

P14-2003-94

М. А. Киселев

**КОМБИНИРОВАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ
НЕЙТРОННОГО И СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ
ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА СТРУКТУРУ
И СВОЙСТВА ВЕЗИКУЛ
ИЗ ДИПАЛЬМИТОИЛФОСФАТИДИЛХОЛИНА**

Направлено на IV Национальную конференцию по применению рентгеновского, синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования материалов, 17–22 ноября 2003 г., Москва

1. ВВЕДЕНИЕ

Диметилсульфоксид (ДМСО) широко применяется как криопротектор в криобиологии для хранения биологической ткани при низких температурах [1-3]. Обладая высокой проницаемостью через биологические мембраны, ДМСО применяется в медицине и ветеринарии для переноса лекарств через кожный покров [4]. Предлагается также использование ДМСО в интенсивной терапии критических состояний [5]. ДМСО применяется в клеточной биологии как растворитель для лекарств [2]. Способностью ДМСО связывать свободные радикалы объясняется его свойство уменьшать радиационные повреждения в биологической ткани [2]. Две международные конференции были посвящены биологическому действию ДМСО [1]. Широта его практического применения, естественно, вызывает интерес к исследованию на молекулярном уровне влияния водных растворов ДМСО на белки, биологические мембраны и модельные биологические мембраны (фосфолипиды). Влияние ДМСО на свойства модельных биологических мембран представляет интерес как с точки зрения изучения криопротекторных свойств, так и с точки зрения понимания механизмов проникновения молекул ДМСО через биологическую мембрану.

Задача охлаждения биологической ткани без её разрушения кристаллами льда сводится к двум противоречивым требованиям. С одной стороны, необходимо охлаждать систему как можно быстрее, поддерживая воду в переохлажденном состоянии, а с другой стороны, надо, чтобы до начала кристаллизации свободная вода продиффундировала из биологической ткани в окружающий физиологический раствор. При этом оставшаяся в биологическом объекте связанная вода не представляет опасности, так как она не превращается в кристалл, а остается в аморфном состоянии, остекловываясь при температурах жидкого азота. Для удовлетворения этих условий цикл охлаждения разбивается на две быстрые части с остановкой охлаждения между ними. При остановке охлаждения переохлажденная свободная вода должна успеть продиффундировать в физиологический раствор и при дальнейшем охлаждении закристаллизоваться в нем. Мультислойные везикулы фосфолипидов представляют достаточно хорошую

модель для исследования таких процессов (см. рис.1) [6,14], так как, находясь в избытке свободной воды, они содержат внутри себя воду как свободную, так и связанную водородными связями с поверхностью мембраны [7]. На рис. 2 схематично изображено деление воды в межмембранном пространстве на свободную воду, которая обладает свойствами обычной воды в большом объеме, и на воду, связанную с поверхностью мембраны. В свою очередь, связанная вода делится на молекулы, расположенные в области полярных голов мембраны, и на молекулы, находящиеся у мембранной поверхности.

В работе [8] методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), малоугловой рентгеновской дифракции (МУРД) и широкоугловой рентгеновской дифракции (ШУРД) было исследовано влияние ДМСО при малых концентрациях (молярная фракция ДМСО в воде, X_{DMSO} , не превышала 0,13) на три типа фосфолипидов: димиристоил-, дипальмитоил-, дистеароилфосфатидилхолин (ДМРС, ДПФХ, ДСФХ). Было установлено, что при увеличении концентраций ДМСО происходит: уменьшение периода повторяемости мембраны d (например, для ДПФХ с 63,6Å до 60,4Å при $X_{DMSO}=0,11$ и $T=25^{\circ}C$), линейное увеличение температуры главного фазового перехода и предперехода, постепенное их сближение и исчезновение предперехода. Вычисленные из дифракционных экспериментов профили плотности распределения электронов (фурье-профили) демонстрировали при этом увеличение расстояния между максимумами d_{pp} с 41,3Å до 43,5Å (см., к примеру, рис. 5 и 6). ШУРД не выявила влияния ДМСО на упаковку углеводородных хвостов липидных молекул. Исходя из этого было сделано предположение о том, что молекулы ДМСО располагаются около поверхности мембраны и тем самым, за счет атомов серы, эффективно влияют на плотность распределения электронов.

