кривых плавления.....	6
Вопросы для зачёта	7

Метод ДСК

В биологических мембранах липидный слой по всем имеющимся данным представляет собой жидкое тело с вязкостью, близкой к вязкости подсолнечного масла. Строго говоря текучесть мембраны ограничена внутренней гидрофобной фазой, которая состоит из углеводородных цепей жирных кислот. Эта фаза, однако, не всегда бывает жидкой. При охлаждении до температур ниже 10°C мембраны замерзают, т.е. жидкая фаза затвердевает, приобретая свойства двумерного кристалла.

В мембранах, образованных синтетическими липидами, фазовый переход из жидкого в твёрдое состояние может происходить при более высоких температурах, в зависимости от химического состава фосфолипида. В таблице 1 приведены температуры фазовых переходов некоторых синтетических фосфатидилхолинов (лецитинов).

Таблица 1. Температуры плавления некоторых синтетических фосфолипидов

Жирные кислоты	Название остатка жирной кислоты	Сокращённое название фосфолипида	Температура плавления, T _c , оС
14:0	Миристоил	ДМЛ	23
16:0	Пальмитоил	ДПЛ	41
18:0	Стеароил	ДСЛ	58
18:1	Олеил	ДОЛ	-21(цис-форма)

Полное название фосфолипидов: **ДМЛ** - 1,2-димиристоилфосфатидилхолин (ещё одно возможное сокращение - ДМФХ) и так далее.

Для изучения фазовых переходов при нагревании используют метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (сокращённо - ДСК). Не останавливаясь на конструкции прибора, отметим только, что в конечном счёте с его помощью записывается кривая теплоёмкости, т.е. зависимость теплоёмкости липидов или мембран в суспензии от температуры

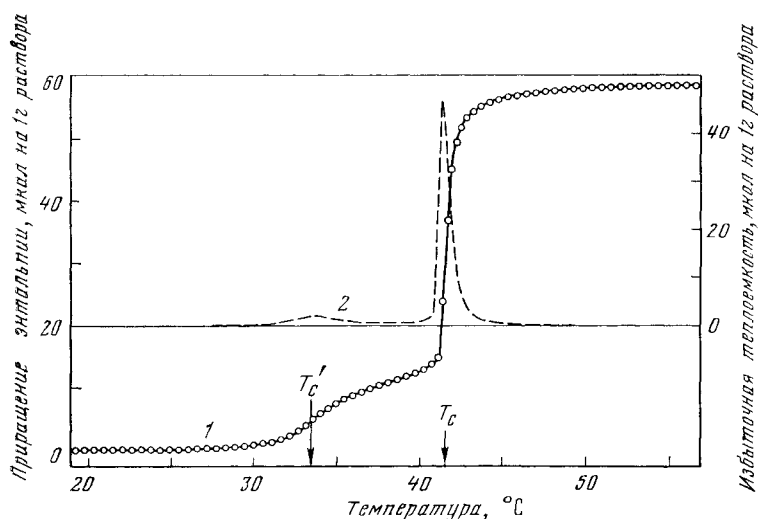


Рисунок 1. Фазовые переходы в суспензии фосфолипидных везикул (липосом) по данным дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК)

Перед приготовлением липосом к фосфолипидам было добавлено разное количество холестерина; его содержание в молярных процентах указано у кривых.

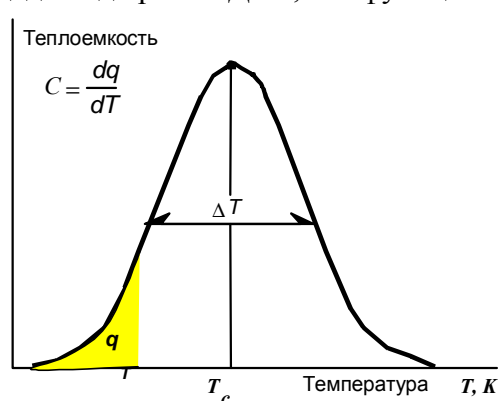
По оси ординат отложена теплоёмкость, по оси абсцисс - температура, К.

