

ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

14-2007-139

На правах рукописи
УДК 538.91, 577.352.2

КИСЕЛЕВ
Михаил Алексеевич

**НАНОСТРУКТУРА ОДНОСЛОЙНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ
ВЕЗИКУЛ И ЧЕТЫРЕХКОМПОНЕНТНЫХ ЛИПИДНЫХ
МЕМБРАН НА ОСНОВЕ ЦЕРАМИДА 6**

Специальность: 01.04.07 — физика конденсированного
состояния

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Дубна 2007

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка
Объединенного института ядерных исследований

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, профессор В.Л. Аксенов

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, член-корр. РАН Г.Е. Добрецов
НИИ физико-химической медицины Федерального агентства по
здравоохранению и социальному развитию

доктор химических наук, профессор Р.И. Жданов
Институт общей патологии и патофизиологии РАН


Ведущая организация:

Петербургский институт ядерной физики им. Б.Н. Константинова РАН

Защита состоится _____ года в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д 720.001.06 при Лаборатории нейтронной физики и
Лаборатории ядерных реакций Объединенного института ядерных исследований
(141980, г. Дубна Московской области).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ОИЯИ

Автореферат разослан _____ года

Ученый секретарь диссертационного совета  А.Г. Полеко

2007A
20352

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Биологические мембраны играют ключевую роль как в структурной организации, так и в функционировании всех клеток – прокариотических и эукариотических, растительных и животных. Мембраны формируют внутриклеточные компартменты (отсеки), а плазматическая мембрана образует границу клетки. Структура биологических мембран по причине их многообразия, сложности и многокомпонентности остается до конца неопределенной. Мембранные липиды представляют огромное разнообразие. Причины этого разнообразия пока не ясны, но становится всё более очевидным, что это связано с разнообразием функций, которые липиды выполняют в мембранах. Фосфатидилхолин является основной компонентой мембран клеток животных. Жидкокристаллическая структура липидных мембран позволяет применять для их исследования дифракционные методы. Исследования наноструктуры и свойств фосфолипидов велись в прошлом и продолжаются в настоящее время методом дифракции нейтронов и рентгеновских лучей на многослойных ориентированных мембранах и многослойных везикулах (липосомах) [1L, 2L, 3L]. Плазматическая мембрана существует в однослойном состоянии [4L]. Более адекватным реальности является исследование наноструктуры однослойных мембран (липидного бислоя) в виде однослойных везикул (ОСВ). Везикулярные переносчики лекарств всё шире применяются при безинъекционном введении лекарств орально или трансдермально [10L, 11L]. Основой поверхности переносчика является липидный бислой. Создание метода анализа структуры везикулярных переносчиков лекарств до уровня наноструктуры их бислоя является актуальной задачей бионанотехнологии.

Малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН) используется для исследования структуры ОСВ [3, 5L-7L]. Получаемая информация о наноструктуре бислоя ограничивается определением его толщины [8L, 9L] или приближением ступенчатой функции для плотности длины рассеяния нейтрона $\rho(x)$ в направлении нормали к бислою [3, 5L-7L]. Размер и форма ОСВ определяется методом рассеяния света и (или) электронной скалывающей микроскопии [3, 20L, 21L]. Современные малоугловые установки на нейтронных и синхротронных источниках позволяют измерять спектр в

интервале векторов рассеяния, содержащем информацию как о размере везикулы, так и о её форме. В методе малоуглового рассеяния назрела потребность в получении аналитического выражения для сечения макроскопического рассеяния везикулярных систем, которое удовлетворяло следующим требованиям:

- а) описывало форму везикул как сферическую, так и более сложную,
- б) учитывало взаимодействие между везикулами,
- с) описывало внутреннюю структуру бислоя на уровне любых приближений функции $\rho(x)$.