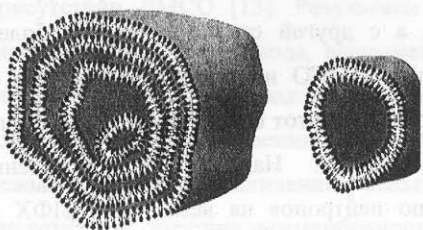


Рис. 1. Сечения мультислойной (слева) и однослойной (справа) везикулы ДПФХ в избытке воды. Мультислойная везикула состоит из бислоев липида, разделенных прослойкой воды. Поверхностью однослойной везикулы является бислой мембрана [6]

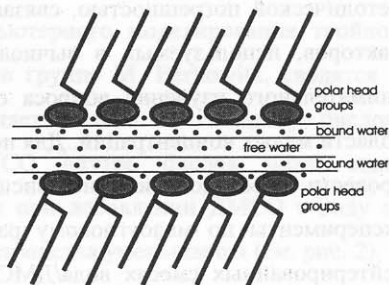


Рис. 2. Схематическое изображение межмембранного пространства мультислойной везикулы в гель-фазе. Углеводородные хвосты наклонены относительно нормали к поверхности мембраны [7]

В работе [9] методом МУРД и ШУРД было исследовано влияние ДМСО на структуру мембран ДПФХ во всем диапазоне концентраций, от $X_{DMSO}=0$ до $X_{DMSO}=1$. Результаты в области малых концентраций хорошо совпадают с результатами, опубликованными в работе [8]. Было обнаружено, что при приближении к $X_{DMSO}=1$ (чистое ДМСО) происходит переход мембраны в фазу со взаимным проникновением углеводородных цепочек из противоположных слоев бислоя (L_{β} – фаза), при этом резко, до $(77 \pm 1)^\circ\text{C}$, увеличивается температура фазового перехода в жидкокристаллическую фазу (см. рис. 3). Из анализа ШУРД было показано, что молекулы ДМСО проникают в область полярных голов при средних и высоких концентрациях. В работе [10] была построена фазовая диаграмма ДПФХ-мембраны для $X_{DMSO} \in [0, 0,2]$. Рассчитанные в работе [10] профили плотности распределения электронов демонстрировали независимость от концентрации ДМСО. Соответственно, был сделан вывод об отсутствии влияния ДМСО на толщину мембраны. Таким образом, фурье-профили, рассчитанные из дифракционных экспериментов группой J. Nagle [10] и P. Quinn [9], находятся в противоречии, которое, с одной стороны, может являться

методической погрешностью, связанной с различным количеством структурных факторов, используемых в вычислениях, а с другой стороны, требует более внимательного изучения вопроса о влиянии ДМСО на толщину мембраны в области малых концентраций. Для поиска ответа на этот вопрос необходимо было провести исследования независимым методом. Нами были проведены эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов на везикулах ДПФХ в дейтерированных смесях вода/ДМСО с $X_{DMSO}=0; 0,05; 0,1$. В рамках точности измерения не было выявлено влияния молекул ДМСО на толщину мембраны [7], что подтверждало корректность расчета фурье-профилей, выполненных в группе J. Nagle [10]. Одновременно P. Quinn провел дополнительные синхротронные эксперименты на фосфатидилэтаноламине – липиде с существенно более низким уровнем гидратации, чем ДПФХ, которые подтвердили корректность его вычислений для ДПФХ [11].

Следующим важным вопросом, требующим проведения исследований, являлось исследование состава воды в межмембранном пространстве при увеличении концентрации ДМСО (см. рис. 2). Три независимыми группами исследователей было установлено уменьшение периода повторяемости мембраны ДПФХ при увеличении концентрации ДМСО [9-11]. В работе [7] комбинацией трех взаимодополняющих методов (рентгеновская дифракция, малоугловое рассеяние нейтронов, калориметрия) было показано, что это уменьшение происходит за счет удаления молекул свободной воды из межмембранного пространства. ДМСО индуцирует дегидратацию межмембранного пространства. Исследования двойных систем ДМСО/вода и тройных систем ДПФХ/ДМСО/вода методом инфракрасной спектроскопии продемонстрировали, что создаваемые ДМСО водородные связи с молекулами воды являются более сильными, чем водородные связи между молекулами ДМСО и полярной областью молекулы ДПФХ [12].

Экспериментальные результаты по влиянию ДМСО на структуру мультислойных мембран ДПФХ, полученные в работах [7-10,12], хорошо согласуются с проведенной симуляцией молекулярной динамики бислоя ДПФХ в

присутствии ДМСО [13]. Результаты компьютерного моделирования тройной системы ДПФХ/ДМСО/вода, выполненного в группе М. Berkowitz, сводятся к следующим утверждениям: ДМСО не влияет сильно на толщину бислоя, вероятность проникновения молекул ДМСО внутрь бислоя мала, силы межмембранного отталкивания уменьшаются при добавлении ДМСО в воду и, как результат, толщина межмембранного пространства уменьшается (см. рис. 2).

