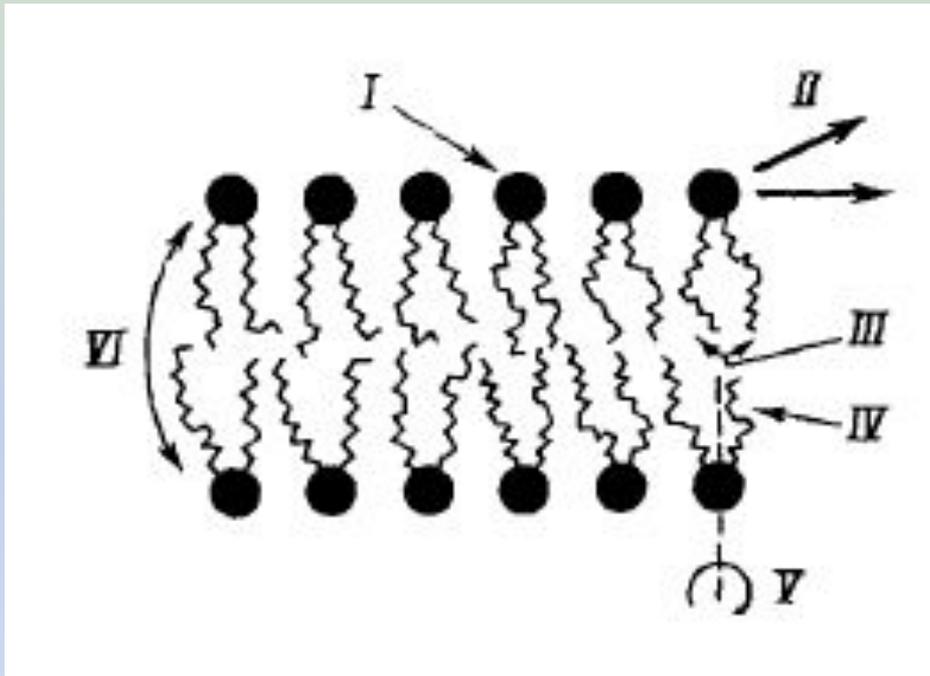


ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ

ПОДВИЖНОСТЬ ЛИПИДОВ В МЕМБРАНЕ

- ИЗМЕНЕНИЕ ОРИЕНТАЦИИ ПОЛЯРНЫХ ГОЛОВ
- ЛАТЕРАЛЬНОЕ ДВИЖЕНИЕ
- КОЛЕБАНИЯ АЦИЛЬНЫХ ЦЕПЕЙ
- ОБРАЗОВАНИЕ КИНКОВ И ПЕРЕМЕЩЕНИЕ ИХ ВДОЛЬ АЦИЛЬНЫХ ЦЕПЕЙ
- РОТАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ
- ФЛИП-ФЛОП
- ВЫХОД ИЗ БИСЛОЯ



I – изменение ориентации полярных голов

II – латеральная диффузия

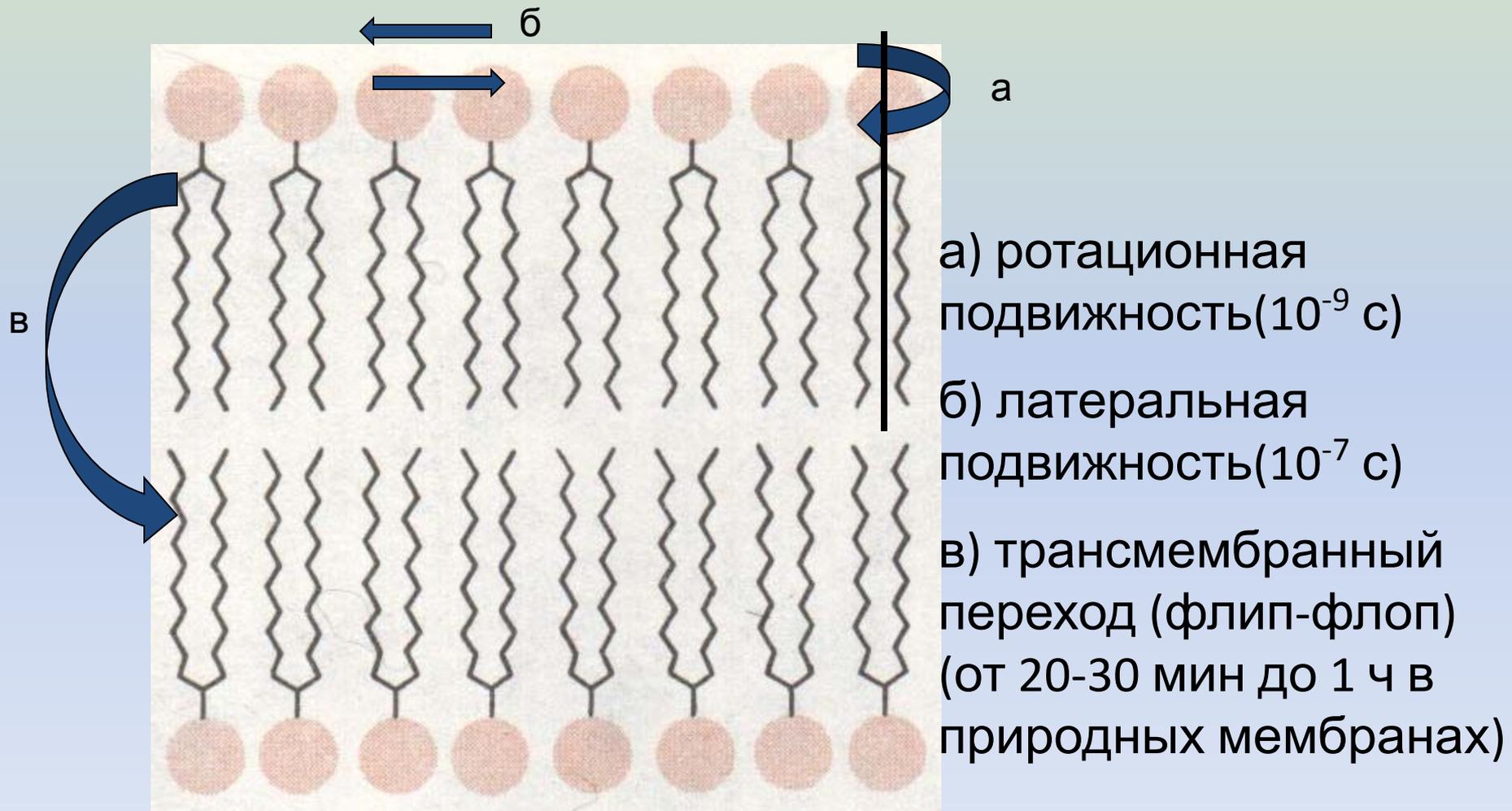
III – колебания жирнокислотных цепей

IV – образование кинков

V – ротационная подвижность

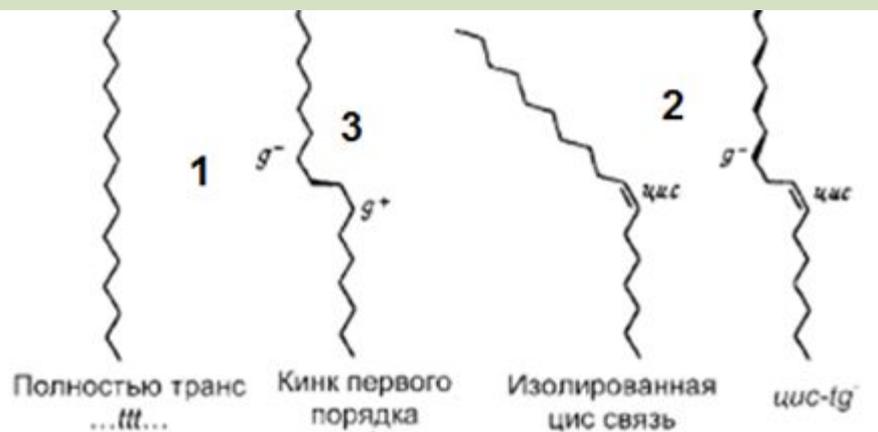
VI – флип-флоп

ДИНАМИКА ЛИПИДОВ В МЕМБРАНЕ



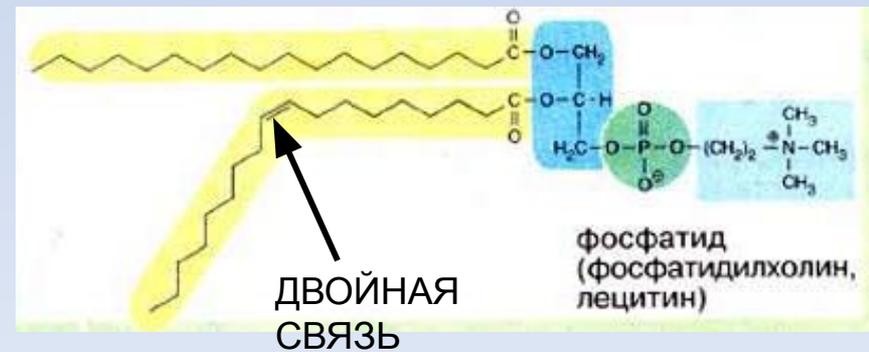
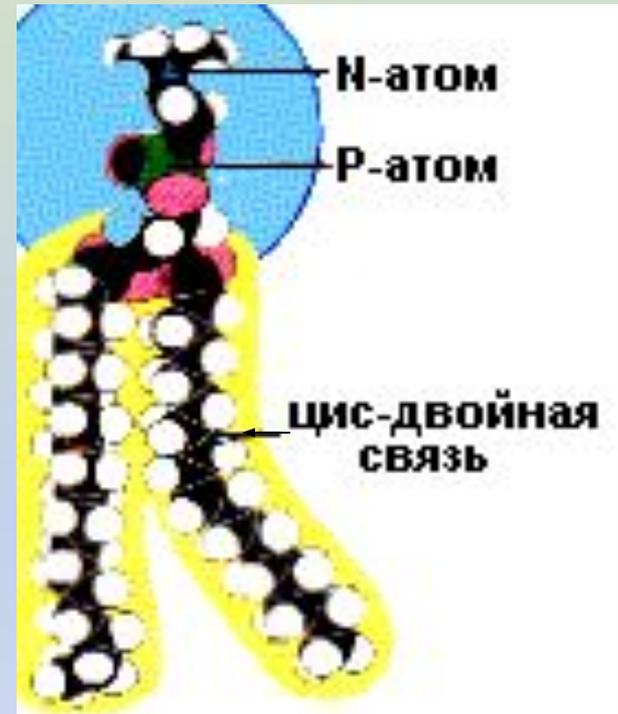
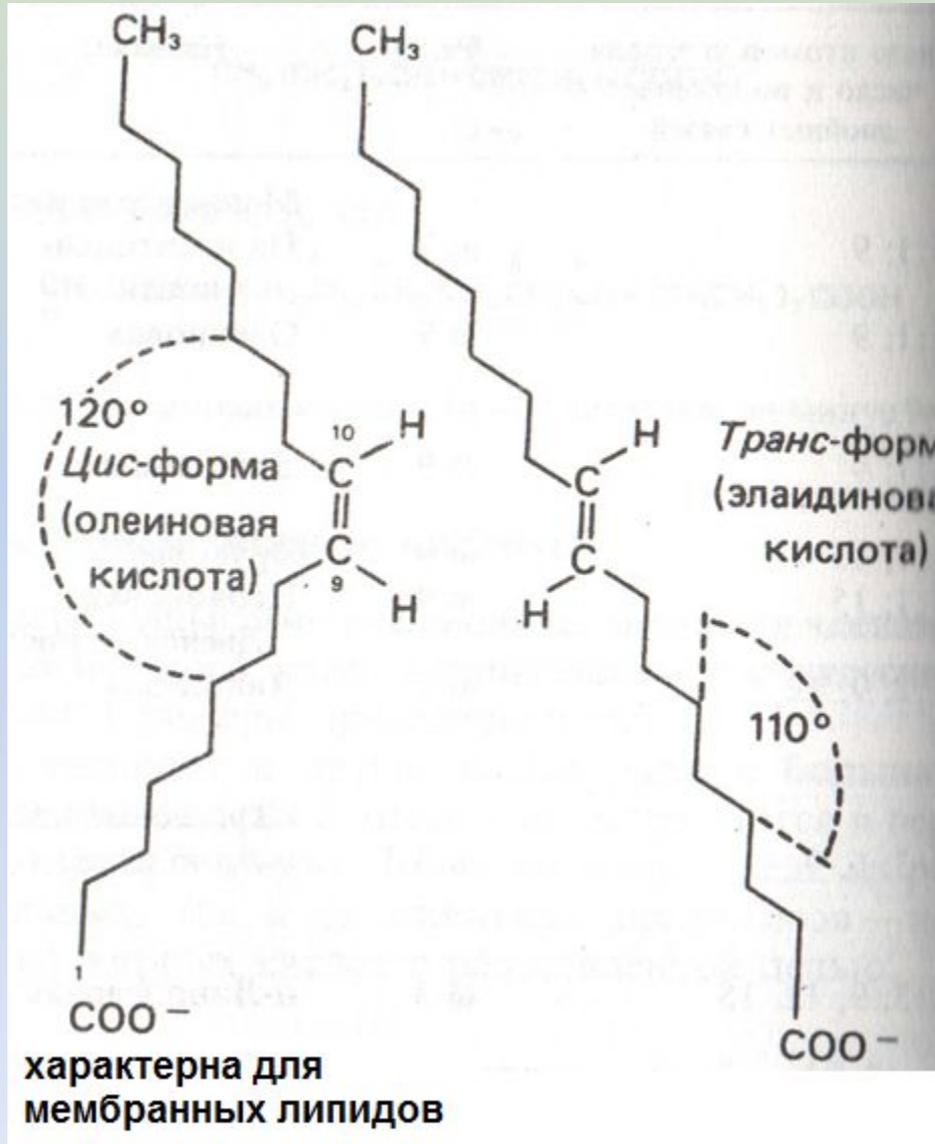
**УПАКОВКА ЛИПИДОВ В МЕМБРАНЕ,
ПОДВИЖНОСТЬ ЖИРНОКИСЛОТНЫХ ХВОСТОВ,
ОБРАЗОВАНИЕ КИНКОВ**