Липидная матрица верхнего слоя кожи млекопитающих *stratum corneum* (SC) играет главную роль в регулировании водного баланса организма и диффузии молекул через кожу. С другой стороны, липидная матрица определяет проницаемость лекарств через кожу человека. В отличие от плазматической однослойной мембраны, липидная матрица SC является многослойной мембраной [12L]. Многочисленные рентгеновские и нейтронные дифракционные эксперименты по определению внутренней наноструктуры липидного бислоя SC ограничивались определением периода повторяемости как нативной липидной матрицы SC, так и модельных мембран [13L, 14L, 22L]. Отсутствие информации о внутренней наноструктуре липидного бислоя делает невозможным определение структурной роли отдельных церамидов в формировании липидной матрицы, а также их роли при диффузии воды и фармацевтических препаратов через SC. Актуальными задачами современных исследований SC являются: создание модельных мембран с компонентным составом липидов типичным для SC млекопитающих, поиск наиболее адекватных методов исследования их наноструктуры, определение роли каждого церамида в структурной организации матрицы SC и её диффузионных свойств.

Диссертация посвящена двум актуальным вопросам:

Основная информация о структуре липидного бислоя фосфолипидов, в том числе и димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), была получена методом рентгеновской дифракции на многослойных везикулах (липосомах) в избытке воды или плоских ориентированных многослойных мембранах [1L, 2L]. Бислоем многослойной везикулы можно рассматривать как плоский по причине большого радиуса кривизны

относительно его толщины. Вопрос идентичности структуры бислоя однослойных и многослойных везикул, а также вопрос о зависимости структуры бислоя от его кривизны являются нетривиальными в липидологии [15L-17L]. Развитие бионанотехнологий по созданию везикулярных переносчиков лекарств требует адекватной техники и методов для определения их наноструктуры и свойств. Разработанный автором метод разделенных формфакторов является принципиальным шагом в исследовании структуры однослойных везикул [4, 6, 8, 9, 12].

Вторым направлением является исследование четырехкомпонентной липидной мембраны, построенной на основе церамида 6 и содержащей главные компоненты липидной матрицы SC млекопитающих (модельная мембрана SC). Автором впервые было предложено использовать дифракцию нейтронов от ориентированных и частично гидратированных образцов для получения информации о наноструктуре модельных мембран SC. Для анализа наноструктуры использовался фурье-синтез плотности распределения нейтронов в направлении нормали к бислою [10, 14].

Целью работы является определение методами рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей особенностей наноструктуры, свойств и гидратации двух жидких кристаллов: фосфолипидов в виде однослойных везикул и модельных мембран липидной матрицы SC, сделанных на основе церамида 6. Средствами достижения поставленной цели являются развитые методы и применение известных методов к новым объектам.

Главы 1 - 3 посвящены развитию метода разделенных формфакторов и определению наноструктуры однослойных везикул ДМФХ в трех фазах: L_{β} , P_{β} , L_{α} .

Глава 1 посвящена детальному описанию метода разделенных формфакторов, вытекающих из него следствий, а также применению дисахаридов для улучшения контраста в рентгеновском малоугловом эксперименте.

Глава 2 посвящена выбору наиболее подходящего приближения для описания функции плотности распределения нейтронов вдоль нормали к бислою $\rho(x)$, а также развитию экспериментальной и вычислительной методики. Определена функция распределения воды в бислое ОСВ. Определены температуры фазовых переходов ДМФХ в H_2O и D_2O .

В главе 3 сформулировано гидрофобно-гидрофильное приближение для описания функции $\rho(x)$ и представлены результаты исследований наноструктуры однослойных везикул ДМФХ.

В главе 4 доказана эффективность применения дифракции нейтронов от ориентированных мембран для исследования наноструктуры модельных мембран SC. Впервые определена наноструктура и гидратация модельной мембраны SC млекопитающих, построенной на основе керамида 6.

Эксперименты проводились в нейтронных и синхротронных центрах России, Франции, Германии, Швейцарии, а также на фармацевтическом факультете Университета Мартина Лютера в Хале (Германия).