Метод называется дифференциальным, потому что измеряется только теплоёмкость суспендированного материала на фоне гораздо большей теплоёмкости раствора сравнения. Примеры таких кривых даны на рис.1, где приведены кривые ДСК для дистеароилфосфатидилхолина (ДСЛ). На этих кривых, в частности, видно увеличение температурного интервала фазового перехода при добавлении к липиду в мембране холестерина.

Параметры кривых теплоемкости

На рисунке 2 слева более подробно обозначены параметры кривой ДСК. На первом этапе нас будут интересовать три из них:

- 1 - Температура фазового перехода ("плавления") T_c .
- 2 - Температурный интервал ("ширина") фазового перехода.
- 3 - Общее количество тепла Q , поглощённого при плавлении. Оно представляет собой площадь под кривой ДСК, т.е. функции $C=f(T)$

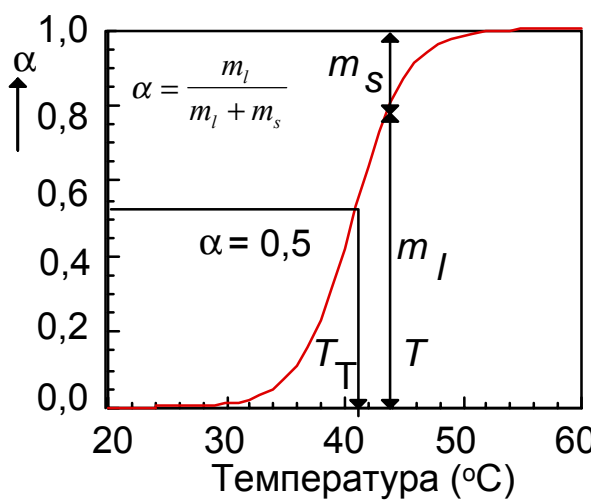


C - теплоёмкость.
 T - полуширина фазового перехода,
 T_c - температура плавления.
 Заштрихованная область соответствует количеству тепла, поглощённого при нагревании до температуры T .

Рисунок 2. Характеристик фазовых переходов в липидах по данным дифференциальной сканирующей микрокалориметрии

Кривые плавления

Кривой плавления называется зависимость доли жидкой фазы в общем количестве изучаемого вещества, в данном случае - липидов мембран.



α - доля жидкой фазы,
 T - температура, T_c - температура плавления ($= 0,5$), m_l - количество липида в жидкой фазе, m_s - количество липида в твёрдой фазе.

$$C = \frac{dq}{dT} = f(T)$$

Рисунок 3. Кривая плавления липидов в липосомах, приготовленных из ДПЛ

Обозначим количество липидов в жидкой фазе через m_l , а количество липидов в твёрдой фазе через m_s . Тогда доля жидких липидов будет равна

$$\alpha = \frac{m_l}{m_l + m_s} \tag{2}$$

На [рис. 3](#). приведена кривая плавления дистеароил-фосфатидил холина (или дипальмитоил-лецитина, ДПЛ).

Методы измерения кривых плавления

Для определения доли жидкой фазы в общем объёме изучаемого материала, в нашем случае, - в липидной слое мембран, можно использовать разные методы.

Анализ кривых ДСК

Один из них основан на анализе кривых, полученных методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Обратимся снова к рисунку 2.

Пусть удельная теплота плавления липида равна Q_m , а количество липидов в образце составляет m кмольей. Общее количество энергии, поглощённой образцом в интервале температур плавления T_1-T_2 равно очевидно площади под кривой $C=f(T)$, т.е.

$$Q = Q_m \times m = \int_{T_1}^{T_2} C dT \tag{3}$$

В интервале температур от T_1 до текущей температуры T расплавится количество молей липида m_d , и при этом поглотится количество тепла, равное

$$q = q_m \times m = \int_{T_1}^T C dT \tag{4}$$

(заштрихованная площадь на рис.2).