Наиболее важные изменения в структуре и свойствах тройной системы ДПФХ/ДМСО/вода происходят в области малых концентраций $0,0 \leq X_{DMSO} \leq 0,3$. В этом интервале концентраций температура главного фазового перехода увеличивается от $(41,7 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ до $(50,6 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, предпереход исчезает, толщина прослойки растворителя d_w в межмембранном пространстве уменьшается от $(14,4 \pm 1,8)\text{Å}$ при $X_{DMSO} = 0,0$ до $(7,8 \pm 1,8)\text{Å}$ при $X_{DMSO} = 0,1$ [7,9]. Уменьшение величины d_w (ДМСО индуцированная дегидратация) соответствует уменьшению числа молекул свободной воды в межмембранном пространстве: так что при $X_{DMSO} = 0,14$ только $(1,1 \pm 0,4)$ молекул свободной воды на молекулу ДПФХ существует в межмембранном пространстве [7].

На рис. 3 представлены зависимости температуры главного фазового перехода и периода повторяемости мембраны ДПФХ при 20°C от содержания мольной фракции ДМСО в воде X_{DMSO} [7]. Как видно из рис. 3, уменьшение периода повторяемости мембраны в области малых концентраций практически заканчивается при $X_{DMSO} = 0,2$. Эта область представляет интерес для более детальных структурных исследований по причине расхождения в фурье-профилях мембраны, вычисленных в работах [8-10].

Данная работа посвящена новым результатам, полученным методом рентгеновской дифракции и малоуглового рассеяния нейтронов при изучении тройной системы ДПФХ/ДМСО/вода в области концентраций криопротектора $X_{DMSO} \leq 0,2$, а также сравнению возможностей рентгеновского и нейтронного малоуглового рассеяния на везикулах.

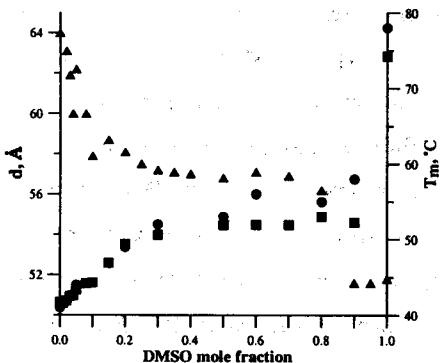


Рис. 3. Зависимость периода повторяемости мембраны d , ▲ и температуры главного фазового перехода T_m от X_{DMSO} . T_m определенная из ДСК, ■ и T_m , определенная из МУРД, ● [7]

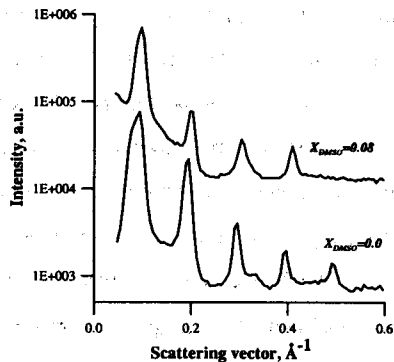


Рис. 4. Рентгеновские дифракционные спектры, записанные при 20°C , от мультислойной структуры ДПФХ при нулевой концентрации ДМСО и $X_{DMSO} = 0,08$

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), диметилсульфоксид (ДМСО) были приобретены в компаниях "Sigma" и "Aldrich" (Париж) соответственно. H_2O (18 МОм-см) производилась на установке "Millipore", D_2O приобретено в объединении "Изотоп" (Санкт-Петербург). Для дифракционных экспериментов на синхротроне мультислойные везикулы из ДПФХ с различной концентрацией ДМСО в H_2O готовились в кварцевых капиллярах, как детально описано в работе [7]. Однослойные везикулы из ДПФХ для экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов приготавливались в дейтерированном ДМСО и воде, как детально описано в работе [12]. Эксперименты по малоугловой дифракции рентгеновских лучей на мультислойных везикулах были выполнены в LURE, Orsay, Франция, на малоугловом спектрометре D24 синхротронного источника DCI [16]. Эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов на однослойных везикулах из ДПФХ были выполнены на малоугловом спектрометре ЮМО импульсного реактора ИБР-2, Дубна, [17].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 4 представлены дифракционные спектры, полученные при рассеянии рентгеновских лучей на мультислойных везикулах ДПФХ с $X_{DMSO} = 0$ и 0,08. Важно отметить, что с увеличением концентрации ДМСО количество дифракционных максимумов уменьшается с 5 до 4, что уменьшает точность вычисления плотности распределения электронов $\rho(x)$ в направлении, перпендикулярном плоскости бислоя. После вычитания фона модуль структурного фактора F_i вычисляется по значению амплитуды I_i дифракционного пика порядка i как

$$|F_i| = i \cdot \sqrt{I_i}. \quad (1)$$

Знак структурного фактора F_i определялся в соответствии с процедурой, детально описанной в работах [8-10]. Величина $\rho(x)$ получается при фурье-преобразовании структурных факторов F_i в соответствии с выражением

$$\rho(x) = \sum_{i=0}^n F_i \cdot \cos(2\pi \cdot i \cdot x / d), \quad (2)$$

где n – количество измеренных дифракционных пиков.