Научная новизна

Автором предложен метод разделенных формфакторов (РФФ), который лишен недостатков модели вложенных сфер [3], так как может описывать форму везикулы более сложную, чем сфера, и применять для моделирования плотности длины рассеяния нейтрона $\rho(x)$ любую функцию [4, 6]. РФФ метод был развит в последующих работах [8, 9, 12, 7L]. На основе этого метода удалось впервые рассчитать функцию распределения воды в бислое однослойных везикул [8], что явилось обоснованием гидрофобно - гидрофильного приближения для функции $\rho(x)$ [12]. РФФ метод был применен для исследования структуры однослойных везикул ДМФХ в трех фазовых состояниях [12]. Впервые установлено, что форма везикулы не является сферической. Она близка к сферической в L_α фазе (отношение полуосей эллипсоида вращения $\varepsilon = 1.1$) и является эллиптической в L_β и P_β фазах с $\varepsilon = 1.6$. Новым и чрезвычайно важным фактом явилось доказательство того, что структура изогнутого бислоя отличается от структуры плоского бислоя. Доказательство этого факта не является тривиальным. Потребовалось 20 лет, чтобы доказать разницу в температурах предперехода для однослойных и многослойных везикул [15L]. Идентичность структуры изогнутого и плоского бислоя считалось доказанной [6L] и использовалась при анализе данных по рентгеновскому рассеянию, что привело к ошибочным результатам [16L]. Установленная нами зависимость параметров бислоя ДМФХ от его радиуса кривизны была подтверждена одновременными и независимыми

исследованиями везикул пальмитоиллецитоилфосфатидилхолина [17L]. Однако, в отличие от работы [17L], где определялись только параметры бислоя, РФФ метод позволяет определять и форму везикул. На сегодня РФФ метод является наиболее мощным методом анализа наноструктуры липидных везикулярных систем в нейтронографии и является перспективным для применения в фармакологии для исследования везикулярных переносчиков лекарств.

Многочисленные попытки получить детальную информацию о наноструктуре нативной матрицы SC или модельных мембран SC, предпринятые методом рентгеновской дифракции на липосомах в избытке воды, не увенчались успехом и ограничивались получением информации о периоде повторяемости мембраны или фурье-анализом низкого разрешения [13L, 18L, 22L]. Автором было впервые предложено применить дифракцию нейтронов от ориентированных и частично гидратированных модельных мембран SC для определения их наноструктуры [10, 14]. В отличие от предыдущих работ, новый подход дал возможность увеличить количество измеряемых порядков отражения от 1-3 до 5, решить фазовую проблему за счет вариации контраста H_2O-D_2O и сделать фурье-анализ с разрешением 5.5 Å. Впервые была определена наноструктура модельной мембраны SC, состоящей из смеси четырех липидов: церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина [10, 14]. Важным и неожиданным результатом явилась чрезвычайная малость межмембранного пространства (1 Å) в мембранах на основе церамида 6, возникающая как следствие сильного межмембранного взаимодействия. В настоящее время разработанный метод и полученные результаты являются базой дальнейших исследований структуры липидной матрицы SC человека, ведущихся в Германии и России.

Представленные на защиту результаты являются оригинальными и были опубликованы в реферируемых научных журналах как оригинальные исследовательские работы. Научные публикации соискателя за период с 1999-2006 года цитировались в 201⁰⁸ статье, а работы, где он является первым автором, цитировались в 84^{*} статьях (<http://www.scientific.ru/>).

Научная и практическая ценность работы

Метод разделенных формфакторов для исследования везикулярных систем применяется исследователями в США, Канаде и Германии для исследования однослойных липидных и липид/пептидных везикул, а также может применяться для исследования везикулярных переносчиков лекарств [7L, 17L].

Метод увеличения контраста рентгеновского излучения водными растворами дисахаридов позволяет исследовать на синхротронных источниках везикулярные переносчики лекарств и кинетику процесса самосборки липидного бислоя [23L].

