



PL9800946

Badanie błon modelowych domieszkowanych β -karotenem metodami MRJ.*

J. Jeżowska⁺, T. Kupka^{*}, G. Pasterna^{**}

⁺ Instytut Fizyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

^{*} Instytut Chemii, Uniwersytet Śląski, Katowice

^{**} Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski, Katowice

Wykonano pomiary widm ^{13}C i ^{31}P MRJ błon modelowych DPPC/D₂O i błon modelowych DPPC/D₂O domieszkowanych β -karotenem, o zawartościach domieszki 5, 10, 15, 20 mol%, w różnych temperaturach (od 10 do 50°C).

1 Materiały i metody

Do przygotowania próbek użyto DL, α -dwupalmitynofosfatydylocholinę (DPPC) i β -karoten firmy Sigma. Używano dwukrotnie destylowanej D₂O produkcji IBJ Świerk o stopniu wzbogacenia 99.7%. Błone modelową DPPC/D₂O (60% D₂O w/w) i błony modelowe DPPC/D₂O domieszkowane β -karotenem otrzymano stosując metodę opisaną w pracy [1].

Pomiary widm ^{13}C MRJ wykonano na spektrometrze Bruker AM-400 pracującym przy częstotliwości rezonansowej 100 MHz metodą pojedynczego impulsu o szerokości 4 μs . Długość impulsu $\pi/2$ wynosiła 12.5 μs . Zastosowano szerokopasmowe odsprzęganie protonów sekwencją WALTZ-16 [3]. Jako wzorca zewnętrznego używano TMS.

Pomiary widm ^{31}P MRJ wykonano na spektrometrze Bruker AM-400 pracującym przy częstotliwości rezonansowej 162 MHz metodą echa spinowego. Stosowano cykliczną sekwencję impulsów Hahn z modyfikacją Rance'a Byrda [4, 5]. Długość impulsu $\pi/2$ wynosiła 37 μs , odstęp między impulsów $\pi/2$ a impulsem π wynosił 60 μs . Zastosowano szerokopasmowe odsprzęganie protonów zmienną mocą - 0.5/5W (wysoką moc stosowano od pierwszego impulsu w.cz. do końca akwizycji). Jako wzorca zewnętrznego używano 85% kwasu fosforowego.

*Praca finansowana w ramach Grantu KBN 2 2411 09 02.

2 Wyniki

Stwierdzono, że obecność β -karotenu w błonach modelowych powoduje zmiany w widmach ^{13}C i ^{31}P MRJ, które wskazują na "upłynnianie" błony [1, 2].

Dla zobrazowania zmian szerokości poszczególnych linii w widmie ^{13}C MRJ wprowadzono parametry Δ^T i Δ^β zdefiniowane następująco:

$$\Delta^T = \Delta\nu_{1/2}^o - \Delta\nu_{1/2}^T \quad (1)$$

gdzie: $\Delta\nu_{1/2}^o$, $\Delta\nu_{1/2}^T$ - szerokości połówkowe poszczególnych linii w widmie dla błony modelowej DPPC/D₂O odpowiednio w temperaturze 32°C i w temperaturze wyższej.

$$\Delta^\beta = \Delta\nu_{1/2}^{DPPC} - \Delta\nu_{1/2}^\beta \quad (2)$$

gdzie: $\Delta\nu_{1/2}^{DPPC}$, $\Delta\nu_{1/2}^\beta$ - szerokości połówkowe poszczególnych linii w widmie odpowiednio dla błony modelowej DPPC/D₂O i dla błony domieszkowanej β -karotenem o zawartości domieszki $\beta = 5, 10, 15$ lub 20 mol%, w danej temperaturze.