На рис. 5 и 6 представлены профили распределения плотности электронов в мембране ДПФХ (фурье-профили) для $X_{DMSO} = 0; 0,05; 0,08; 0,10$. Фурье-профили отражают структуру мембраны в направлении нормали к её поверхности, за начало отсчета принят центр бислоя. Максимумы в районе 20–22Å соответствуют положению фосфора в полярной голове молекулы ДПФХ. Расстояние между этими максимумами d_{pp} характеризует толщину мембраны. Измеренные по фурье-профилям значения d_{pp} представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, увеличение d_{pp} на $(2,8 \pm 0,8)\text{Å}$ происходит при $X_{DMSO} = 0,05$. При $X_{DMSO} = 0,08$ величина d_{pp} достигает максимума и затем при $X_{DMSO} = 0,01$ происходит её уменьшение. Важно заметить, что увеличение концентрации ДМСО сопровождается монотонным увеличением амплитуды пика, что соответствует увеличению плотности электронов в области полярных голов (см. рис. 5, 6).

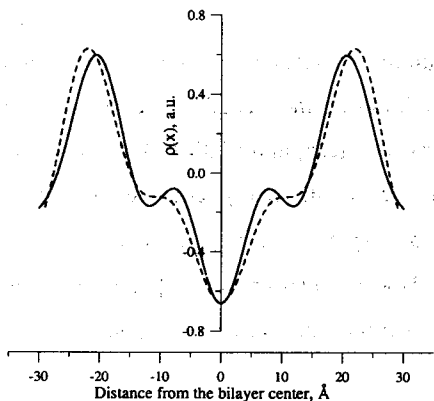


Рис. 5. Распределение плотности электронов в направлении нормали к бислою для $X_{DMSO} = 0$ (сплошная кривая) и $X_{DMSO} = 0,05$ (пунктирная кривая)

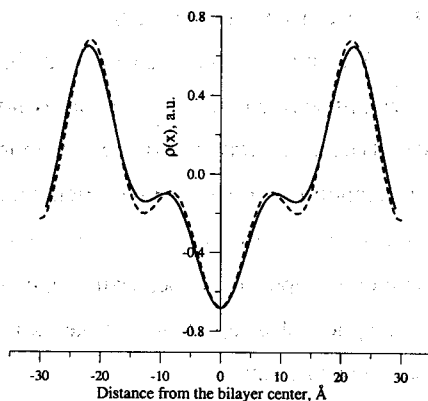


Рис. 6. Распределение плотности электронов в направлении нормали к бислою для $X_{DMSO} = 0,08$ (сплошная кривая) и $X_{DMSO} = 0,10$ (пунктирная кривая)

Таблица 1. Зависимость расстояния между максимумами d_{pp} в плотности распределения электронов мембраны ДПФХ при $T=20^\circ\text{C}$ от мольной фракции ДМСО в растворе, X_{DMSO}

X_{DMSO}	0,00	0,05	0,08	0,10
$d_{pp}, \text{Å}$	$41,2 \pm 0,4$	$44,0 \pm 0,4$	$44,8 \pm 0,4$	$43,6 \pm 0,4$

Отсюда можно сделать вывод, что при увеличении концентрации ДМСО в образце происходит увеличение концентрации ДМСО в или около полярной головы мембраны. Наши результаты по вычислению фурье-профилей хорошо совпадают с результатами, опубликованными группой Р. Quinn в работе [8]: $d_{pp}=41,3\text{Å}$ для $X_{DMSO} = 0,0$ и $d_{pp}=43,5\text{Å}$ для $X_{DMSO} = 0,11$, но носят более систематический характер: так как нами были проведены расчеты фурье-профилей также и для $X_{DMSO} = 0,05$ и $0,08$.

Существует три причины, по которым величина d_{pp} может увеличиваться. Первая – изменение толщины мембраны при проникновении молекул ДМСО в область полярных голов и вызванное этим изменение угла наклона

углеводородных хвостов относительно нормали к бислою (см. рис. 2) с 27 градусов при $X_{DMSO} = 0,0$ до 19 градусов при $X_{DMSO} = 0,1$. Такое изменение угла наклона должно приводить к изменению дифракции от углеводородных хвостов, чего в экспериментах P.Quinn зарегистрировано не было. Спектры ШУРД от углеводородных хвостов для $X_{DMSO} = 0,0$ и $0,11$ полностью совпадают [8]. Вторая возможность увеличения d_{pp} – изменение угла наклона полярной головы липида (увеличение толщины полярной области) при проникновении в неё молекулы ДМСО без изменения (или малого изменения) угла наклона углеводородных хвостов. Третья возможность увеличения d_{pp} – деформация фурье-профиля за счет расположения атома серы рядом с поверхностью мембраны при локализации молекулы ДМСО на поверхности мембраны без проникновения группы SO внутрь бислоя. Такая гипотеза была высказана в работах [8,9].