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ КОНФОРМАЦИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ



- 1 – насыщенная углеводородная цепь
- 2 – ненасыщенная цепь в цис-конформации
- 3 – насыщенная цепь в гош-конформации

ИЗОМЕРИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ



ОБРАЗОВАНИЕ ДЕФЕКТОВ В МЕМБРАННОМ БИСЛОЕ

ГЕОМЕТРИЯ БИСЛОЯ

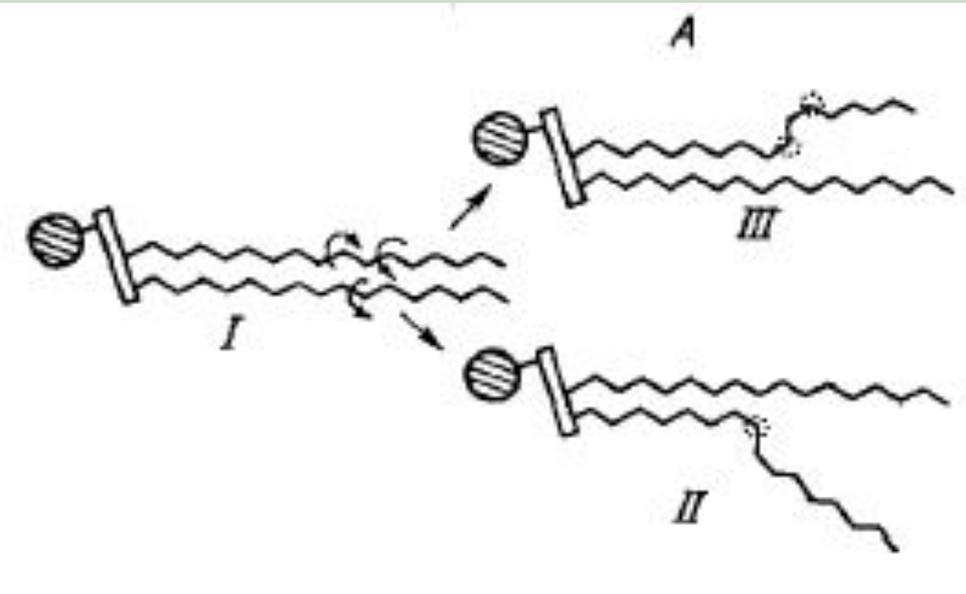
РАЗМЕРЫ МОЛЕКУЛЫ ЛИПИДА: ХВОСТ 2 нм, ГОЛОВКА 0,5 – 0,7 нм,

РАССЧИТАННАЯ ТОЛЩИНА БИСЛОЯ 5,0 – 5,4 нм

В ДЕЙСТВИТЕЛЬНОСТИ: ТОЛЩИНА БИСЛОЯ ЛИПИДОВ В
МЕМБРАНЕ 3,5 – 4 нм

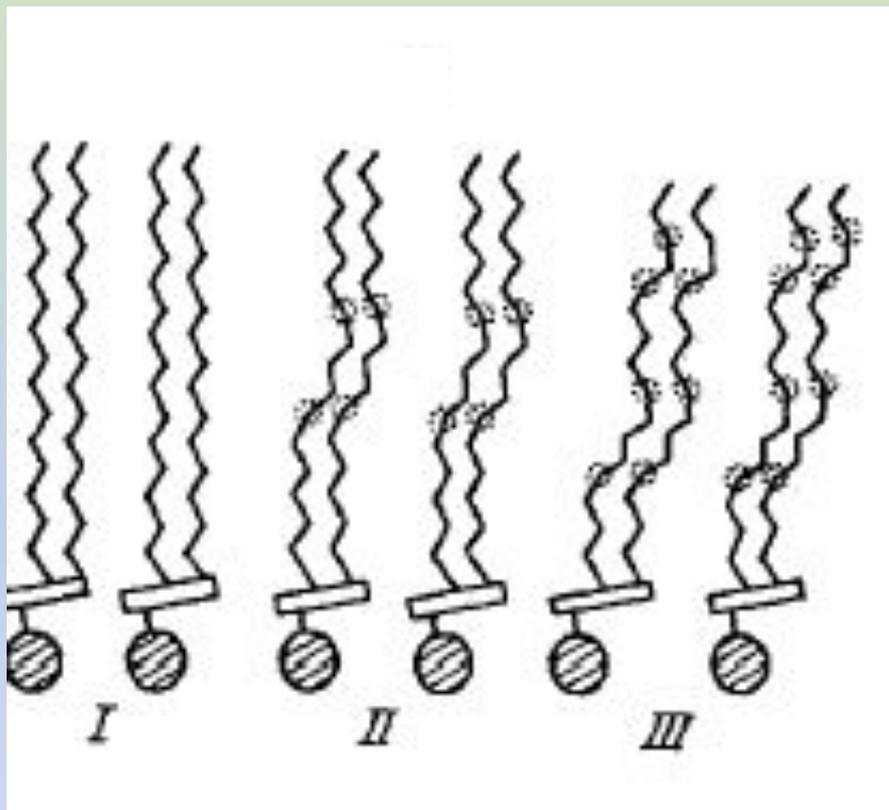
СЛЕДОВАТЕЛЬНО, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ РАСПОЛОЖЕНЫ В БИСЛОЕ
РЫХЛО

РАЗЛИЧНЫЕ КОНФИГУРАЦИИ ЖИРНОКИСЛОТНЫХ ЦЕПЕЙ ФОСФОЛИПИДОВ



- вращение вокруг С-С связей ничем не ограничено (I)
- образование скошенной (*гош*) конформации (II) или
- кинка (III) в результате несогласованного вращения

Влияние кинков на упаковку бислоя



I – кинки отсутствуют

II – один кинк на жирнокислотную цепь

III – два кинка на жирнокислотную цепь

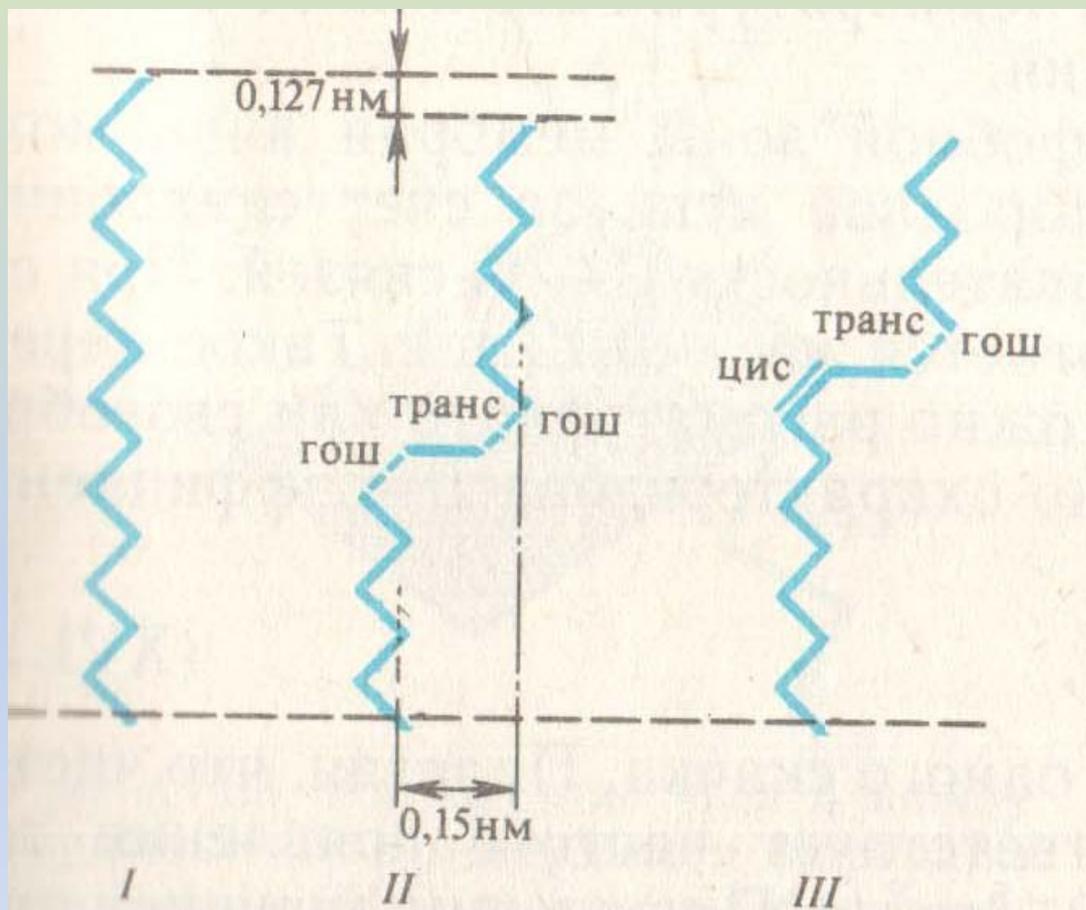


Рис. XVI.1. Углеводородные цепи в полностью транс-конфигурации (I), гош-транс-гош-конфигурации (II), цис-транс-гош-конфигурации (III)

ТРАНС-ГОШ-ИЗОМЕРИЗАЦИЯ – ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ МОЛЕКУЛ ЗА СЧЕТ ПОВОРОТОВ ВОКРУГ

ЕДИНИЧНЫХ С-С СВЯЗЕЙ

ПРИ ПЕРЕХОДЕ ИЗ ТРАНС- В ГОШ-КОНФОРМАЦИЮ ОБРАЗУЕТСЯ СКЛАДКА ИЛИ **КИНК**

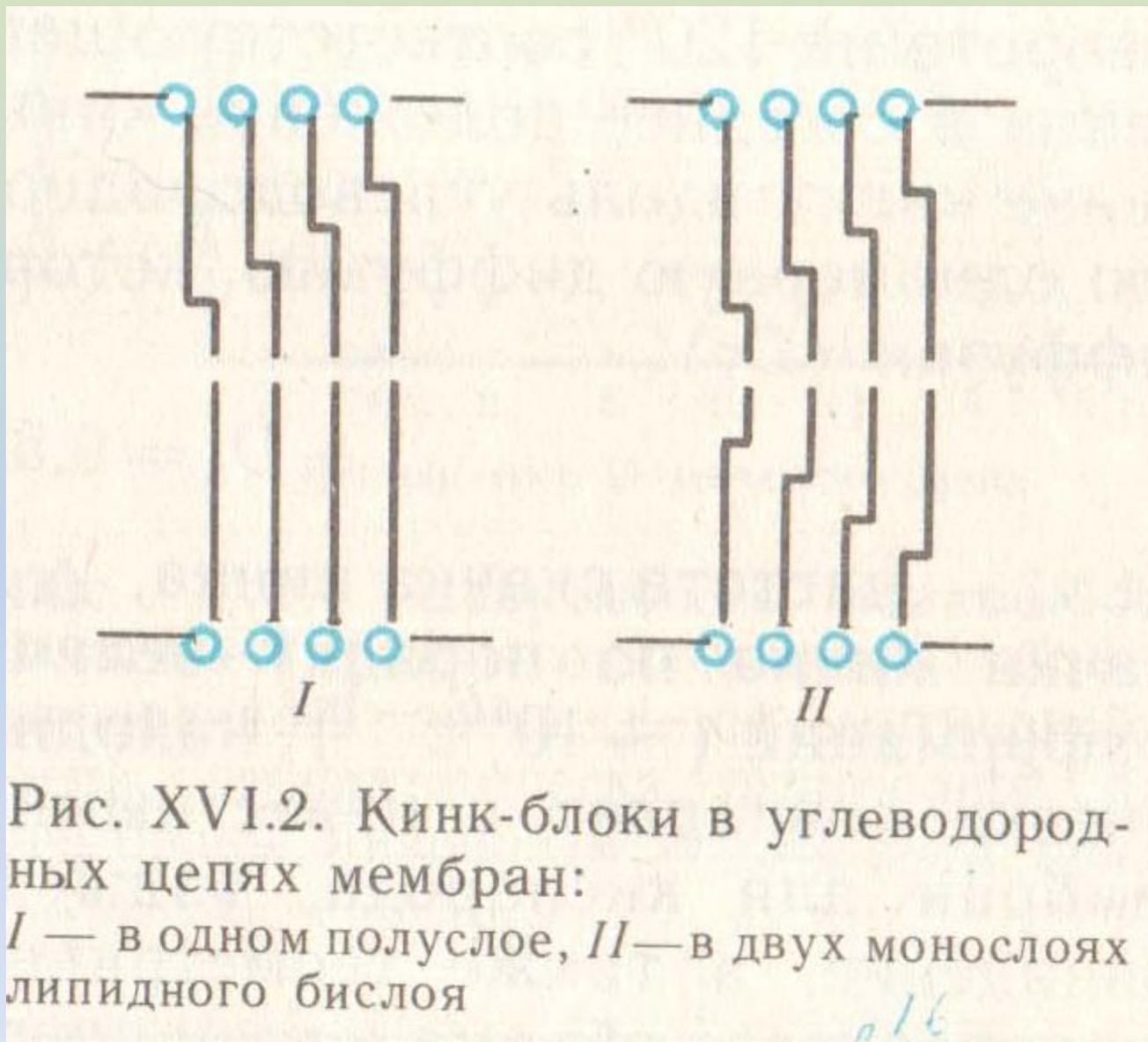
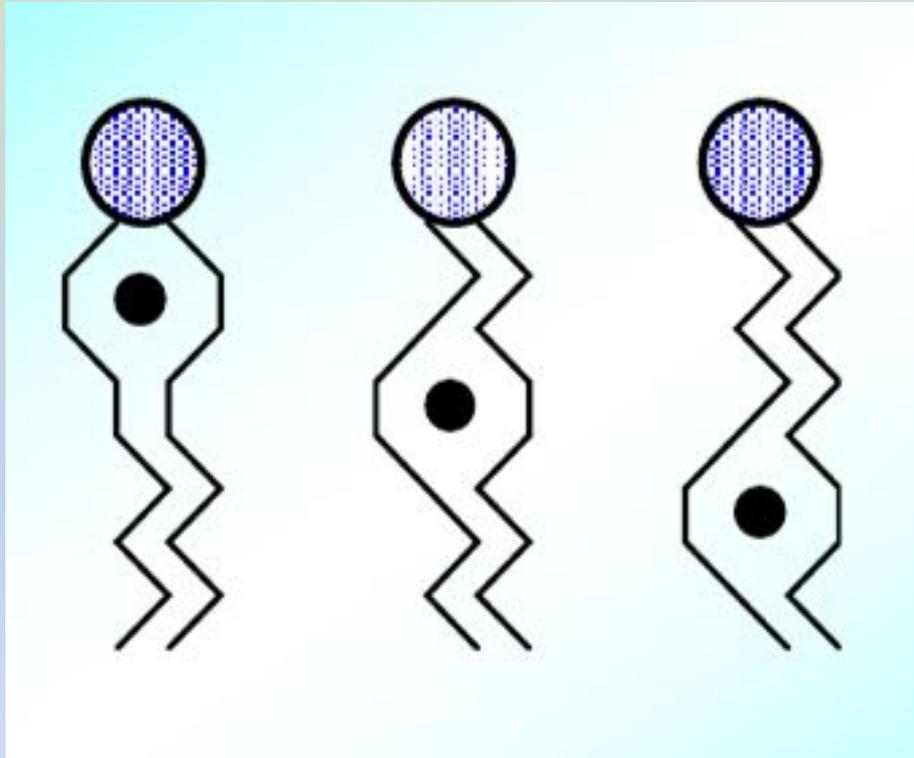