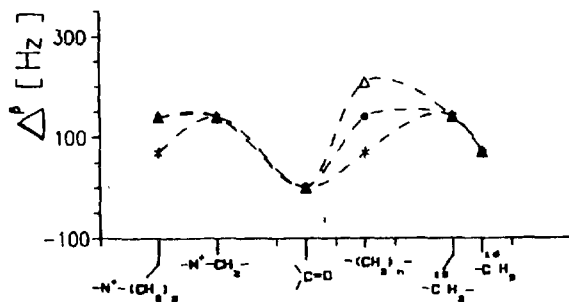
Stwierdzono znaczny wpływ β -karotenu na ruchliwość łańcuchów lipidowych błony w temperaturach niższych od temperatury przejścia fazowego dla DPPC. Szczególnie widoczny jest wpływ domieszki na ruchliwość w błonie w temperaturze 32°C, tzn. poniżej temperatury przedprzejścia fazowego dla DPPC (Rys.1). Obecność β -karotenu w błonie modelowej w tej temperaturze powoduje podobne upłynnianie błony jak wzrost temperatury do 38°C lub wyższej dla błony zbudowanej z czystego DPPC (Rys 2).

W temperaturze wyższej od temperatury przejścia fazowego DPPC wpływ β -karotenu na kształt widma ^{13}C MRJ jest niewielki (Rys. 3).

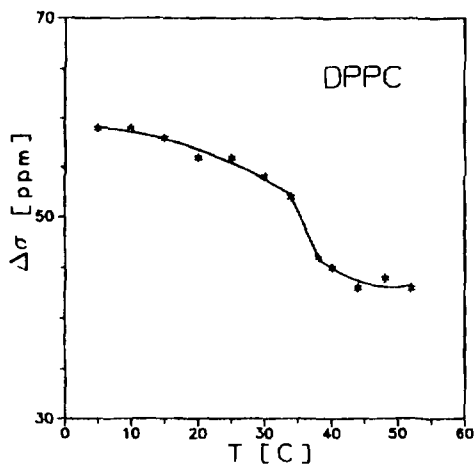
Zmiany w widmach ^{31}P MRJ można ilościowo opisać przez anizotropię przesunięcia chemicznego $\Delta\sigma$ [6]. Dla błon zbudowanych z DPPC wraz ze wzrostem temperatury anizotropia przesunięcia chemicznego maleje, co wskazuje na wzrost swobody ruchów w obrębie głowicy lipidowej (Rys. 4). Powyżej 34°C obserwuje się znaczny wartości $\Delta\sigma$ co może mieć związek z występującym w temperaturze ok. 35°C przedprzejściem $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$. Nie zaobserwowano znaczących zmian wielkości $\Delta\sigma$ dla temperatur bezpośrednio poniżej i powyżej temperatury głównego przejścia fazowego $P_{\beta'} \rightarrow L_a$ (41.5°C), związanego z topnieniem łańcuchów alkilowych, co można wytłumaczyć dużym stopniem niezależności ruchów głowicy fosfolipidowej od ruchów w obrębie łańcuchów lipidowych [7].

Dla błon modelowych domieszkowanych β -karotenem obserwuje się podobie zachowanie się anizotropii przesunięcia chemicznego w funkcji temperatury (Rys. 5, 6), przy czym ze wzrostem stężenia β -karotenu obniża się temperatura przy której następuje znaczny spadek wartości $\Delta\sigma$. Zmiany wielkości $\Delta\sigma$ ze wzrostem zawartości β -karotenu w temperaturze 30°C wskazują na wzrost swobody ruchów w obrębie głowicy lipidowej ze wzrostem zawartości β -karotenu w błonie modelowej (Rys. 7).

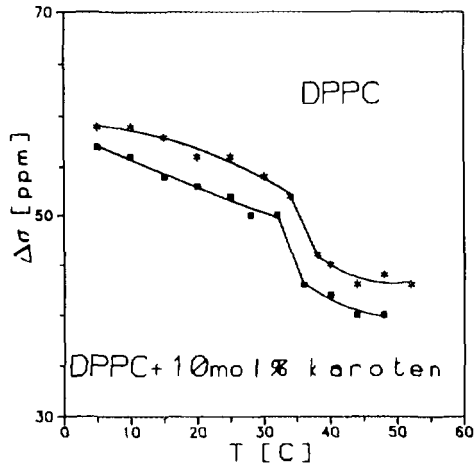
W temperaturze wyższej od temperatury przejścia fazowego DPPC wpływ β -karotenu na płynność błony modelowej jest niewielki.