Представленные результаты синхротронных экспериментов говорят о том, что начиная с $X_{DMSO} = 0,1$ взаимодействие ДМСО и мембраны меняется, что выражается в уменьшении величины d_{pp} . При дальнейшем увеличении концентрации происходит изменение структуры бислоя, так что при $X_{DMSO} = 0,3$ ШУРД соответствует гексагональной упаковке углеводородных хвостов [9]. При $X_{DMSO} \geq 0,1$ наступает область концентраций, где мембрана ДПФХ не имеет предперехода и существует прямой фазовый переход из гель-фазы в жидкокристаллическую фазу за счет плавления углеводородных хвостов (цик-конфигурация жирнокислотного остатка переходит в гош-конфигурацию) [7,8]. При этом фазовый переход из гель- в жидкокристаллическую фазу имеет область сосуществования двух фаз и гистерезис. На рис.7 показана зависимость периода повторяемости мембраны от температуры для $X_{DMSO} = 0,2$. Сосуществование состояний с различной величиной d при фазовом переходе может быть объяснено тем, что ДМСО развивает доменную структуру мембраны, локализуясь на границах доменов, которые являются дефектами в структуре мембраны. Наличие гистерезиса при нагревании и охлаждении говорит о том, что молекулы ДМСО локализованные в мембране, выходят в межмембранное пространство при

плавлении углеводородных цепей. Предположение о том, что ДМСО развивает границы доменов и соответственно дефектов в структуре мембраны, может являться основанием известного свойства ДМСО – легко проникать через мембрану.

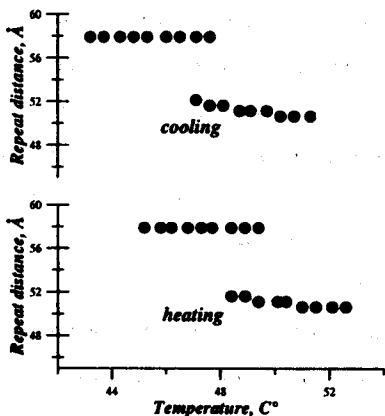


Рис. 7. Зависимость периода повторяемости мембраны ДПФХ при нагревании и охлаждении при $X_{DMSO} = 0,2$. Скорость изменения температуры $1^\circ\text{C}/\text{мин}$. Время набора спектра 1 мин

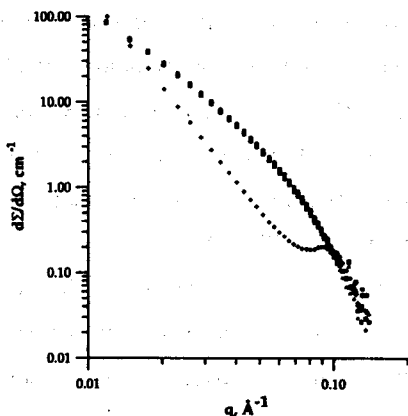


Рис. 8. Спектры малоуглового рассеяния для везикул, экструдированных через фильтры с диаметром пор 2000Å для $X_{DMSO} = 0,0$ (●), $0,05$ (■), $0,10$ (▲), $0,20$ (+). Измерения проведены при $T=20^\circ\text{C}$

Малоугловое рассеяние нейтронов на однослойных везикулах являлось вторым методом, используемым нами при исследовании вопроса о влиянии ДМСО на толщину мембраны в области малых концентраций. Этим наши исследования отличались от работ, выполненных в группах P.Quinn (Division of Life Science, King's College London) и J. Nagle (Department of Physics, Carnegie Mellon University), основанных на дифракции рентгеновских лучей на мультислойных везикулах. Целью этих экспериментов являлось проведение независимых измерений толщины бислоя от концентрации ДМСО. В случае применения нейтронов положение атомов серы около мембранной поверхности не может приводить к методическим погрешностям эксперимента. Использовались везикулы, приготовленные экструзией через поры диаметром