Первое применение дифракции нейтронов для исследований структуры и свойств модельной мембраны SC явилось основой для исследования этим методом более сложных и реалистических структур. Такие исследования ведутся в настоящее время на фармацевтическом факультете университета Мартина Лютера в Германии, в лаборатории нейтронной физики ОИЯИ и в институте Хана и Майтнер в Берлине.

Апробация работы. Результаты работы доложены и обсуждены на семинарах в ЛНФ ОИЯИ, на Конференции по применению рентгеновских лучей, синхротронного излучения, нейтронов и электронов в исследованиях материалов (Москва 2001); 5ой Интернациональной школе и симпозиуме по применению синхротронного излучения в естественных науках (Устронь-Ясковик, Польша 2000); Немецко-российском совещании пользователей реактора ИБР-2 по нейтронным исследованиям в физике конденсированного состояния (Дубна 2004); 1ом и 2ом Международном совещании по перспективам исследований на синхротронном источнике ОИЯИ (Дубна 1999, 2001); Международной конференции по рассеянию нейтронов (Мюнхен, Германия 2001); XIII и XIV российской конференции по использованию синхротронного излучения (Новосибирск 2000, 2002); XII международной конференции по избранным проблемам современной физики (Дубна 2003); XVII и XIX совещания по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния (Гатчина 2002, Обнинск 2006); Совещаниях пользователей берлинского центра нейтронного рассеяния (Берлин, Германия 2004, 2007); I, IV, V совещаниях по исследованиям на реакторе ИБР-2 (Дубна 2002, 2005, 2006); III международном симпозиуме «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии» (Москва, Дубна 2007); Первом российском рабочем

совещании «Ядерная наука конденсированных сред, наноструктур и технологий» (Дубна 2007); Международной конференции «Современные методы спектроскопии в исследованиях структуры и функции биополимеров в биологии и медицине» (Дубна 2007); международной конференции «Барьерные функции кожи млекопитающих» (Ньюпорт, США 2007).

Личный вклад автора. Вклад автора заключается в постановке и формулировке задач, технической подготовке экспериментов, приготовлении образцов, проведении измерений, расчете спектров, проведении необходимых расчетов и интерпретации результатов, написании и публикации статей. Образцы модельных мембран *stratum corneum* приготавливались на фармацевтическом факультете университета Мартина Лютера (Халле, Германия) совместно с докт. Я. Сбитовской. Программное обеспечение для расчетов по РФФ методу на базе пакета DFUMIL было развито совместно с докт. физ.-мат. наук Е.В. Земляной. Расчеты пространственного разрешения в одномерном дифракционном эксперименте были выполнены совместно с проф. А.М. Балагуровым.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 статей в отечественных и зарубежных реферируемых журналах. Результаты представлены в 15 устных и 7 стендовых докладах, представленных на 20 отечественных и международных конференциях, совещаниях и симпозиумах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации 126 страниц. Общее количество цитируемой литературы 111.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

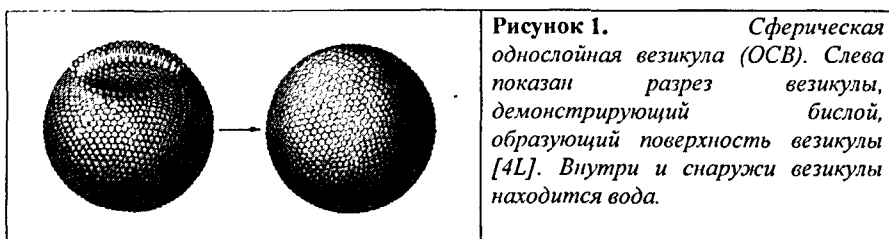
Во введении представлен обзор литературы, сформулирована постановка задачи, актуальность, научная новизна, научная и практическая ценность работы и сформулированы основные результаты работы.