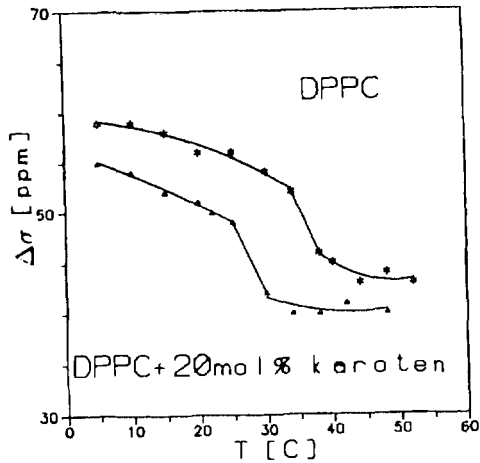
Rys. 3 Zmiany parametru Δ^{β} dla poszczególnych linii w widmie ^{13}C MRJ dla błony modelowej DPPC + β -karotenu + D_2O w temperaturze 38°C dla różnych koncentracji molowych β -karotenu: * - 5mol%, • - 10mol%, Δ - 20mol%.



Rys. 4 $\Delta\sigma$ w funkcji temperatury dla błony modelowej DPPC + D_2O (60% D_2O w/w).



Rys. 5 $\Delta\sigma$ w funkcji temperatury dla błony modelowej DPPC+D₂O oraz dla błony modelowej DPPC+10mol% β -karoten+D₂O .

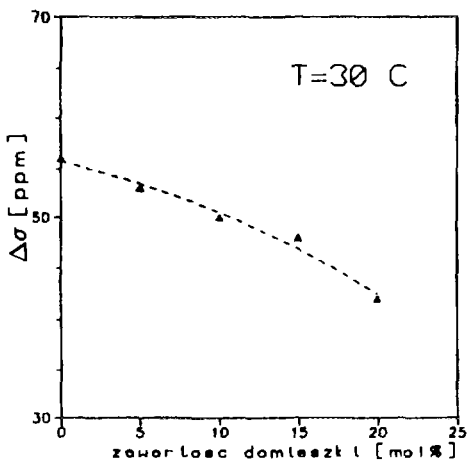


Rys. 6 $\Delta\sigma$ w funkcji temperatury dla błony modelowej DPPC+D₂O oraz dla błony modelowej DPPC+20mol% β -karoten+D₂O .

Wydaje się, iż molekula β -karotenu zabudowuje się w hydrofobowym rejonie dwuwarstwy lipidowej i jej obecność wpływa na swobodę ruchów w obszarze głowicy polarnej bądź to powodując odkształcenia powierzchni podobne do obserwowanych przy przejściu $L_{\beta'}$ \rightarrow $P_{\beta'}$, bądź to zwiększając powierzchnię błony przypadającą na jeden lipid.

Literatura

- [1] I. Jeżowska, A. Wolak i in. Mat. XXIV Ogólnopol. Sem. MRJ, 299-304 (1991).
- [2] I. Jeżowska, A. Wolak i in. Mat. XXV Ogólnopol. Sem. MRJ, 120-125 (1992).
- [3] H.O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun "Carbon-13 NMR Spectroscopy", J. Wiley and Sons, New York 1988.
- [4] M. Rance R.A. Byrd, J. Magn. Reson. **52**, 221 (1983).
- [5] E.L. Hahn, Phys. Rev. **80**, 580 (1950).
- [6] J. Seelig, Biochim. Biophys. Acta **515**, 105 (1978).
- [7] M.P. Milburn, K.R. Jeffrey, Biophys. J. **52**, 791 (1987).



Rys. 7 $\Delta\sigma$ dla różnych zawartości β -karotenu dla błony modelowej DPPC(+ β -karoten)+D₂O w temperaturze 30°C.