

Член-корреспондент АН СССР Л. Д. БЕРГЕЛЬСОН, Л. И. БАРСУКОВ,  
Н. И. ДУБРОВИНА, В. Ф. БЫСТРОВ

### ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ВНУТРЕННЕЙ И НАРУЖНОЙ СТОРОНЫ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ Я.М.Р.

До недавнего времени спектроскопия я.м.р. почти не применялась для исследования структуры мембран (1), и только после серии статей Чэпмена с сотрудниками (см., например, (2-4)) внимание исследователей было привлечено к этому методу.

Мы нашли, что использование парамагнитных ионов (таких как  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и др.) значительно расширяет возможности спектроскопии я.м.р. в изучении структуры мембран и дает возможность дифференцировать внутреннюю и наружную поверхность мембраны.

Известно (5), что водные дисперсии лецитина после обработки ультразвуком дают спектр я.м.р. высокого разрешения, в котором наиболее четко выделяются сигналы от протонов групп  $(CH_2)_n$  ( $\Delta\nu_{\%} = 20$  гц) и  $N^+(CH_3)_3$  ( $\Delta\nu_{\%} = 6$  гц) (см. рис. 1а). Было показано (3), что такие озвученные дисперсии содержат в основном частицы размером 250—300 Å, представляющие собой липидные пузырьки с водной фазой внутри. При приготовлении лецитиновой дисперсии\* в 0,001 M водном растворе сульфата марганца с последующей обработкой ультразвуком (прибор УЗДН-1, частота 22 кгц, 10 мин, при 5°) нами был получен золь, спектр я.м.р.\*\* которого имеет определенные особенности (ср. рис. 1а и 1б), обусловленные наличием в водной фазе ионов  $Mn^{2+}$ . Сигналы от  $N^+(CH_3)_3$  и от воды (HDO) сильно уширяются ( $\Delta\nu_{\%} = 120$  и 60 гц, соответственно), тогда как сигнал от  $(CH_2)_n$  практически не изменяется ( $\Delta\nu_{\%} = 30$  гц). Наблюдаемые особенности спектра отвечают существующим представлениям о строении лецитиновых мицелл в воде, согласно которым молекулы лецитина образуют бимолекулярный липидный слой с полярными группами, обращенными в водную фазу, и неполярными цепями, находящимися внутри липидного слоя. Парамагнитные ионы, находящиеся в воде, эффективно контактируют с полярными группами, вызывая обычное для такого взаимодействия уменьшение времени продольной релаксации  $T_2$  близлежащих протонов (8).

При добавлении сульфата марганца к водно-лецитиновой дисперсии после обработки ультразвуком ионы  $Mn^{2+}$  будут находиться лишь во внешнем окружении мицелл. В спектре я.м.р. такого образца (рис. 1б) присутствуют два компонента сигнала от групп  $N^+(CH_3)_3$ : широкий (практически не наблюдаемый) и узкий ( $\Delta\nu_{\%} = 6$  гц) с интегральной интенсивностью приблизительно в 2 раза меньшей, чем в исходном образце (см. рис. 1а). Этот факт указывает на то, что только часть холиновых групп подвержена влиянию ионов  $Mn^{2+}$ . Поскольку сульфат марганца был добавлен «снаружи» мицелл, то наблюдаемый узкий сигнал  $N^+(CH_3)_3$  должен отвечать молекулам лецитина, образующим внутренний слой липидного пузырька. Этот вывод подтверждается тем, что варьирование концентрации

\* Использован яичный лецитин, выделенный по методу (7) и очищенный колоночной хроматографией на окиси алюминия и силикагеле.

\*\* Спектры я.м.р.-H<sup>1</sup> сняты при температуре 30° на спектрометре JEOLCO типа JNM-4H-100 при частоте 100 Мгц. Внешний стандарт гексаметилдисулфоксан. Поправка на разность объемной магнитной восприимчивости не вводилась.