2000Å и 500Å. Для 2000Å экструдированных везикул толщина мембраны определялась в приближении Гинье, как описано в работе [7]. Как видно на рис. 8, спектры малоуглового рассеяния для $X_{DMSO} = 0; 0,05; 0,10$ практически совпадают. Численный расчет толщины мембраны d_l дает следующий результат: $d_l = (49,6 \pm 1,0) \text{Å}$ для $X_{DMSO} = 0$; $d_l = (49,2 \pm 1,0) \text{Å}$ для $X_{DMSO} = 0,05$; $d_l = (50,1 \pm 1,0) \text{Å}$ для $X_{DMSO} = 0,10$. Несмотря на тенденцию к увеличению толщины мембраны, в рамках точности эксперимента, величина d_l не меняется [7]. При $X_{DMSO} = 0,2$ спектр малоуглового рассеяния существенно меняется, появляется дифракционный пик в области больших значений вектора рассеяния q , что соответствует формированию многослойных везикул с периодом повторяемости $(62,4 \pm 2) \text{Å}$, что хорошо совпадает с величиной d , определенной в синхротронных экспериментах (см. рис. 3). Нейтронный эксперимент был повторен на везикулах, приготовленных экструзией через поры диаметром 500Å. Такие везикулы отличаются большей стабильностью к агрегации в многослойные, что дало возможность промерить кривую рассеяния от однослойных везикул с $X_{DMSO} = 0,15$. Полученные спектры когерентного малоуглового рассеяния и модельные кривые представлены на рис. 9. Для увеличения точности вычислений измеренные спектры были скорректированы на некогерентное рассеяние от водорода по методике, описанной в [18]. Модельные кривые рассчитывались по модели полый сферы с гауссовым распределением везикул по размерам [19]. Полидисперсность системы P характеризовалась как $P = 1,18 \cdot \frac{\sigma}{\bar{R}}$, где \bar{R} - среднее значение внешнего радиуса везикулы, а σ - среднеквадратичное отклонение радиуса. Результаты расчетов по модели полый сферы представлены в табл. 2.

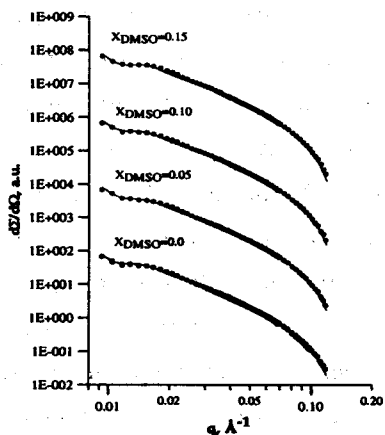


Рис. 9. Спектры малоуглового рассеяния для везикул, экстрадированных через фильтры с диаметром пор 500\AA для $X_{DMSO} = 0,0; 0,05; 0,10; 0,15$. Измерения проведены при $T=20^\circ\text{C}$. Для наглядности спектры раздвинуты вдоль оси ординат

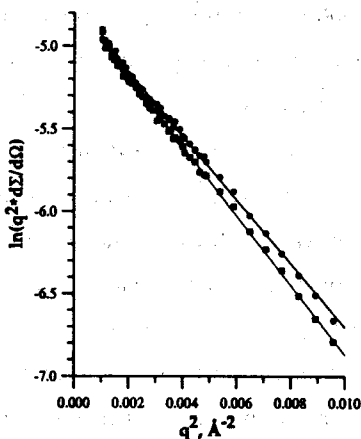


Рис. 10. График Кратки-Порода для спектров малоуглового рассеяния от везикул с $X_{DMSO} = 0,0$ (●) и $X_{DMSO} = 0,15$ (■).

Таблица 2. Зависимость параметров однослойной везикулы ДПФХ от концентрации ДМСО при $T=20^\circ\text{C}$. \bar{R} – средний радиус везикулы, P – полидисперсность, d_1 – толщина бислоя мембраны

X_{DMSO}	0,0	0,05	0,10	0,15
$\bar{R}, \text{\AA}$	263 ± 3	250 ± 3	258 ± 3	264 ± 3
$P, \%$	32	33	32	30
$d_1, \text{\AA}$	$44,5 \pm 0,5$	$45,0 \pm 0,5$	$45,5 \pm 0,5$	$46,0 \pm 0,5$

Как видно из табл. 2, полидисперсность системы не зависит от концентрации ДМСО и характеризуется средней величиной 32%, радиус везикул в пределах этой величины полидисперсности не меняется, толщина мембраны монотонно увеличивается, изменяясь на величину $(1,5 \pm 1,0)\text{\AA}$ при $X_{DMSO} = 0,15$.