Рис. XVI.2. Кинк-блоки в углеводородных цепях мембран:

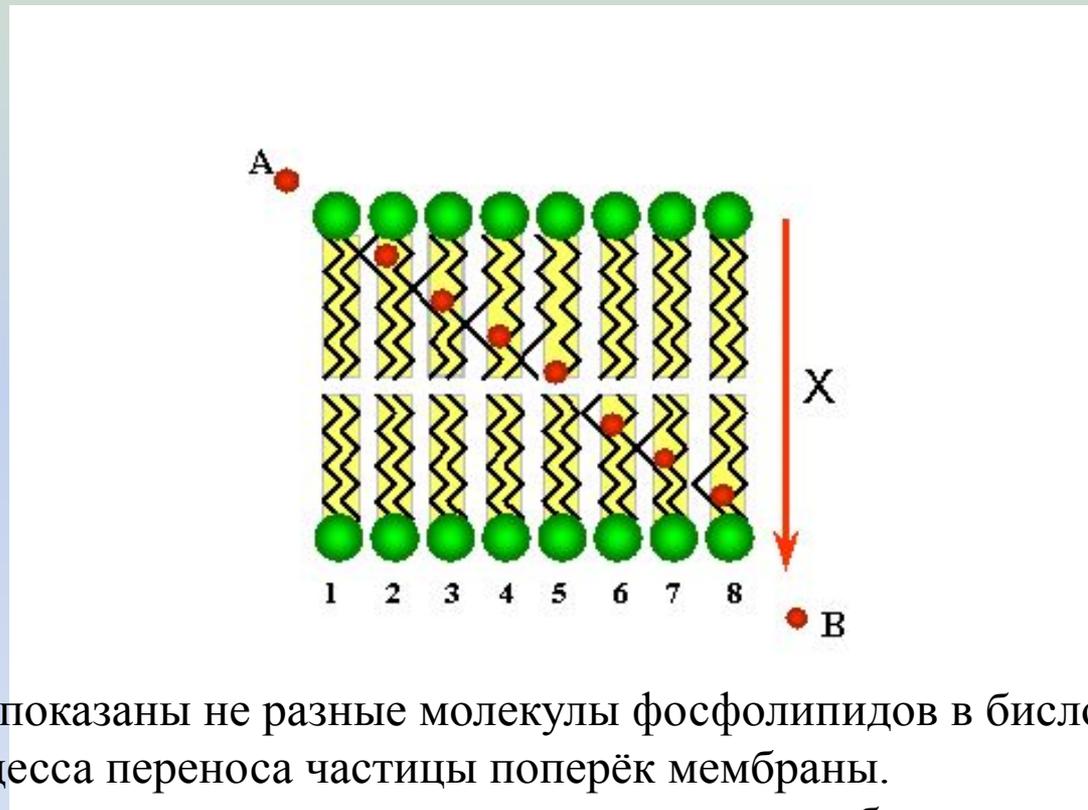
I — в одном полуслое, *II* — в двух монослоях липидного бислоя

р/б

МЕХАНИЗМ ПЕРЕНОСА ИОНОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

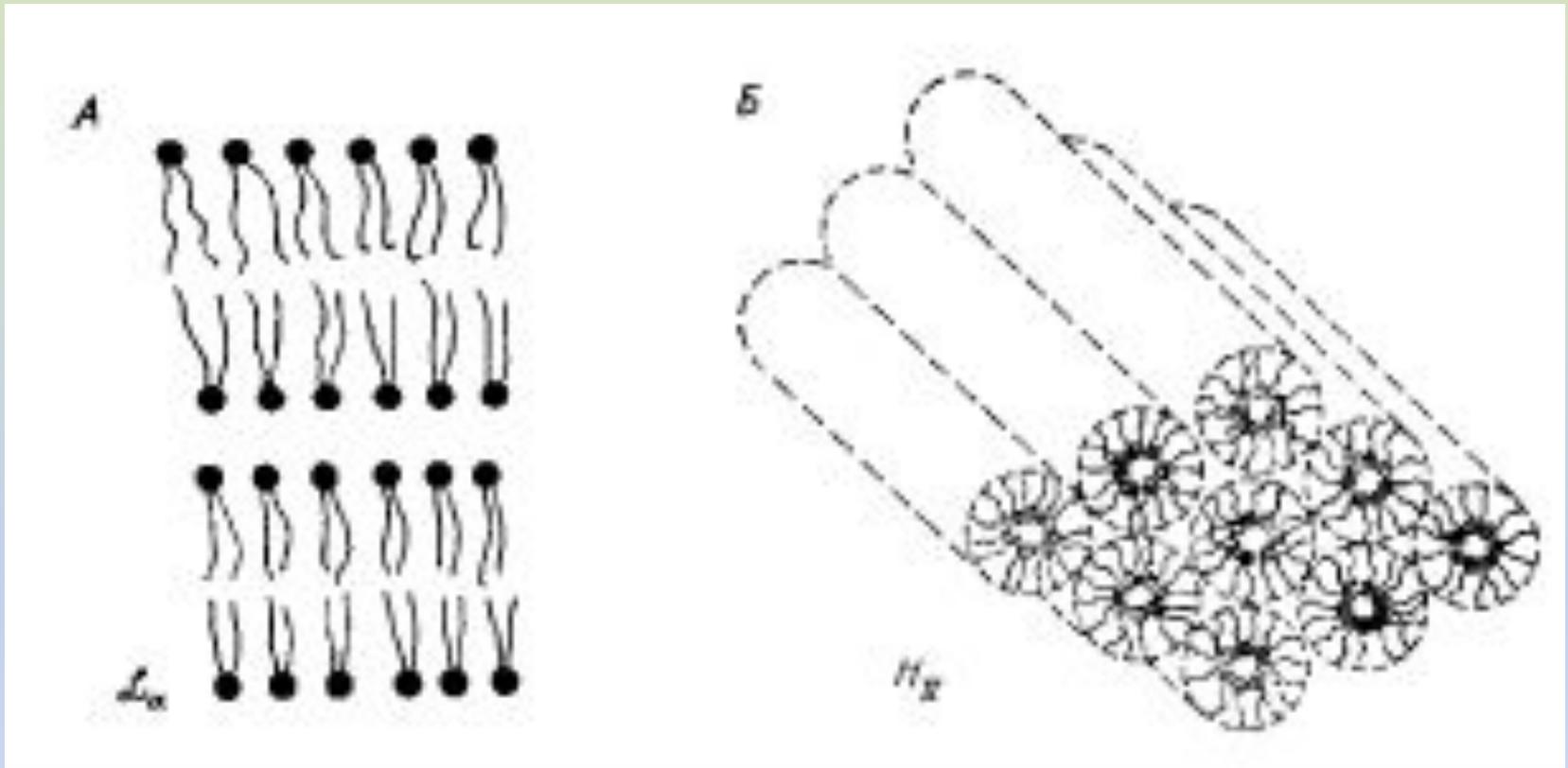


ПЕРЕНОС ЧАСТИЦЫ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ БЛАГОДАРЯ КИНКАМ



На рисунке показаны не разные молекулы фосфолипидов в бислое, а разные стадии процесса переноса частицы поперёк мембраны.
2-8 -изменение во времени положения частицы в мембране.

ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В ЛИПТИДНОМ БИСЛОЕ



Структуры, образуемые в водных суспензиях липидами, склонными к созданию ламеллярных образований (А) и небислойных гексагональных образований (Б)

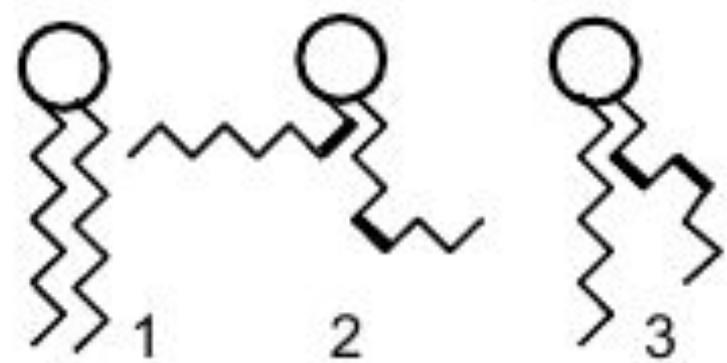


Рис. 8.21. Различные конфигурации жирнокислотных цепей фосфолипидов.

1 – все-транс-; 2 – две гош-конфигурации; 3 – одна дубль-гош-конфигурация. Жирным шрифтом выделена связь, вокруг которой произошел поворот цепи на 180° .

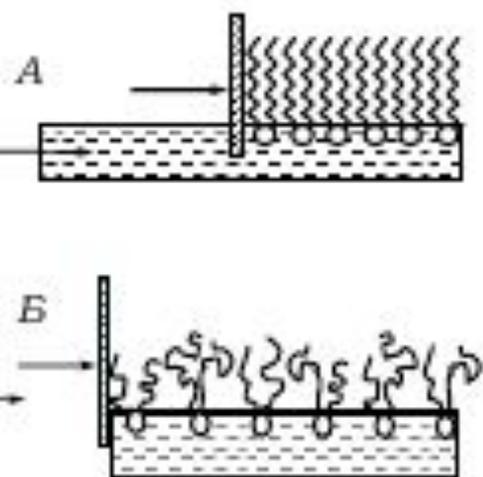
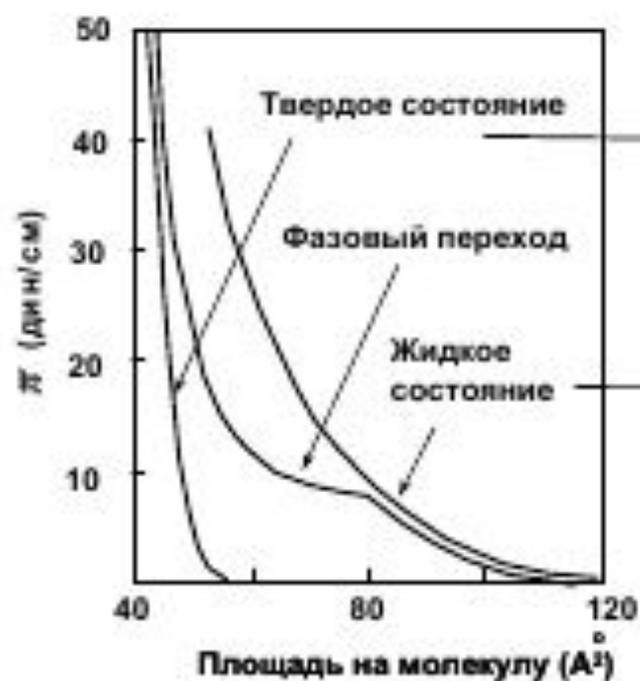
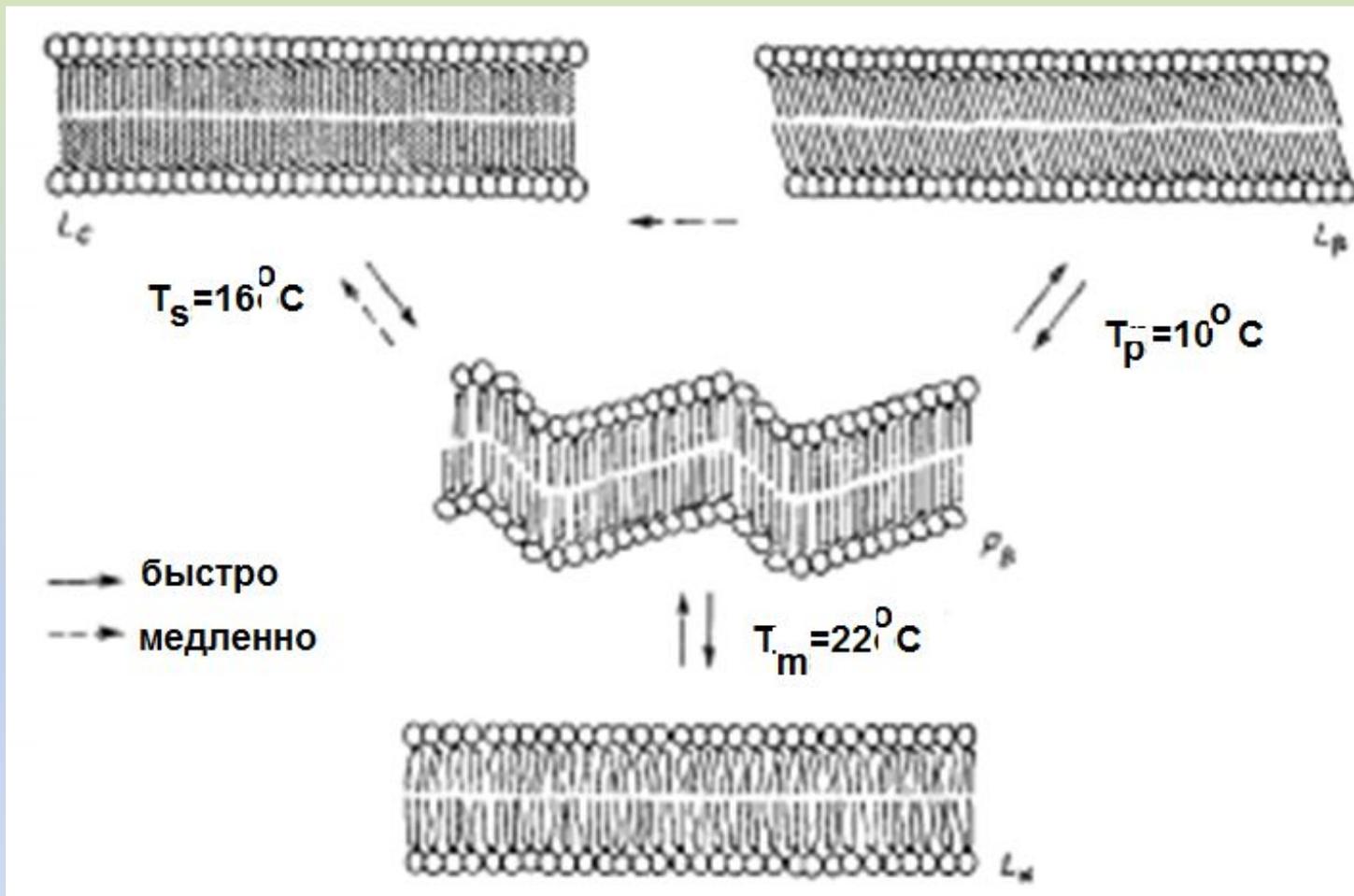


Рис. 8.17. Кривые давление – площадь при разных температурах (слева).