соли, добавляемой снаружи, от 0,003 до 0,01  $M$  практически не влияет на интенсивность и ширину сигнала  $N^+(CH_3)_3$ . Спектры образцов с «наружными» ионами  $Mn^{2+}$  не меняют своих параметров по крайней мере в течение 24 час., но после повторной обработки ультразвуком эти образцы дают спектры (рис. 1*г*), отвечающие нахождению ионов как снаружи, так и внутри мицеллярной полости (ср. с рис. 1*б*).

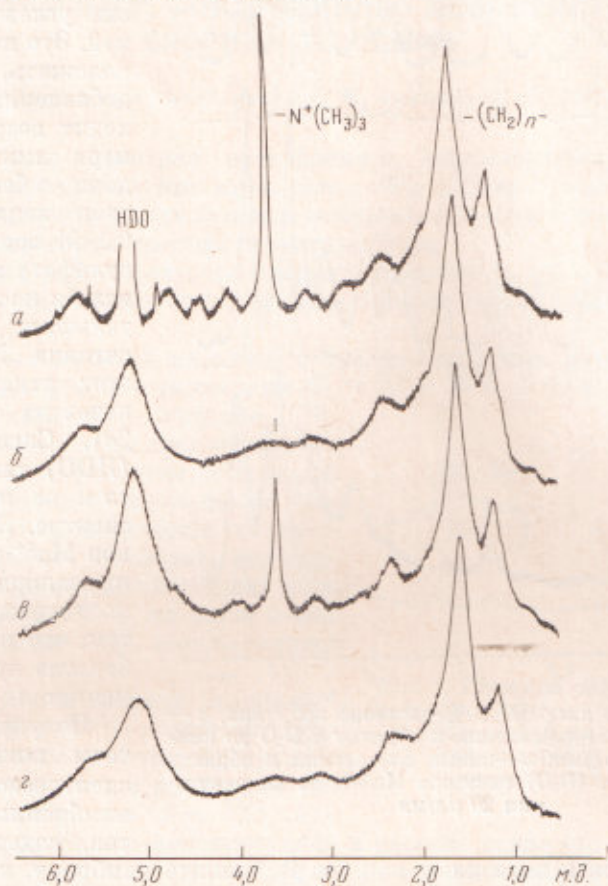


Рис. 1. Спектры я.м.р.-Н<sup>1</sup> 5% дисперсии яичного лецитина, обработанной ультразвуком. *а* — в D<sub>2</sub>O; *б* — в 0,001  $M$  водном (D<sub>2</sub>O) растворе MnSO<sub>4</sub>; *в* — после добавления к образцу *а* MnSO<sub>4</sub> до концентрации 0,001  $M$ ; *г* — после повторной обработки ультразвуком образца *в*

Если в спектре, приведенном на рис. 1*в*, действительно наблюдается сигнал от внутренних холиновых групп, то введение парамагнитного иона только внутрь лецитинового пузырька должно избирательно уширить сигнал от этих групп. Нам удалось продемонстрировать этот эффект на лецитиновых мицеллах, образующихся в присутствии воды в бензольном растворе лецитина и состоящих из мономолекулярного липидного слоя, ограничивающего водную фазу. Оказалось, что 10% раствор лецитина в бензоле способен включить до 5% воды, причем добавление воды сопровождается определенными изменениями в спектре я.м.р. Так, если в спектре бензольного (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) раствора лецитина в отсутствие воды (рис. 2*а*) ширина сигналов  $N^+(CH_3)_3$  и  $(CH_2)_n$  равна 7,4 и 6,4 гц соответственно, то при содержании воды в концентрации 20  $\mu\text{л}/\text{мл}$  (рис. 2*б*) происходит сужение сигнала от  $N^+(CH_3)_3$  до 3,5 гц и уширение метиленового сигнала до 7,8 гц. Эти изменения свидетельствуют о возрастании подвижности холинового