При температуре T молярная доля липидов, находящихся в жидкой фазе равна

$$\alpha = \frac{m_l}{m} = \frac{m_l}{m_l + m_s} = \frac{q}{Q} \tag{5}$$

Таким образом, измеряя по отношению площадей под кривой $C=f(T)$ при разных температурах, мы строим кривую плавления $\alpha=f(T)$.

Измерение флуоресценции зондов

Многие флуоресцирующие соединения обладают тем свойством, что спектры и (или) квантовые выходы их флуоресценции сильно зависят от окружающей среды: её полярности, вязкости и других характеристик. Примером такого соединения может служить АНС: 1-анилино, 2-нафталенсульфонат, формула которого приведена ниже.

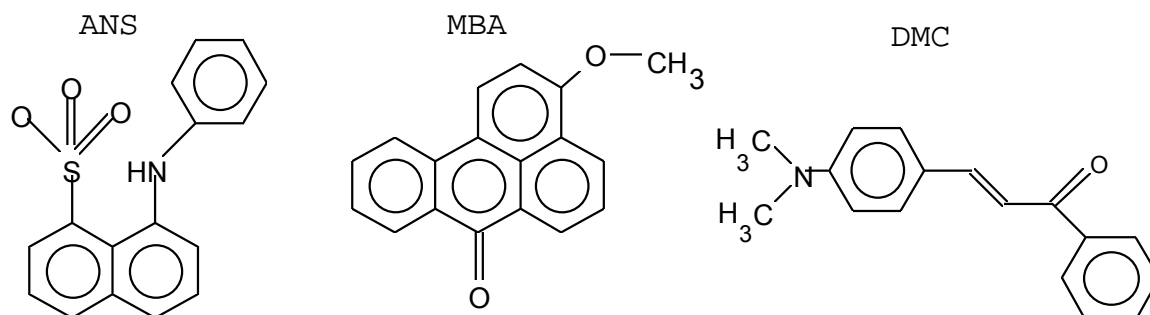


Рисунок 4. Структурные формулы некоторых флуоресцентных зондов, применяемых для измерения структурных перестроек в липидном слое биологических и фосфолипидных мембран

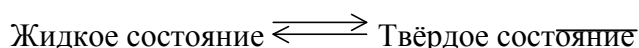
Это соединение при добавлении его к суспензии мембран распределяется между водной и липидной фазами. При этом флуоресцирует практически только АНС, растворённый в липидной фазе. Поэтому интенсивность флуоресценции возрастает при плавлении липидов мембран и снижается при замерзании.

Для изучения фазовых переходов наряду с АНС используются и другие флуоресцентные зонды. Были использованы также и другие методы:

- Метод спиновых зондов
- Комбинационное рассеяние
- Светорассеяние

Фазовое равновесие

В области температур фазового перехода, если плавление происходит достаточно медленно, устанавливается равновесие:



Можно считать, что вся мембрана состоит из участков жидких липидов и участков твёрдых липидов. Тогда обратимый процесс фазового перехода можно рассматривать как процесс превращения таких участков (доменов) друг в друга со скоростями, пропорциональными концентрации доменов, иначе говоря, фазовое равновесие можно рассматривать как обратимую химическую реакцию:



С константой равновесия

$$K = \frac{[l]}{[s]} = \frac{m_l}{m_s},$$

где $[l]$ и $[s]$ - концентрации липидов в жидкой и твёрдой фазах, а m_l и m_s - количество липида в жидкой и твёрдой фазах, соответственно. Изменение свободной энергии при плавлении моля липида G равно изменению энтальпии минус изменение тепловой энергии $T\Delta S$:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

причём

$$\Delta G = RT \ln K = RT \ln \frac{m_l}{m_s} \quad (7)$$

Отсюда находим

$$\ln K = \frac{\Delta H}{R} \times \frac{1}{T} - \frac{\Delta S}{R} \quad (8)$$

Таким образом, зависимость

$$\ln K = \ln \frac{m_l}{m_s} = \ln \frac{q}{Q-q}$$

представляет собой прямую линию с угловым коэффициентом $\frac{\Delta H}{R}$ и отсечкой на оси ординат, равной $\frac{\Delta S}{R}$. Примеры такого рода прямых даны на рис. 7. Объяснение величины n на этом рисунке будет дано ниже.