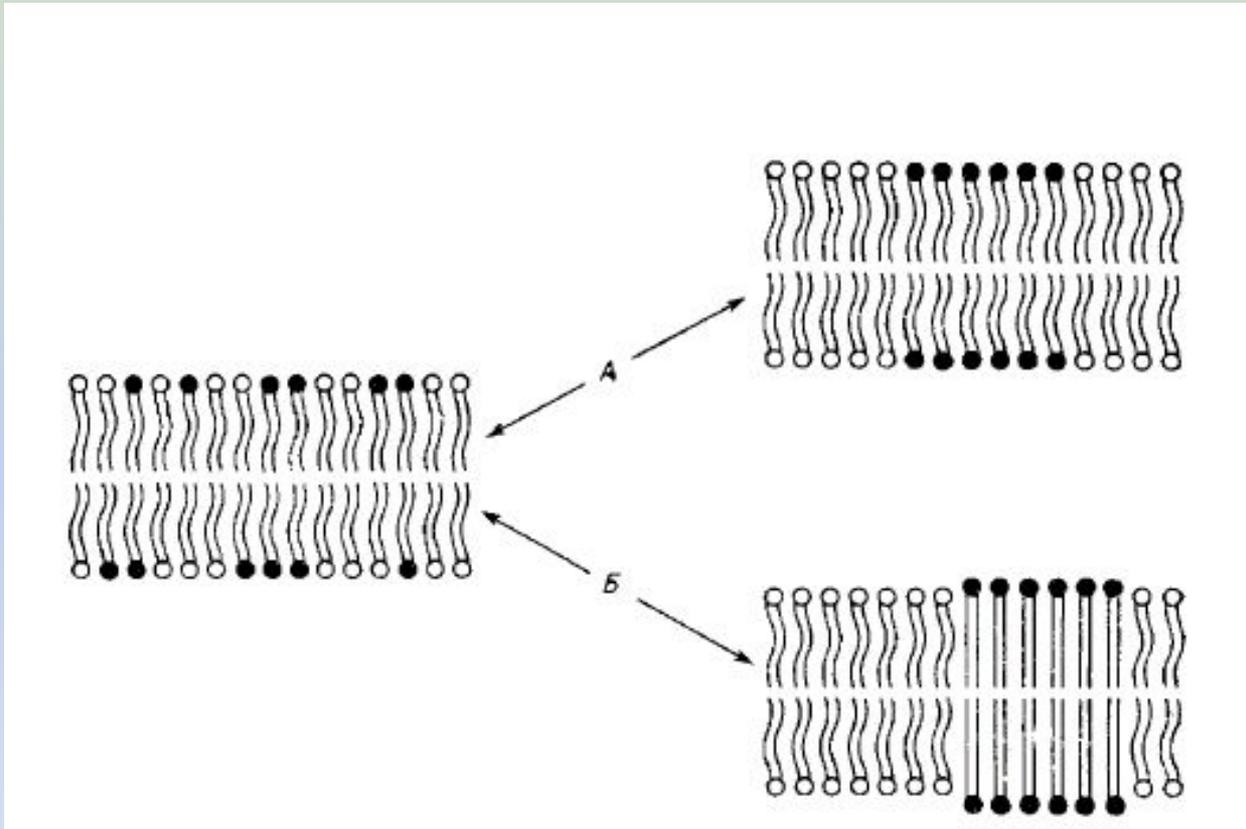
1 – 6,2 °C; 2 – 21,1 °C; 3 – 34,6 °C. Справа – форма молекул липидов в твердом (А) и жидком (Б) монослое.



Схематическое изображение четырех фазовых состояний ламеллярного бислоя, образованного чистым димиристоилфосфатидилолином

Сплошная стрелка обозначает быстрые (порядка минут или меньше), а пунктирная – медленные (порядка месяцев) переходы.

Кооперативность фазовых переходов



РАЗДЕЛЕНИЕ ФАЗ В ГЕТЕРОГЕННОМ БИСЛОЕ (А) С
ОДНОВРЕМЕННЫМ ФАЗОВЫМ ПЕРЕХОДОМ ЧАСТИ БИСЛОЯ (Б) ПОД
ВЛИЯНИЕМ ТЕМПЕРАТУРЫ

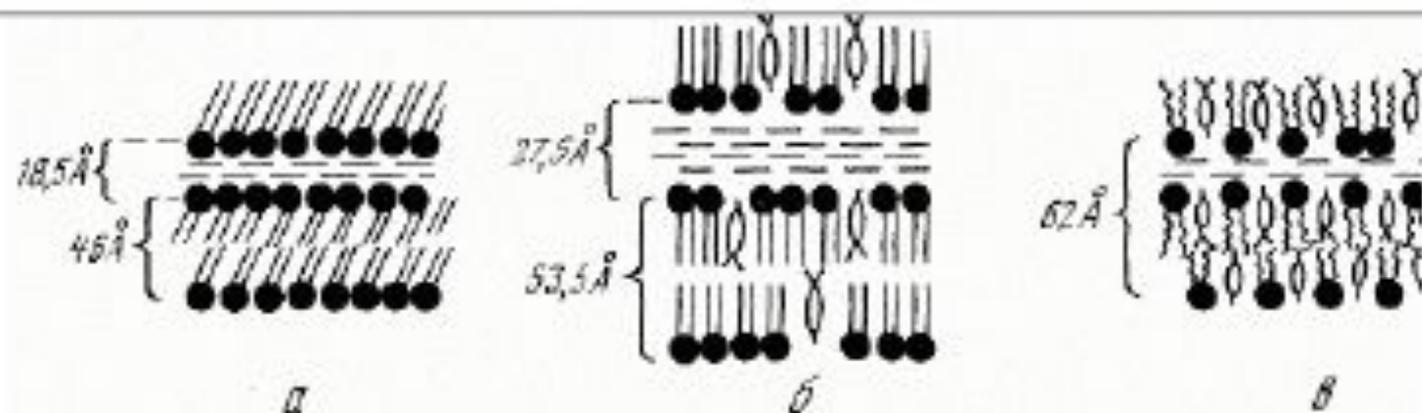


Рис. 8.24. Плавление по данным рентгеноструктурного анализа: Различное расположение молекул липидов в бислое: а) – кристаллическое (твердое состояние); б) – после включения в бислой холестерина; в) – расплавленное (жидкое) состояние бислоя. Непосредственно данные рентгеноструктурного анализа дают толщину бислоя и толщину промежутка между монослоями в бислое.

МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОКАЛОРИМЕТРИИ



Метод, основанный на измерении разницы тепловых потоков, идущих от испытуемого образца и образца сравнения.

Фазовые переходы в суспензии фосфолипидных ЛИПОСОМ

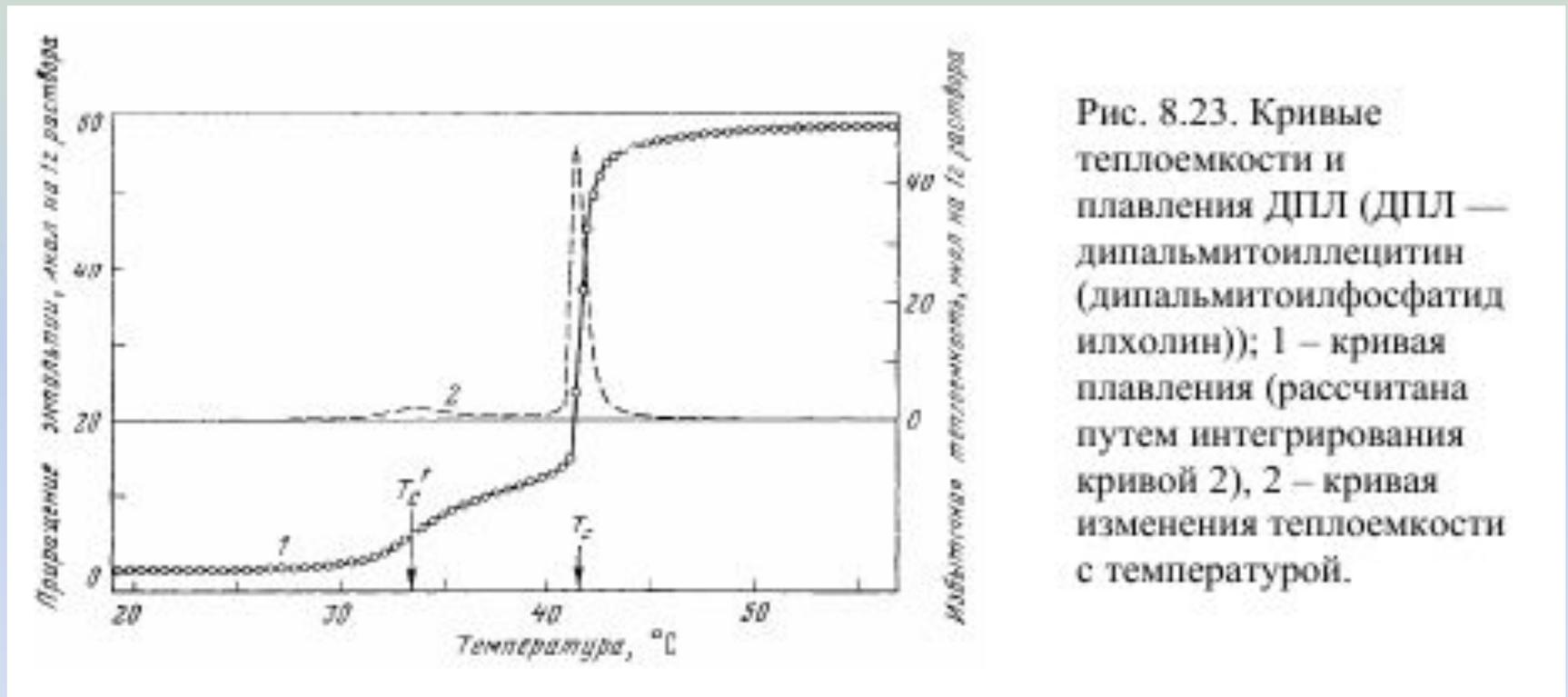


Рис. 8.23. Кривые теплоемкости и плавления ДПЛ (ДПЛ — дипальмитоиллецитин (дипальмитоилфосфатид илхолин)); 1 — кривая плавления (рассчитана путем интегрирования кривой 2), 2 — кривая изменения теплоемкости с температурой.

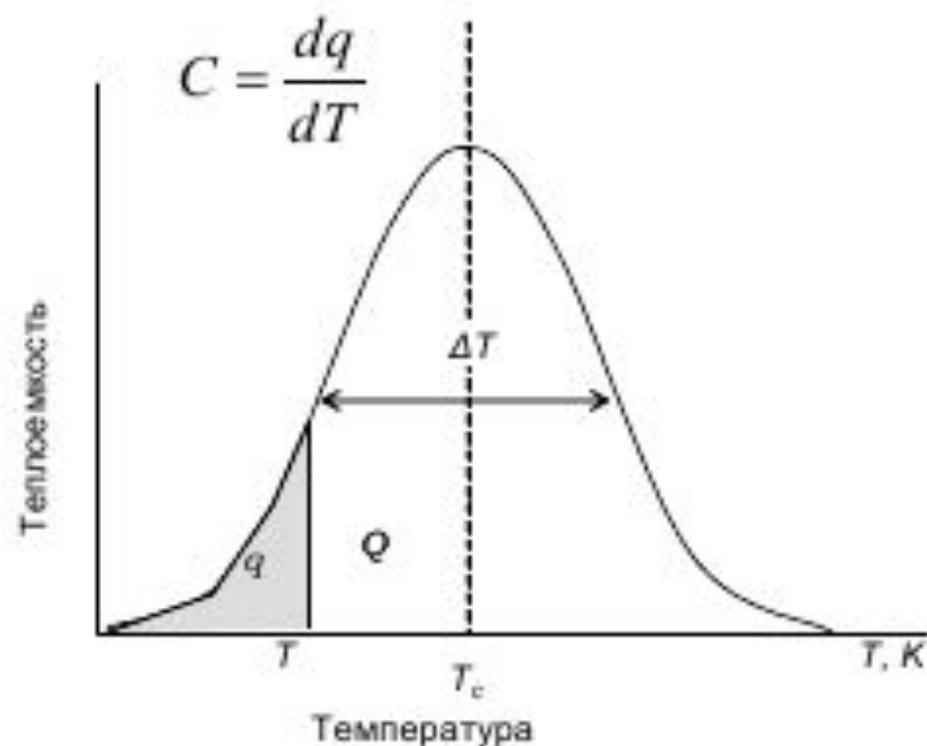


Рис. 8.24. Параметры кривой теплоемкости при плавлении, полученной методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии; C — теплоёмкость, ΔT — ширина фазового перехода, T_c — температура плавления. Заштрихованная область соответствует количеству тепла q , поглощённого при нагревании до температуры T .