Сравнение результата вычисления толщины мембраны в гинье-приближении и по модели полый сферы, сделанное в работе [19], говорит о том, что гинье-приближение дает более реалистическое значение толщины мембраны. Поэтому спектры для 500\AA экстрадированных везикул были дополнительно

проанализированы в гинье-приближении. Графики Кратки-Порода представлены на рис. 10 для двух крайних случаев: $X_{DMSO} = 0,0$ и $X_{DMSO} = 0,15$. Толщина мембраны в гинье-приближении вычисляется по углу наклона прямой на графике Кратки-Порода [20]. Результаты вычислений толщины мембраны представлены в табл. 3

Таблица 3. Зависимость толщины бислоя d_l мембраны ДПФХ от концентрации ДМСО при $T=20^\circ\text{C}$, рассчитанной в гинье-приближении для 500\AA экструдированных везикул

X_{DMSO}	0,0	0,05	0,10	0,15
$d_l, \text{\AA}$	$48,1 \pm 0,9$	$49,5 \pm 1,0$	$50,4 \pm 1,0$	$50,3 \pm 1,0$

Как видно из табл. 1, толщина мембраны увеличивается на величину $(1,4 \pm 1,9)\text{\AA}$ при увеличении концентрации ДМСО до $X_{DMSO} = 0,05$. Соответствующая величина d_{pp} увеличивается на $(2,8 \pm 0,8)\text{\AA}$ (см. табл. 1). Можно сказать, что при $X_{DMSO} = 0,05$ атом серы локализован главным образом рядом с поверхностью мембраны. При увеличении концентрации ДМСО до $X_{DMSO} = 0,1$ толщина мембраны увеличивается на величину $(2,3 \pm 1,9)\text{\AA}$. При этом величина d_{pp} увеличивается на $(2,4 \pm 0,8)\text{\AA}$ (см. табл. 1). Следовательно, при $X_{DMSO} = 0,1$ атом серы молекулы ДМСО проникает в область полярной головы.

4. Выводы

Комбинацией малоугловой дифракции рентгеновских лучей на мультислойных везикулах и малоуглового рассеяния нейтронов на однослойных везикулах установлено, что:

В области концентраций $0 \leq X_{DMSO} \leq 0,08$ молекула ДМСО расположена главным образом так, что её группа SO находится на поверхности мембраны, не проникая в область полярной головы.

При $X_{DMSO} > 0,08$ группа SO проникает полностью в область полярных голов, вызывая при дальнейшем увеличении концентрации уменьшение угла наклона углеводородных цепей.

В области концентраций $X_{DMSO} \geq 0,2$ молекулы ДМСО развивают дефекты в мембранной поверхности.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Минпромнауки: Госконтракт № 40.012.1.1.1148 и грант Президента РФ «ведущие научные школы» № НИИ-1354. Эксперименты на синхротроне были выполнены при поддержке грантом LURE. Автор выражает благодарность Prof. P. Lesieur (Nancy University, France) и Dr. C. Bourgaux (LURE, Orsay, France) за помощь в проведении измерений на установке D24 синхротронного источника DCI; Prof. M. Ollivon (University Paris-Sud, Chatenay Malabry, France) за любезное предоставление оборудования окружения образца и проф. В.Л. Аксенову за поддержку работы.

Литература:

1. Biological Action of Dimethyl Sulfoxide. Ed. S.W. Jacob and R.Herschler. *Annals of NY Academy of Science* 243 (1975).
2. Z.W. Yu, P. Quinn. Dimethyl Sulphoxide: A Review of Its Application in Cell Biology. *Bioscience Report* 14 (1994) 259-281.
3. T. J. Anchordoguy, C.A. Cecchini, J.H. Crowe, L.M. Crowe. Insight into the Cryoprotective Mechanism of Dimethyl Sulfoxide for Phospholipid Bilayers. *Cryobiology* 28 (1991) 467-471.
4. F. Casali, V. Burgat, P.Guerre. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) properties and permitted uses. *Revue. Med. Vet.* 150 (1999) 207-220.

5. Г.М. Яковлев, А.С. Свистов, М.И. Миронова. Диметилсульфоксид в экспериментальной и клинической медицине. Достижения и перспективы. *Эксперим. и клинич. фармакол.* 55 (1992) 74-76.
6. Ю.В. Овчинников. Биоорганическая химия. Москва, Просвещение, 1987.
7. M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, C. Grabiell-Madelmond, M. Ollivon. DMSO-Induced Dehydration of DPPC Membranes Studied by X-ray Diffraction, Small-Angle Neutron Scattering and Calorimetry. *J. Alloys and Compounds* 286 (1999) 195-202.
8. Z.W. Yu, P.J. Quinn. Phase Stability of Phosphatidylcholines in Dimethylsulfoxide Solutions. *Biophys. J.* 69 (1995) 1456-1463.
9. V.I. Gordeliy, M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.V. Pole, J.Teixeira. Lipid Membrane Structure and Interactions in Dimethyl Sulfoxide/Water Mixtures. *Biophys. J.* 75 (1998), 2343-2351.
10. S.Tristram-Nagle, T. Moore, H.I.Petrache, J.F.Nagle. DMSO Produces a New Subgel Phase in DPPC: DSC and X-ray Diffraction Study. *Biochem&Biophys. Acta* 1369 (1998) 19-33.
11. Z.W. Yu, P.J. Quinn. The Effect of Dimethyl Sulfoxide on the Structure and Phase Behaviour of Palmitoleoylphosphatidylethanolamine. *Biochem&Biophys. Acta* 1509 (2000) 440-450.
12. 4. S.N. Shashkov, M.A. Kiselev, S.N. Tioutiunnikov, A.M. Kisselev, P. Lesieur. The Study of DMSO/Water and DPPC/DMSO/Water System by Means of the X-ray, Neutron Small-Angle Scattering, Calorimetry and IR Spectroscopy. *Physica B* 271 (1999) 184-191.
13. A.M. Smondyrev, M.L. Berkowitz. Molecular Dynamic Simulation of DPPC Bilayer in DMSO. *Biophys. J.* 76 (1999) 2472-2478.
14. M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, M. Olivon. Ice Formation in Model Biological Membranes in the Presence of Cryoprotectors. *Nuclr. Inst&Method*, A 448 (2000) 255-260.
15. R.V. McDaniel, T.J. McIntosh, S.A. Simon. Nonelectolyte substitution for water in phosphatidylcholine bilayers. *Biochem&Biophys. Acta* 731 (1983) 97-108.