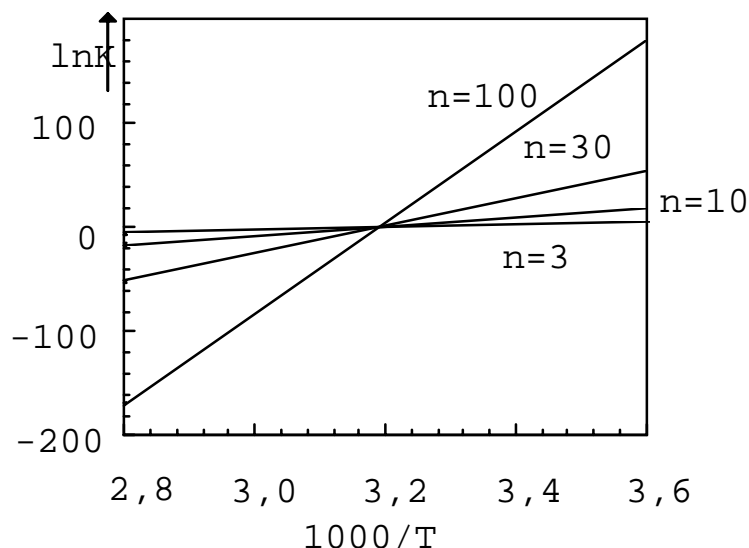


Рис. 7. Зависимость $\ln K$ от обратной абсолютной температуры.

Отсечка на оси ординат позволяет найти энтропию плавления (S/R), угловой коэффициент – энтальпию плавления (H/R).

n – размеры кооперативной единицы плавления (объяснения в тексте).

Таким образом, из кривых плавления, полученных экспериментально, можно найти термодинамические характеристики процесса H и S . Для этого:

1. Находим отношение $K = \frac{m_l}{m_s}$ (см. рис. 3) при разных температурах T , °C.
2. Строим зависимость $\ln K$ от обратной абсолютной температуры ($1/(t^{\circ}\text{C}+273)$).
3. Тангенс угла наклона прямой равен H/R . Рассчитываем H .
4. Отсечка по ординате равна S/R . Рассчитываем S .

Кооперативность фазовых переходов

Из кривых теплоёмкости (типа приведенной на рис. 2) мы находим теплоту плавления образца Q и молярную теплоту плавления $Q_m = Q/m$, где m – количество молей липида в образце (расчитано как масса липида, делённая на его молекулярную массу). Из кривых плавления (см. рис.3), мы находим энтальпию плавления H . На первый взгляд величины Q_m и H должны быть

примерно равны, поскольку система не совершает механической работы. Оказалось однако, что при плавлении синтетических липидов H превышает Q_m в десятки, а иногда и в сотни раз.

В чём же тут дело?

Вернёмся к основному уравнению 6 на стр. 4. Его применение основано на том, что (цитируем) "...фазовое равновесие можно рассматривать как обратимую химическую реакцию:

$s \leftrightarrow l$ с константой равновесия $K = \frac{m_l}{m_s}$ " (Конец цитаты).