Анализ кривых

ДСК

Пусть удельная теплота плавления липида равна

Q_m , количество липидов в образце - m кмоль.

Общее количество энергии, поглощённой образцом во всем интервале температур плавления T_1-T_2

равно площади под кривой $C = f(T)$

$$Q = Q_m \cdot m = \int_{T_1}^{T_2} C dT$$

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

$$q = Q \cdot m_l = \int_{T_1}^T C dT$$

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

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

Измеряя отношение площадей под кривой $C=f(T)$ при разных температурах можно построить кривую плавления $\alpha = f(T)$

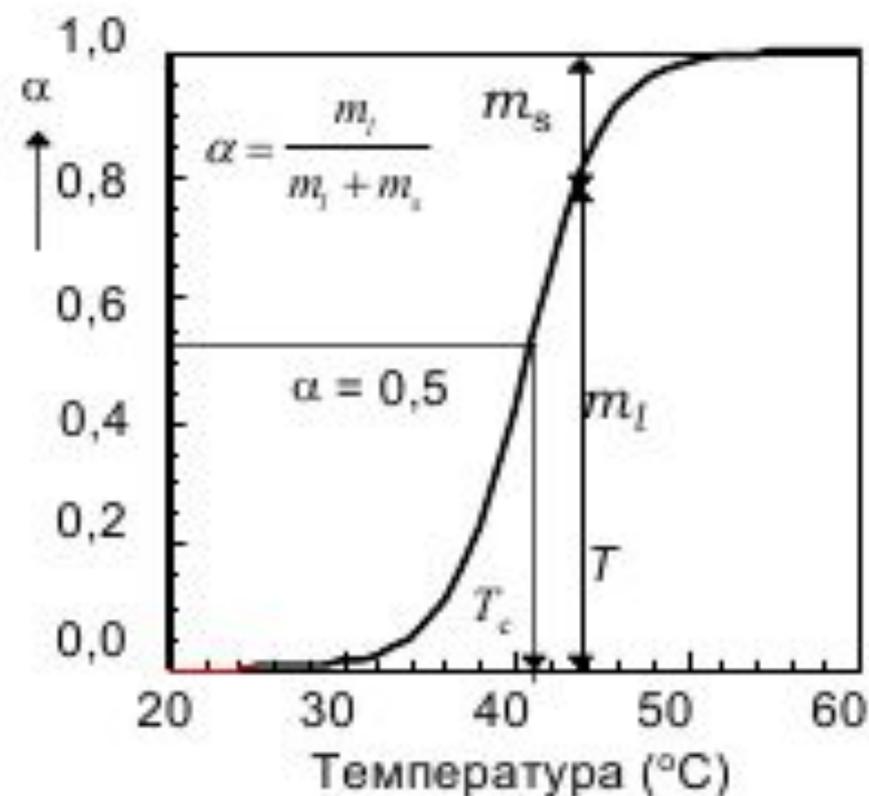


Рис. 8.28. Кривая плавления липидов в липосомах, приготовленных из ДПЛ; α — доля жидкой фазы; T — температура, T_c - температура плавления ($\alpha = 0,5$), m_l — количество липида в жидкой фазе, m_s — количество липида в твёрдой фазе.

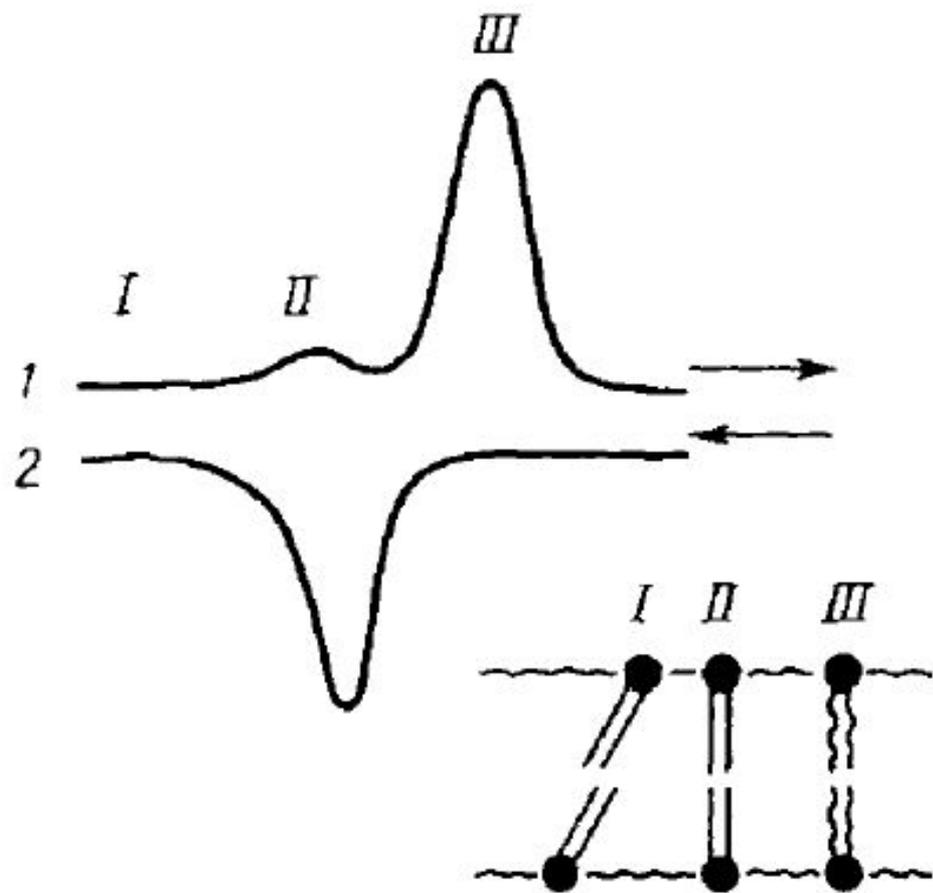
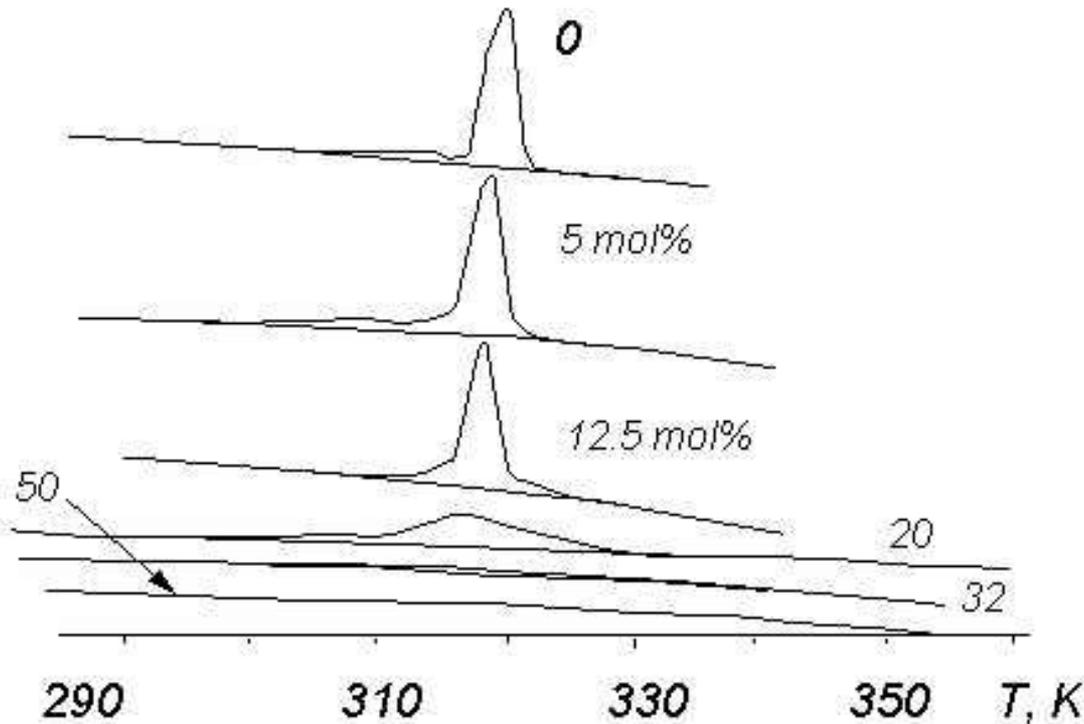


Рис. 38. Схематическое изображение гелеобразного (I), переходного (II) и жидкокристаллического (III) состояния бислоя в ходе изменения температуры

C

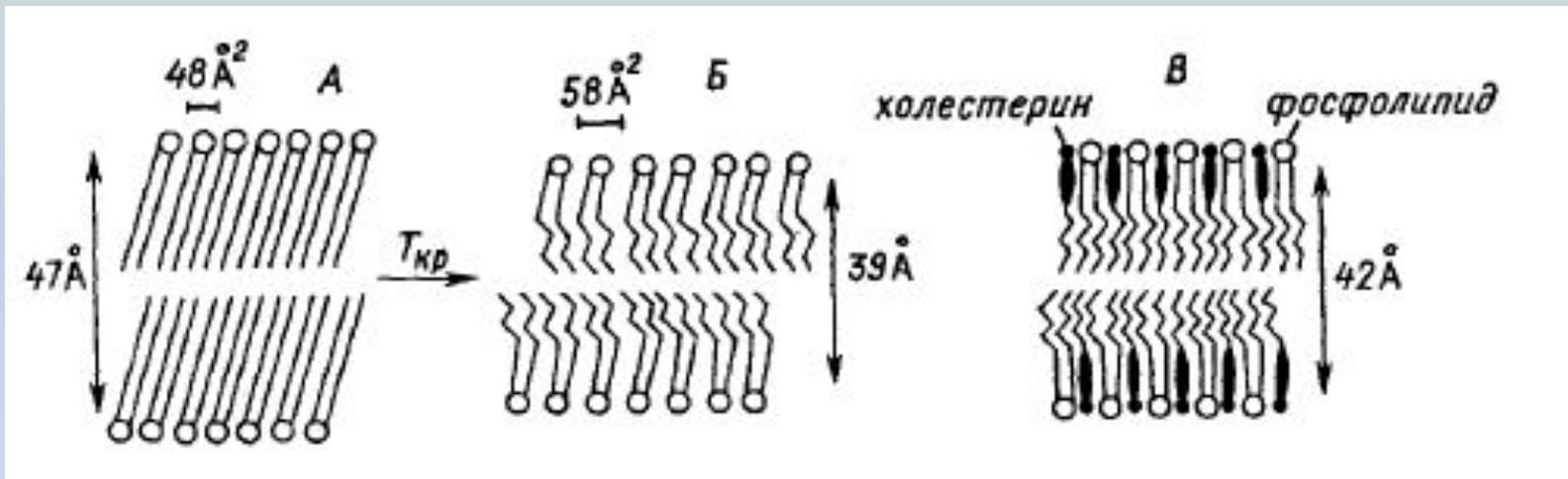
Phase transitions. Cholesterol



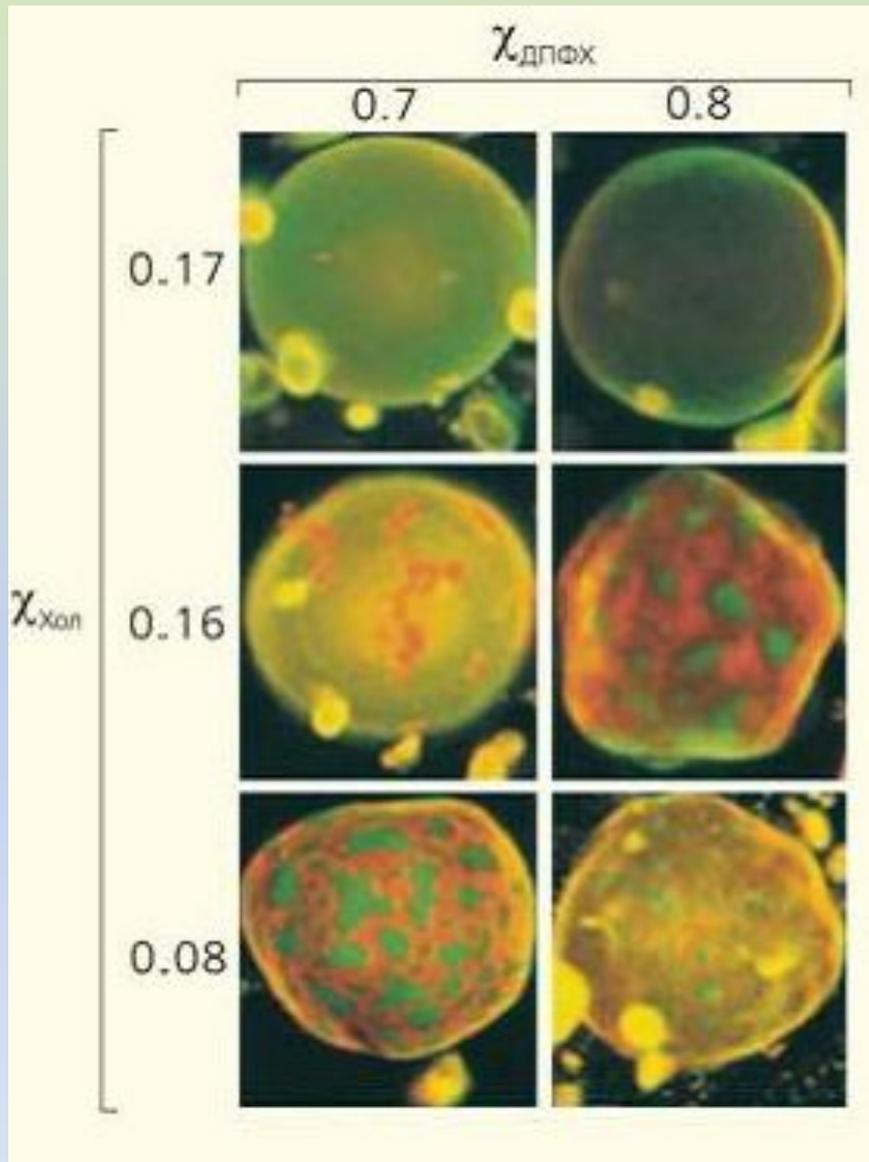
Перед приготовлением липосом к фосфолипидам было добавлено разное количество холестерина; его содержание в молярных процентах указано у кривых.