16. M.A. Kiselev, P. Lesieur. Application of Small-Angle X-ray Scattering to the Study of Model Biological Membranes at the Synchrotron Source DCI. Proceedings of international workshop "JINR synchrotron radiation source: Prospects of research". *JINR publication Д9-2000-102* (2000) 120-126.
17. Y.M. Ostanevich. Time-of-Flight Small-Angle Scattering Spectrometers on Pulsed Neutron Sources. *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* 15 (1988) 91-103.
18. H. Schmiedel, P. Joerchel, M.Kiselev, G. Klose. Determination of Structural Parameters and Hydration of Unilamellar POPC/C₁₂E₄-Vesicles at high Water Excess from Neutron Scattering Curves Using a Novel Method of Evaluation. *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 111-117.
19. M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, D. Lombardo, M. Killany, S. Lesieur. Sucrose Solutions as Prospective Medium to Study the Vesicle Structure: SAXS and SANS Study. *J. Alloys and Compounds* 328 (2001) 71-76.
20. V.I. Gordeliy, L.V. Golubchikova, A.I. Kuklin, A.G. Strykh, A. Watts. The Study of Single Biological and Model Membranes via Small Angle Neutron Scattering. *Prog. Colloid and Polymer Science* 93 (1993) 252-257.

Получено 20 мая 2003 г.

Киселев М. А.

P14-2003-94

Комбинированное применение нейтронного и синхротронного излучения для исследования влияния диметилсульфоксида на структуру и свойства везикул из дипальмитоилфосфатидилхолина

Диметилсульфоксид (ДМСО) широко применяется в криобиологии, клеточной биологии и радиационной биологии, в ветеринарии и терапии критических состояний. Обладая высокой проницаемостью через биологические мембраны, ДМСО легко проникает через кожный покров. С 1995 по 2000 г. в трех различных биофизических группах Англии, США и России были получены методом дифракции рентгеновских лучей противоречащие результаты по проникновению молекул ДМСО в липидную мембрану.

Целью работы является уточнение ранее полученных результатов за счет комбинированного применения рентгеновской дифракции и малоуглового рассеяния нейтронов. Установлено, что проникновение молекул ДМСО в липидную мембрану зависит от концентрации ДМСО в водном растворе. При мольной фракции ДМСО, большей 0,2, развиваются дефекты в мембранной поверхности.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2003

Перевод автора

Kiselev M. A.

P14-2003-94

Complementary Application of Neutron and Synchrotron Radiation for the Investigation of Dimethyl Sulfoxide Influence on the Dipalmitoylphosphatidylcholine Vesicle Structure and Properties

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is widely used in cryobiology, cell biology, radiation biology, veterinary, and therapy of critical situation. DMSO easily penetrates through biological membranes and skin. From 1995 to 2000 contradictory results about DMSO penetration into the lipid membrane were obtained via X-ray diffraction at three different biophysical groups in Great Britain, USA, and Russia.

The goal of the present work is to determine more exactly the early obtained results via complementary application of X-ray diffraction and neutron small-angle scattering. It was established that DMSO molecule penetration into the lipid membrane depends on the DMSO concentration in water solution. Membrane defects develop above DMSO mole fraction 0.2.

The investigation has been performed at the Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2003

**Редактор *М. И. Зарубина*
Макет *Н. А. Киселевой***

Подписано в печать 04.06.2003.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,0. Уч.-изд. л. 1,2. Тираж 280 экз. Заказ № 53939.

**Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.**

E-mail: publish@pds.jinr.ru

www.jinr.ru/publish/