Спрашивается, какие "молекулы" l переходят в этой реакции в "молекулы" s . Очевидно, что это не отдельные молекулы фосфолипида, поскольку одна молекула не может находиться в жидкой или в твёрдой фазе. Переходит из одного состояния в другое одновременно несколько молекул, образующие некий "кластер", а лучше сказать *кооперативную единицу*. В пределах кооперативной единицы все молекулы находятся в одинаковом состоянии, образуя либо кристаллическую (твёрдую) фазу либо жидкую фазу. Каждый кластер может изменять своё фазовое состояние по закону "всё или ничего" и притом совершенно независимо от других кластеров. В этом смысле кооперативные единицы представляют собой как бы сверх-молекулы, которые могут переходить из состояния l в состояние s . Изменение свободной энергии G , энтальпии H и энтропии S в уравнении 6 на стр.4 относится к молю таких "молекул". Довольно очевидно, что если кооперативная единица образована n молекулами фосфолипида, то

$$\Delta H = nQ_m \quad (9)$$

где n - размер кооперативной единицы, т.е. число молекул фосфолипида, входящих в одну кооперативную единицу.

Таким образом из кривых плавления мы находим теплоту плавления в расчёте на n молей фосфолипида, и чтобы получить эти характеристики в расчёте на один моль надо найти сначала размер кооперативной единицы n . Это можно сделать, только если одновременно получены данные калориметрии, позволяющие определить теплоту плавления Q , и рассчитать молярную теплоту плавления Q_m . Разделив Q_m на H , получаем n . Затем находим S , в расчёте на один моль фосфолипида. В таблице 2 приведены полученные таким образом термодинамические параметры плавления синтетических фосфолипидов (в расчёте на один моль фосфолипида).

Таблица 2. Термодинамические параметры переходов гель-жидкий кристалл для 1,2-диацил-L-фосфатидилхолинов (по М.С. Phillips, 1972).

Фосфолипид	T_c , °C	ΔH , ккал/моль	ΔS , кал/моль
ДОЛ (18:1)	-21	7,6	30,3
ДМЛ (14:0)	23	6,64	22,4
ДПЛ (16:0)	41	8,66	27,6
ДСЛ (18:0)	58	10,67	32,4
ДБЛ (22:0)	75	14,88	42,8

Влияние размера кооперативной единицы на форму кривых плавления

Чтобы проанализировать влияние кооперативности фазовых переходов на форму кривых плавления и калориметрических кривых, нам придётся произвести некоторые расчеты.

За основу возьмём данные [таблицы 2](#). Для примера проанализируем форму кривых плавления одного из фосфолипидов, скажем, ДПЛ.

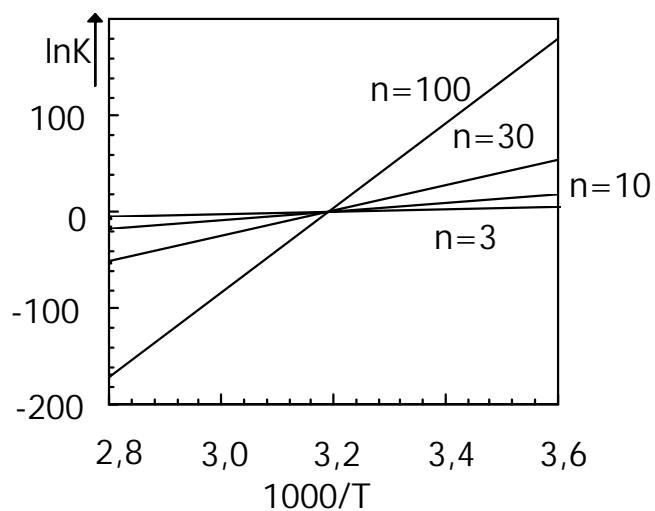


Рис. 8. Влияние размера кооперативной единицы на наклон кривой $\ln K=f(1/T)$

Вопросы для зачёта

1. Метод ДСК.
2. Параметры кривых *Теплоёмкость/температура*
3. Кривые плавления. Методы измерения кривых плавления.
4. Фазовое равновесие. Кооперативность фазовых переходов
5. Влияние размера кооперативной единицы на форму кривых плавления.