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

ИЗМЕНЕНИЕ УПАКОВКИ БИСЛОЯ ПРИ
ТЕРМОИНДУЦИРОВАННОМ ФАЗОВОМ ПЕРЕХОДЕ
(от А к Б) и ПРИ ВСТРАИВАНИИ В БИСЛОЙ МОЛЕКУЛ
ХОЛЕСТЕРИНА (от Б к В)



Указана толщина бислоя в ангстремах и площадь сечения, занимаемая каждой молекулой фосфолипида.

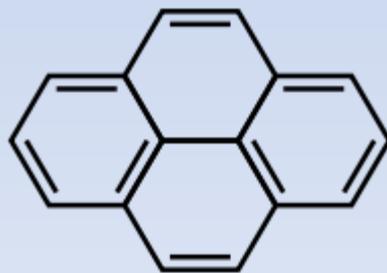


Гигантские везикулы, состоящих из насыщенного (ДПФХ) и ненасыщенного (ДОФХ) фосфолипидов, а также холестерина. Образующиеся в везикулах макроскопические мембранные домены окрашиваются флуоресцентными красителями, «предпочитающими» упорядоченную (оранжевый цвет) или неупорядоченную (зеленый) фазу. При увеличении концентрации (χ) холестерина сверх 16% макроскопические домены уже не видны, но разделение L_{σ}/L_d продолжает существовать, о чем говорит низкий сигнал флуоресцентро-резонансного переноса энергии (FRET) между молекулами красителя разных типов, находящихся в разных доменах (примерное положение двух верхних микрофотографий везикул обозначено справа желтым кругом).

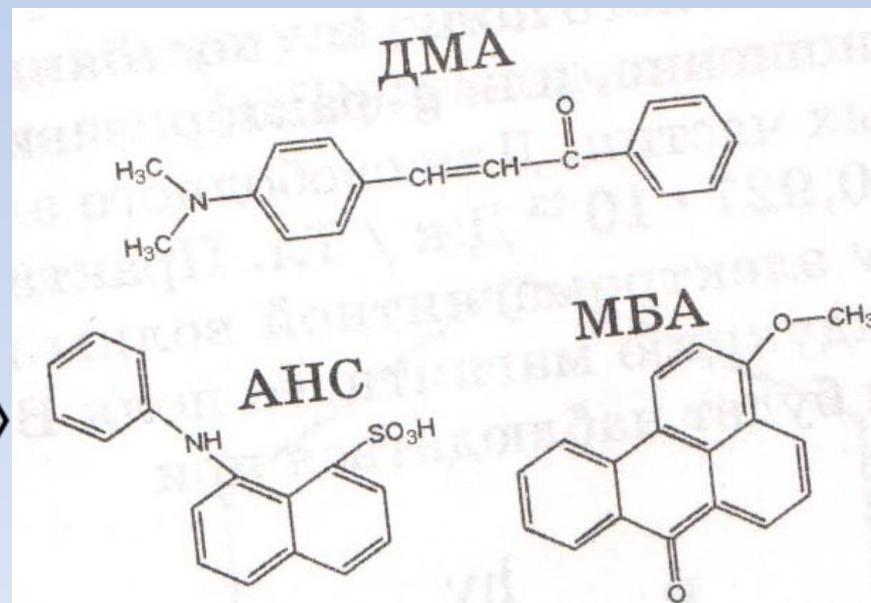
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДАЕТ ВОЗМОЖНОСТЬ
ИССЛЕДОВАТЬ ПОДВИЖНОСТЬ ФОСФОЛИПИДОВ В
МЕМБРАНЕ, ОЦЕНИТЬ МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАН

ПРИМЕРЫ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
ЗОНДОВ



пирен



Измерение флуоресценции зондов

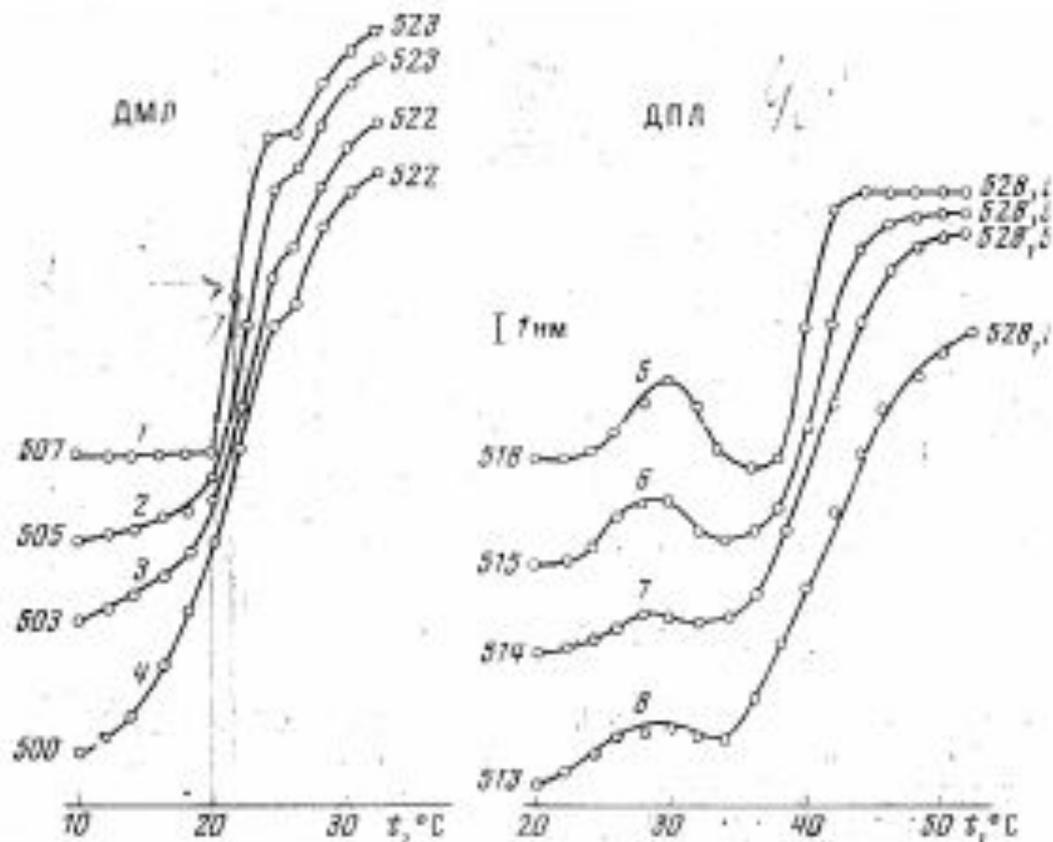


Рис. 8.26. Кривые плавления, измеренные с помощью флуоресцентного зонда МБА.

Цифры слева от кривых обозначают исходное положение максимума флуоресценции, справа — конечное. В этом опыте липосомы были сформированы из ДМЛ (слева) и ДПЛ (справа).

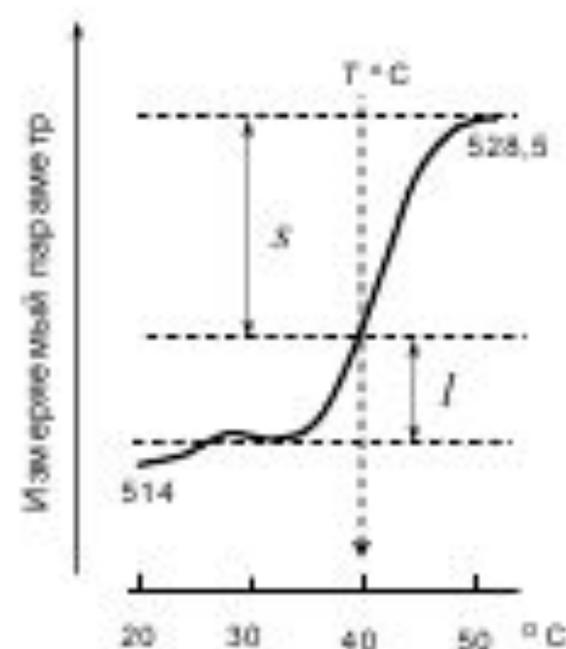


Рис. 8.30. Способ расчета кривых плавления по экспериментальным данным. Для расчета взята одна из кривых на рисунке 8.26). Отношение величин l/s показывает соотношение жидкой и твердой фаз в системе.

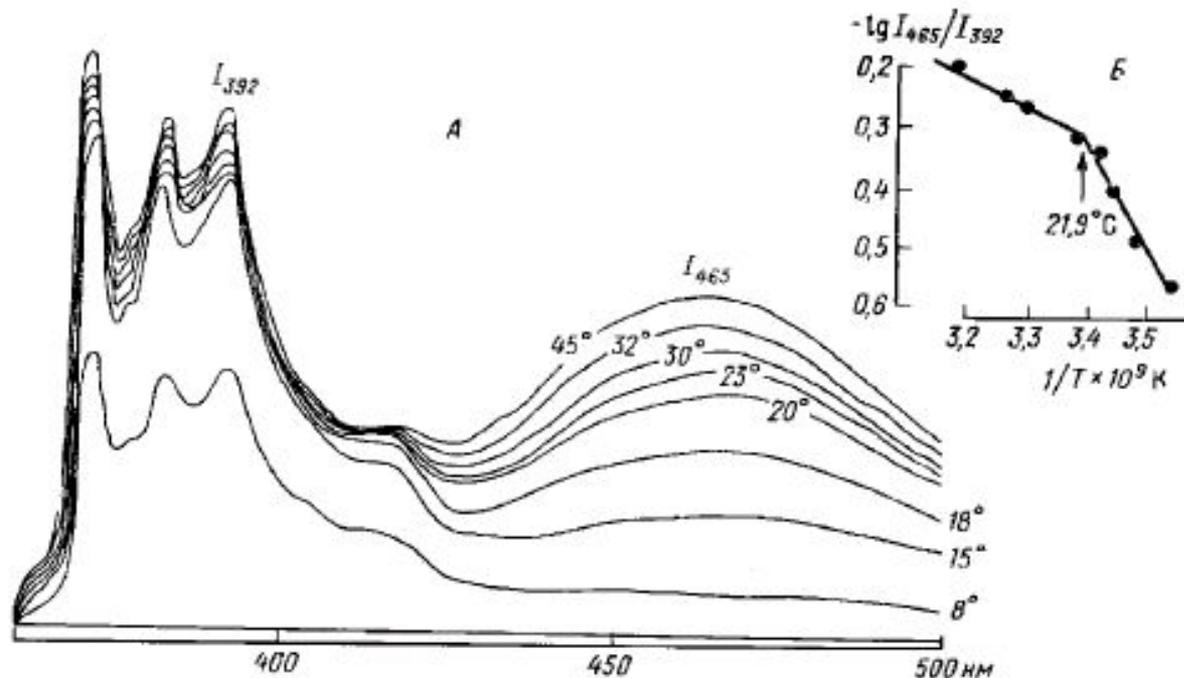
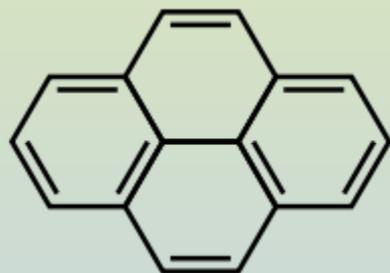
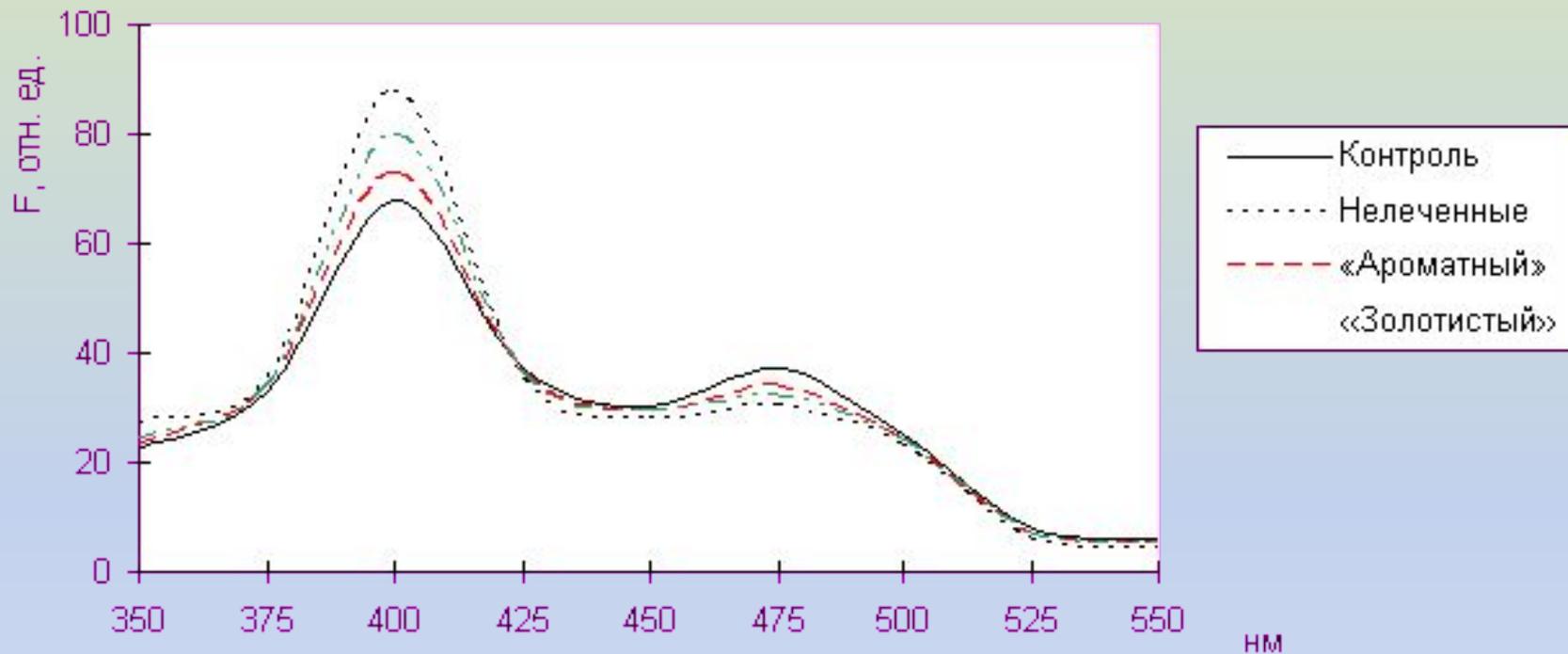


Рис. 39. Спектры флуоресценции пирена в мембранах микросом почек при разных температурах с указанием максимума флуоресценции мономерной (I_{392}) и эксимерной (I_{465}) форм (А) и график Аррениуса для эксимеризации пирена в исследуемом образце (Б)

Область перегиба на графике соответствует температуре фазового перехода.