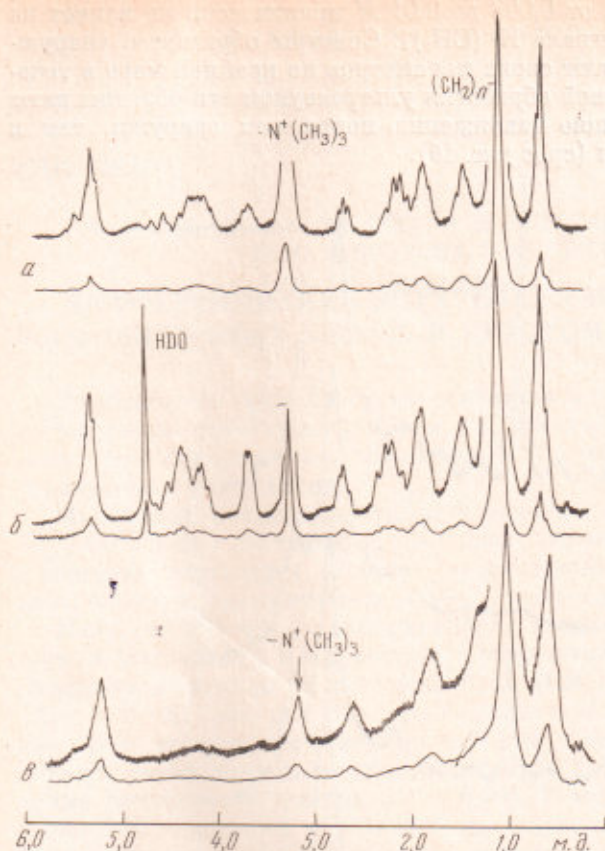


Рис. 2. Спектры я.м.р.-Н<sup>1</sup> 10% раствора лецитина. а — в С<sub>6</sub>Д<sub>6</sub>; б — после добавления к образцу а D<sub>2</sub>O до концентрации 20 мл/мл; в — после добавления к образцу а 0,1 М водного (D<sub>2</sub>O) раствора MnSO<sub>4</sub> до концентрации 20 мл/мл

магнитные ионы, позволяют как бы расчленить мембрану, не нарушая ее целостности, и изучать отдельно как внутреннюю, так и внешнюю сторону мембранных систем. Поэтому можно ожидать, что предлагаемый метод окажется полезным, прежде всего, при изучении структурной асимметрии мембран и даст возможность получить новые сведения, важные для понимания механизма функционирования биологических мембран.

В настоящее время мы применяем указанный метод для исследования модельных и биологических мембран.

Институт химии природных соединений  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
3 VI 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> D. Chapman, The Structure of Lipids, London, 1965. <sup>2</sup> D. Chapman, V. B. Kamat et al., J. Mol. Biol., 31, 101 (1968). <sup>3</sup> T. J. Jenkinson, V. B. Kamat, D. Chapman, Biochim. et biophys. acta, 183, 427 (1969). <sup>4</sup> E. G. Finer, H. Hauser, D. Chapman, Chem. Phys. Lipids, 3, 386 (1969). <sup>5</sup> D. Chapman, S. A. Penkett, Nature, 211, 1304 (1966). <sup>6</sup> C. Huang, Biochemistry, 8, 344 (1969). <sup>7</sup> R. M. Dawson, Biochem. J., 88, 414 (1963). <sup>8</sup> J. F. Hinton, E. S. Amis, Chem. Rev., 67, 367 (1967).

остатка при включении воды внутрь лецитиновых мицелл. Наблюдаемое уширение сигнала  $(CH_2)_n$  указывает на уменьшение подвижности углеводородных цепей. Это позволяет предположить, что по мере добавления воды происходит возрастание размера самих мицелл. Введение в бензольный раствор лецитина 20 мл 0,1 М водного раствора сульфата марганца привело к настолько значительному уширению сигнала  $N^+(CH_3)_3$ , что этот сигнал практически исчез из спектра (рис. 2в). Сигнал от воды (HDO) также уширился и не наблюдается в спектре. Включение ионов  $Mn^{2+}$  только внутрь мицеллярной полости подтверждается еще и тем, что ширина линии бензола при этом не изменяется ( $\Delta\nu_0 = 2,8$  гц).

Полученные результаты показывают, что спектроскопия я.м.р. мембранных препаратов, содержащих пара-