Глава 1. Метод разделенных формфакторов в малоугловом рассеянии нейтронов и рентгеновских лучей

Макроскопическое когерентное сечение рассеяния монодисперсной популяции везикул определяется выражением [19L]

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega_{\text{ном}}} (q) = n \cdot F(q) \cdot S(q) \quad (1)$$

где q – модуль вектора рассеяния, n – количество везикул в единице объема, $F(q)$ – формфактор рассеяния нейтрона одной везикулой, $S(q)$ – структурный фактор популяции везикул. Автором показано, что $S(q) \approx 1$ для концентрации липидов в образце 1% по весу [6]. ОСВ в большинстве работ [1, 6-9, 5L-7L, 16L, 17L] рассматривались как сферические (см. рис. 1).



РФФ метод позволяет отделить формфактор формы везикулы от формфактора липидного бислоя, что увеличивает возможность более детального описания её формы и наноструктуры бислоя [4, 6, 8, 12]. В [4, 6, 12] показано, что для везикул, с радиусом R большим толщины бислоя d_m , уравнение (1) с высокой точностью записывается в виде

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega_{\text{ном}}} (q) = n \cdot F_s(q, R) \cdot F_b(q, d) \cdot S(q), \quad (2)$$

где $F_s(q, R)$ – формфактор бесконечно тонкой сферы радиуса R

$$F_s(q, R) = \left(4\pi \cdot \frac{R^2}{qR} \cdot \sin(qR) \right)^2, \quad (3)$$

а $F_b(q, d)$ – формфактор симметричного липидного бислоя толщины d_m

$$F_b(q, d) = \left(\int_{-d_m/2}^{d_m/2} \rho_c(x) \cdot \cos(qx) \cdot dx \right)^2. \quad (4)$$

Здесь x – расстояние от центра бислоя, $\rho_c(x) = \rho(x) - \rho_{D2O}$ – контраст: разница в плотности длины рассеяния нейтрона между липидным бислоем и тяжелой водой. Разделение формфактора формы везикулы и формфактора бислоя позволяет вводить любые приближения для описания $\rho(x)$ и описывать несферическую форму везикулы. Для вытянутого эллипсоида вращения (a, a, ea) с бесконечно тонкой стенкой формфактор записывается в виде

$$F_E(q, a) = \int_0^1 A_E^2 \left(q \cdot a \cdot \sqrt{1 + x^2 \cdot (\varepsilon^2 - 1)} \right) dx, \quad (5)$$

где

$$A_E(z) = 4\pi \cdot \varepsilon \cdot a^2 \cdot \frac{\sin(z)}{z}. \quad (6)$$

Уравнения (2)-(6) составляют основу РФФ метода.

Липидная везикулярная система (популяция везикул) не является монодисперсной, а обладает полидисперсностью, описываемой распределением Шульца [3, 20L]. В расчетах учитывалась полидисперсность системы, вводились поправки на функцию разрешения спектрометра и определялся вклад некогерентного рассеяния [8, 12].

На основе уравнения (4) получено выражение для расчета толщины липидного бислоя d_G в приближении Гинье. В некоторых работах приближение Гинье использовалось в предположении, что оно описывает неоднородную функции $\rho(x)$ [6L, 9L]. Автором доказано, что приближение Гинье справедливо только для $\rho(x) = \text{const}$.

Показана эффективность применения дисахаридов как для увеличения контраста в рентгеновских малоугловых экспериментах, так и для уменьшения полидисперсности везикул. Интенсивность рассеяния рентгеновских лучей при 40% концентрации сахарозы увеличивается в 100 раз по сравнению с водой. Исследования различными методами (малоугловым рассеянием нейтронов и рентгеновских лучей, дифференциальной сканирующей калориметрией, рамановской спектроскопией и динамическим рассеянием света) показали, что влияние дисахаридов на структуру мембраны незначительно, в то время как время жизни везикул при концентрациях сахарозы 5%-35% увеличивается [1, 2, 5, 7, 9]. Полидисперсность везикул имеет

минимум при 20% сахарозы. При использовании водных и тяжеловодных растворов дисахаридов полидисперсность везикул по размерам может быть уменьшена на 10%. 20% концентрация дисахаридов является наиболее оптимальной для исследований везикул методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.