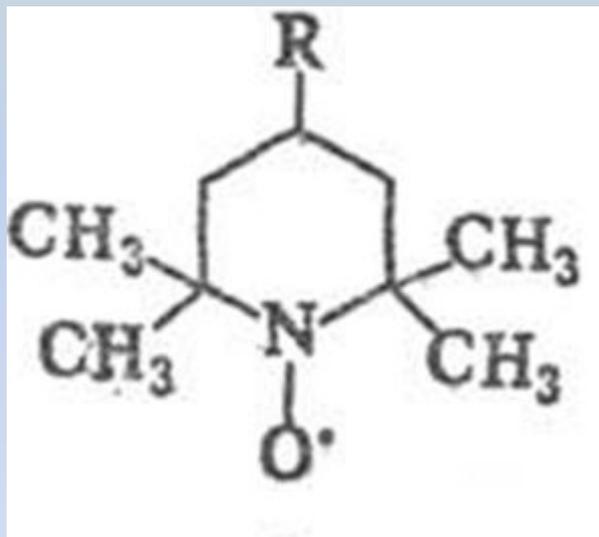


Влияние препаратов на спектры флуоресценции пирена в мембранах эритроцитов

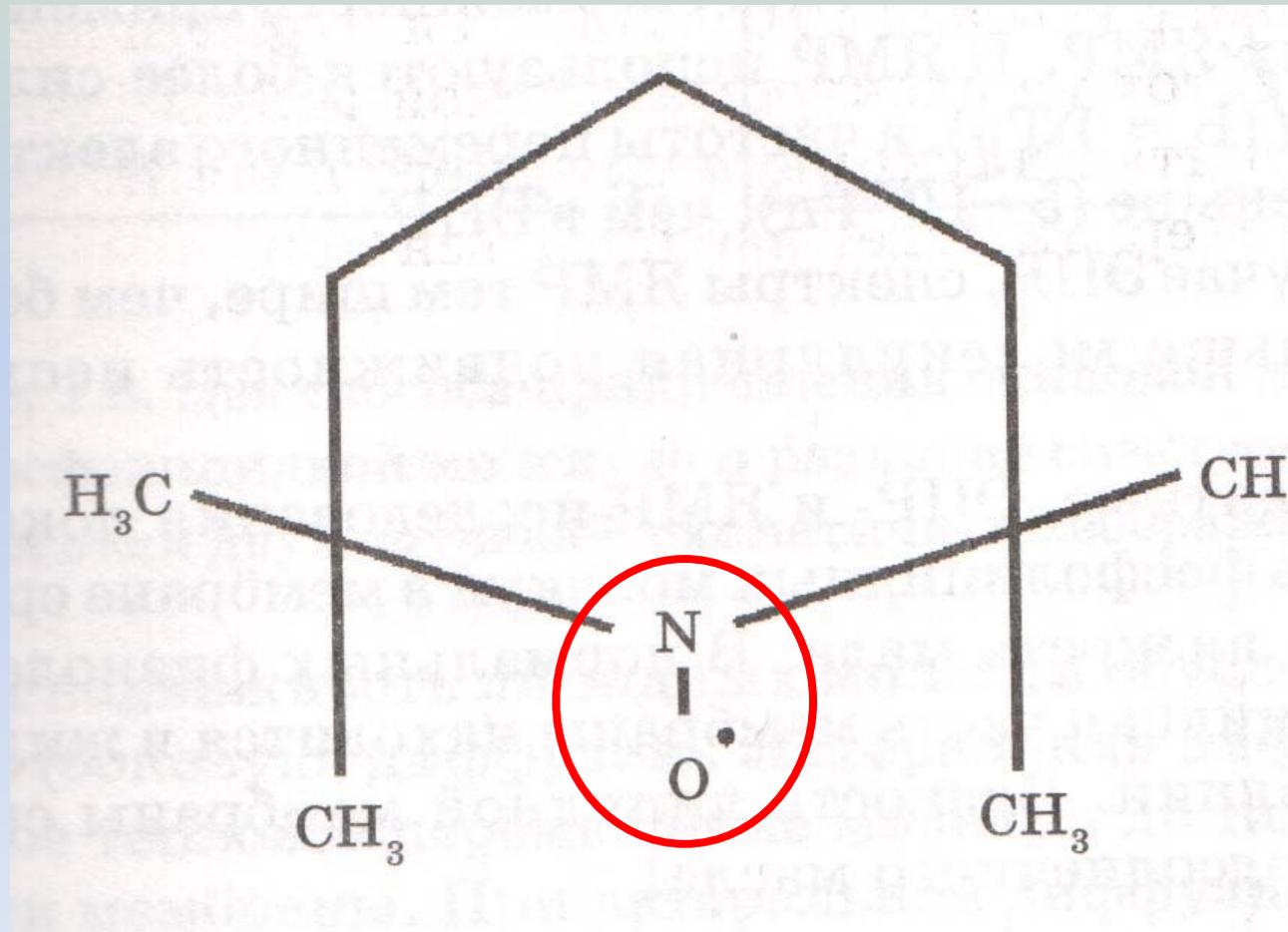
СПИНОВЫЕ ЗОНДЫ

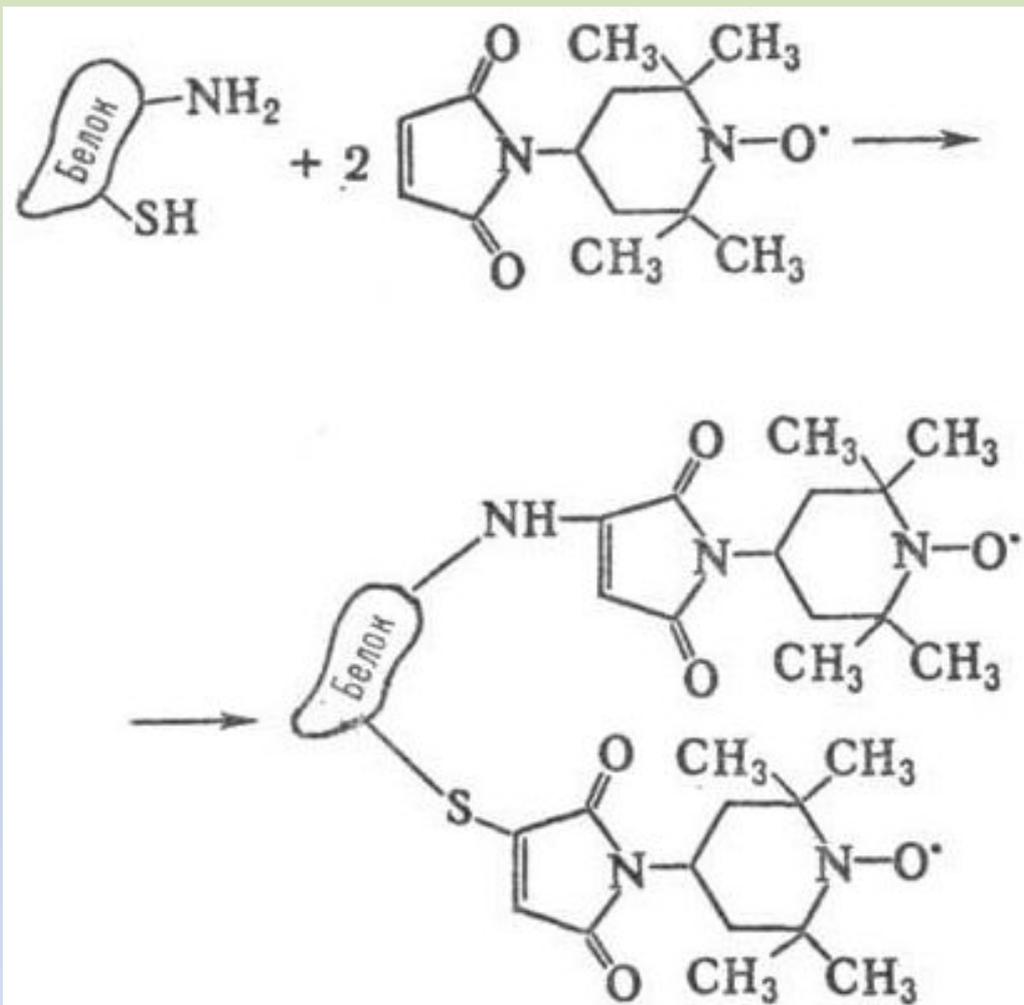
НИТРОКСИЛЬНЫЕ РАДИКАЛЫ

- устойчивы в широком интервале температур (до 100-200 °С)
- способны вступать в хим. реакции без потери парамагнитных свойств
- хорошо растворимы в водных и органических средах.