Глава 2. Функция распределения воды в изогнутом липидном бислое

Важным в описании экспериментального спектра МУРН является выбор подходящего приближения функции $\rho(x)$ и количества свободных параметров, определяемых из подгонки расчетной кривой к экспериментальной. В главе 2 рассмотрены четыре приближения функции $\rho(x)$. Наиболее важным из них является флуктуационное приближение, изображенное на рис. 2. Такое приближение не могло быть введено в рассмотрение на основе методов используемых в предыдущих работах [3, 5L-6L]. РФФ метод позволил впервые ввести флуктуационное приближение и провести анализ структуры бислоя ОСВ на основе применения гауссовых функций МУРН [8].

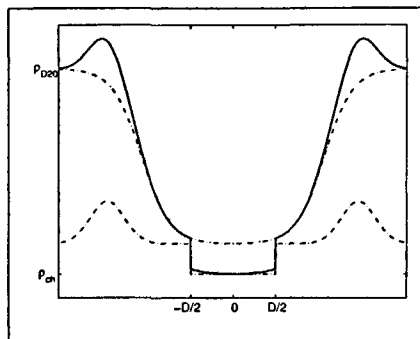


Рисунок 2. Приближение $\rho(x)$ гауссовыми функциями. Плотность длины рассеяния «сухого» бислоя (---) линия, D_2O — (---) линия, результирующая сумма — сплошная линия. Флуктуационное приближение.

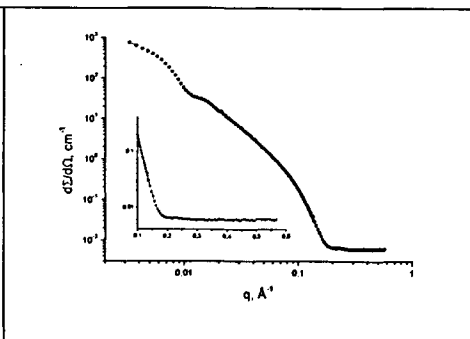


Рисунок 3. Экспериментальное макроскопическое сечение рассеяния от везикул ДМФХ при $T = 30^\circ C$ (точки) и расчетная кривая (линия) в флуктуационном приближении. На вставке показана часть спектра в области больших q .

Результаты расчетов плотности длины рассеяния нейтрона $\rho(x)$ для везикул, приготовленных экструзией через поры диаметром 500 \AA , представлены на рис. 2, а экспериментальный спектр и расчетная кривая - на рис. 3. Рис. 2 демонстрирует, что

плотность распределения длины рассеяния нейтрона молекулами D_2O является главной компонентой результирующей функции $\rho(x)$. Вид функции $\rho(x)$ является базой для формулирования гидрофобно-гидрофильного (ГГ) приближения функции $\rho(x)$. Линия (---) является функцией распределения воды в изогнутом липидном бислое ОСВ, которая демонстрирует проницаемость бислоя для воды.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии показано, что замена H_2O на D_2O не влияет существенно на температуры фазовых переходов ДМФХ, что позволяет использовать метод МУРН для исследования термотропных фазовых переходов. В приближении Гинье измерена зависимость толщины мембраны от температуры при фазовых переходах. Доказано, что приближение Гинье даст заниженное значение толщины мембраны.

Глава 3. Наноструктура однослойных везикул димиристоилфосфатидилхолина

В главе 3 введено гидрофобно-гидрофильное (ГГ) приближение для функции $\rho(x)$, представленное на рис. 4.