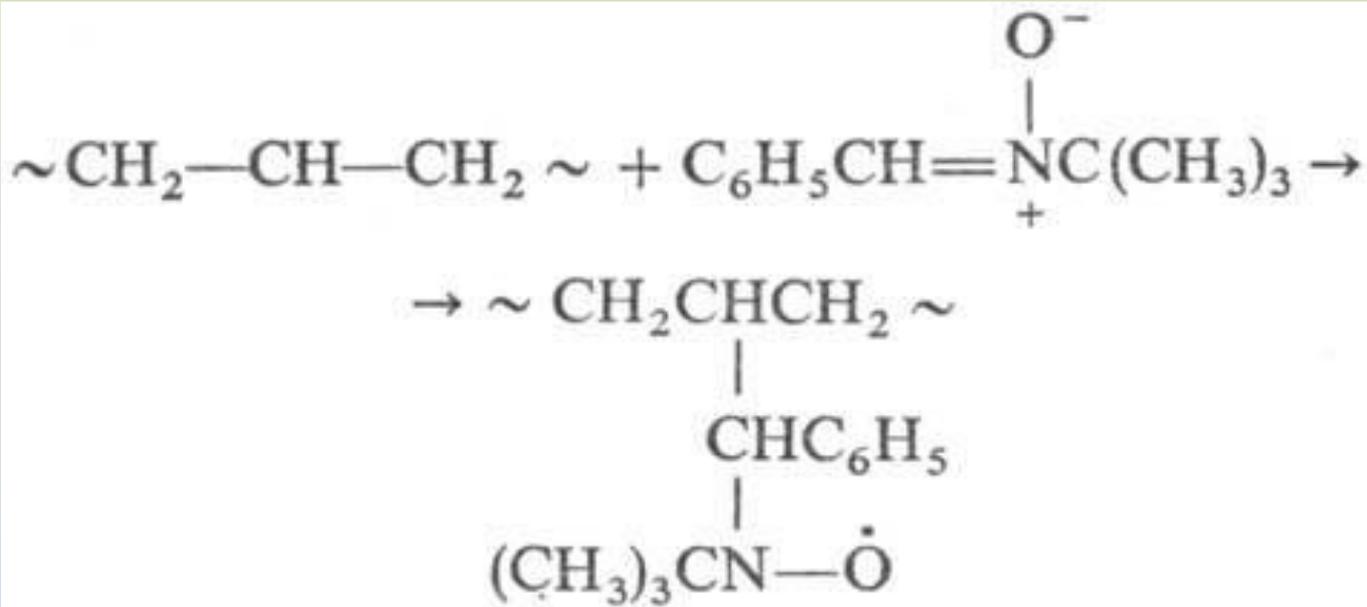


СПИНОВЫЙ ЗОНД ТЕМПО



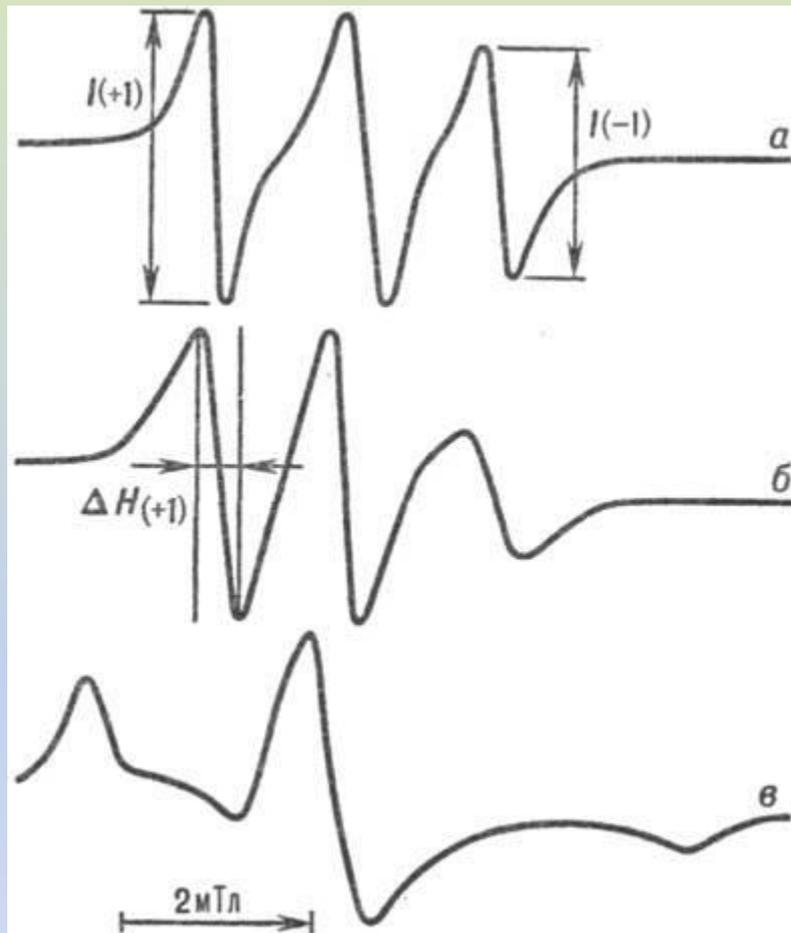


Химическая "прививка" метки к макромолекулам с реакционно способными группами



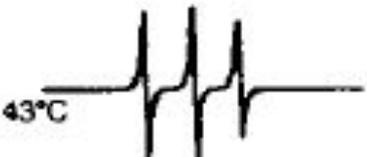
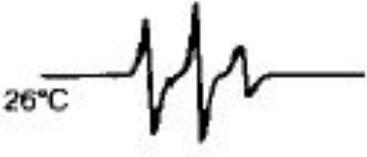
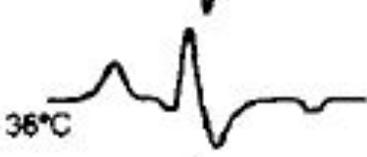
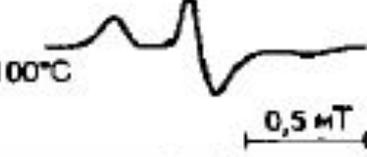
Реакции макромолекул с бирадикалами и спиновыми ловушками.

Спиновая ловушка - соединение, образующее стабильные радикалы при взаимодействии с активными радикалами.



Спектры ЭПР

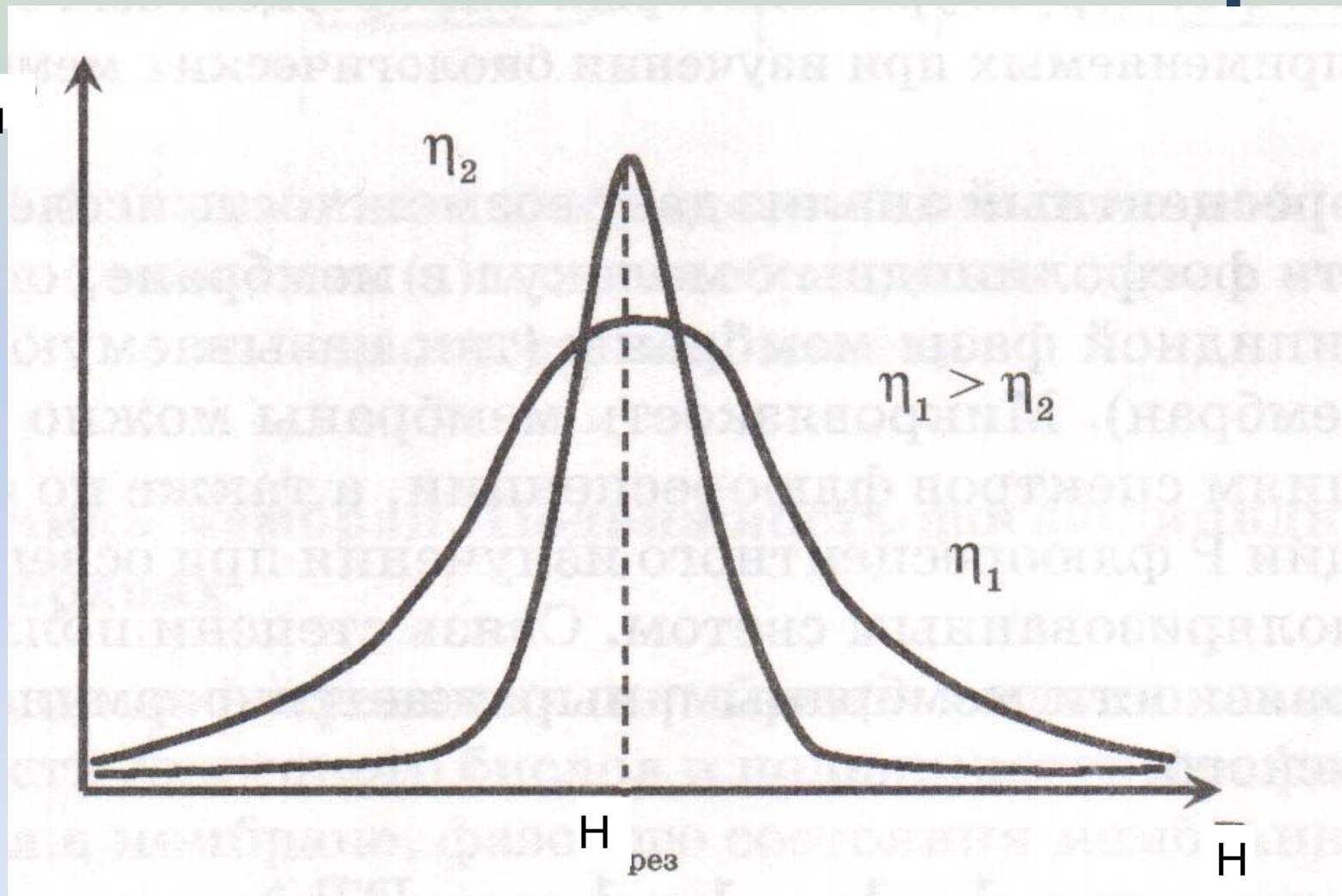
Спектры ЭПР
нитроксильных
радикалов в вязких
средах при временах
корреляции
вращения
 $5 \cdot 10^{-10}$ с (а)
 $2 \cdot 10^{-9}$ с (б)
 $1 \cdot 10^{-7}$ с (в).

Вид сигнала	Характер движения	Характерные времена движения, нс
 43°C	Свободное движение	0,1
 26°C	Слабая иммобилизация	0,6
 9°C	Средняя иммобилизация	2,5
 0°C		5,0
 -36°C	Сильная иммобилизация	~300
 -100°C	Стекло или порошок	>300

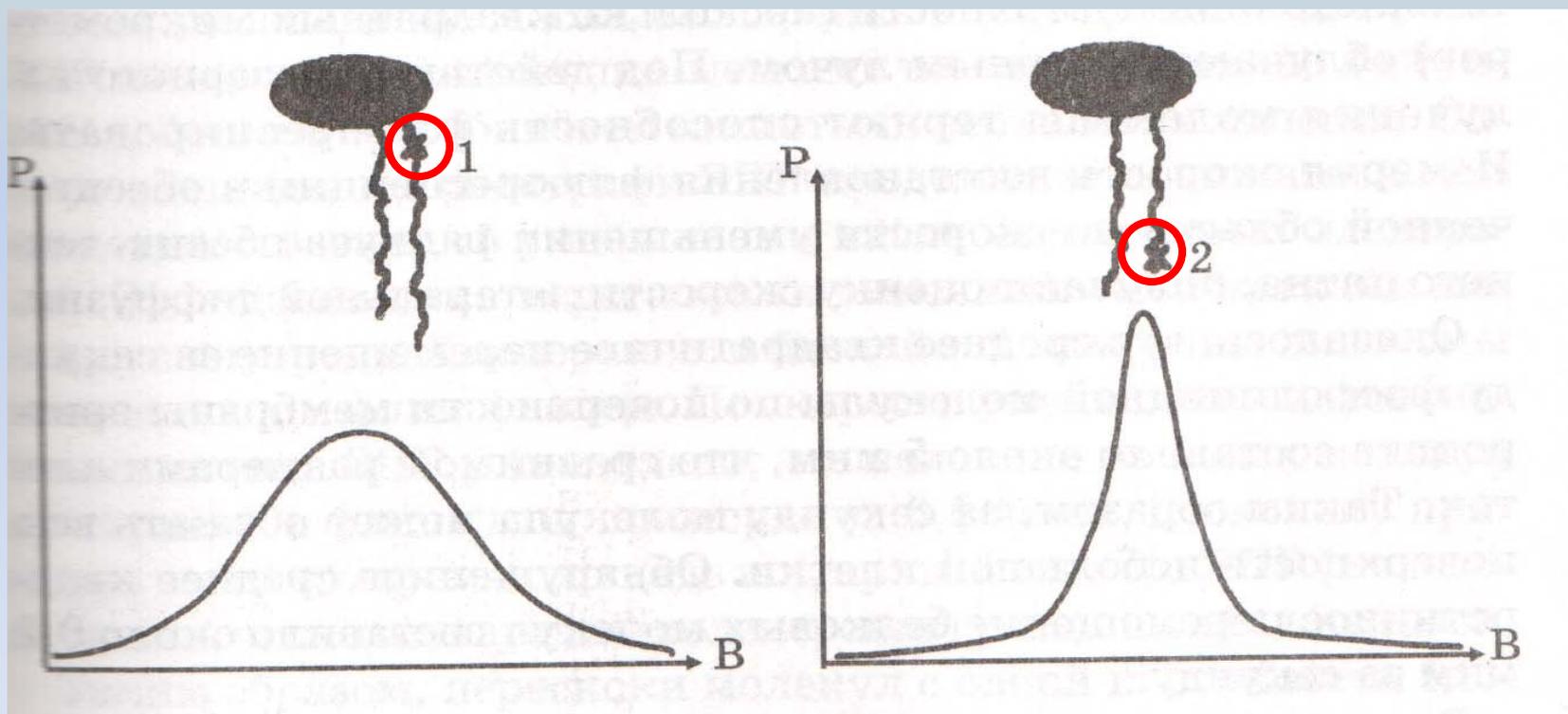
0,5 мТ

Рис. 34. Зависимость ЭПР-спектров нитроксидной спиновой метки от скорости молекулярного вращения

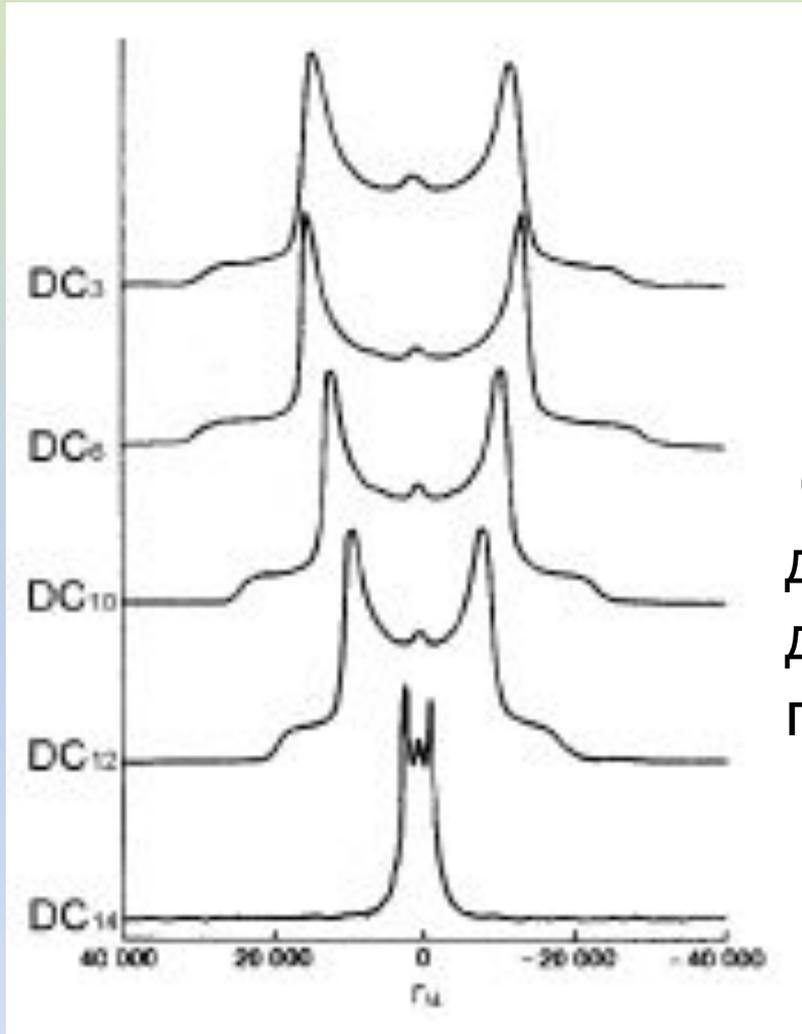
ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ЭПР ПРИ УМЕНЬШЕНИИ МИКРОВЯЗКОСТИ η



ДВА СПОСОБА ПРИКРЕПЛЕНИЯ СПИНОВОЙ МЕТКИ К МОЛЕКУЛЕ ФОСФОЛИПИДА И РАЗЛИЧИЕ СПЕКТРОВ ЭПР



ЯМР



Спектры ^2H -ЯМР
димиристоилфосфатидилхолина,
дейтерированного по разным
положениям ацильной цепи

T_1	Структурная формула фосфолипида	
3,3	CH ₃	CH ₃
1,8	CH ₂	CH ₂
1,1	CH ₂	CH ₂
0,6	(CH ₂) ₁₀	(CH ₂) ₁₀
0,2	CH ₂	CH ₂
0,1	CH ₂	CH ₂
	C=O	C=O
	O	O
0,1	CH ₂ —	CH — CH ₂
		O
		—O—P=O
		O
0,3		CH ₂
0,3		CH ₂
0,7		N(CH ₃) ₃ ⁺

Величины подвижности T_1 для различных атомов углерода в молекуле фосфатидилхолина в составе мембраны при температуре выше критической (рассчитаны по данным ЯМР-спектроскопии)