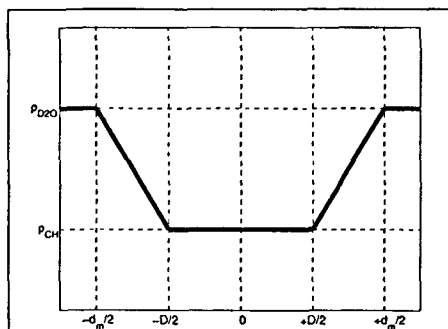


Рисунок 4. Гидрофобно-гидрофильное приближение плотности длины рассеяния нейтрона $\rho(x)$ вдоль нормали к плоскости бислоя.

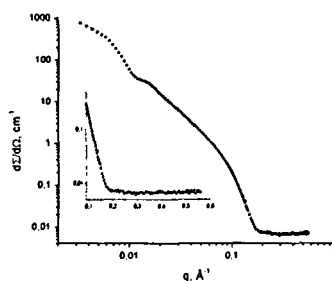


Рисунок 5. Экспериментальное макроскопическое сечение рассеяния нейтронов от популяции ОСВ при $T = 30^\circ C$ (точки) и расчетная кривая в ГГ приближении.

Применение РФФ метода в сочетании с ГГ приближением позволило впервые корректно описать особенности наноструктуру везикул ДМФХ в L_α фазе [12]. Результаты представлены в табл. 1, а экспериментальный спектр и расчетная кривая

представлены на рис. 5. Как видно из табл. 1, толщина липидного бислоя d_m зависит от его кривизны и превышает значение толщины плоского бислоя $d_m = 44.2 \text{ \AA}$ [2L]. Количество молекул воды N_w также отличается от его значения для плоского бислоя: $N_w = 7.2$ [2L]. Доказано, что гидратация и толщина изогнутого липидного бислоя больше гидратации и толщины плоского бислоя [8, 12]. Исследования везикул в $L_{\beta'}$ и $P_{\beta'}$ фазах показали, что форма везикул изменяется при понижении температуры из приблизительно сферической в L_{α} фазе ($\varepsilon = 1.1$) в существенно эллиптическую ($\varepsilon = 1.6$) в $L_{\beta'}$ - и $P_{\beta'}$ фазах. В $L_{\beta'}$ фазе значения $d_m = 49.6 \pm 0.5 \text{ \AA}$ и $A = 49.2 \pm 0.9 \text{ \AA}^2$, для везикул экструдированных при $D_F = 1000 \text{ \AA}$, больше значений $d_m = 48.2 \text{ \AA}$ и $A = 47 \text{ \AA}^2$ для плоских мембран. Усредненные данные для $P_{\beta'}$ фазы сравнить не с чем, так как усредненная структура мембраны ДМФХ в этой фазе была определена впервые.

Таблица 1. Результаты расчетов для везикул ДМФХ в L_{α} фазе ($T = 30^\circ \text{C}$), сделанных на основе ГГ приближения $\rho(x)$. D_F – диаметр пор используемых при экструдировании, $\langle a \rangle$ – среднее значение малой полуоси вытянутого эллипсоида вращения, ε – отношение полуосей, $\langle R \rangle$ – средний радиус везикул для $\varepsilon = 1$, σ – полидисперсность везикул, d_m – толщина мембраны (липидного бислоя), D – толщина гидрофобной части липидного бислоя, N_w и A – соответственно количество молекул воды и площадь мембранной поверхности на одну молекулу ДМФХ.

$D_F, \text{ \AA}$	$\langle R \rangle, \text{ \AA}$ или $\langle a \rangle, \text{ \AA}$	ε	$\sigma, \%$	$d_m, \text{ \AA}$	$D, \text{ \AA}$	N_w	$A, \text{ \AA}^2$
500	266±2	1.11±0.02	26	48.9±0.2	19.9±0.4	12.8±0.3	60.7±0.5
1000	450*	1	48	45.5±0.6	20.8±0.4	10.8±0.4	62.6±1.0

* $\langle R \rangle = 450 \text{ \AA}$, $\varepsilon = 1$ по данным динамического рассеяния света [21L].

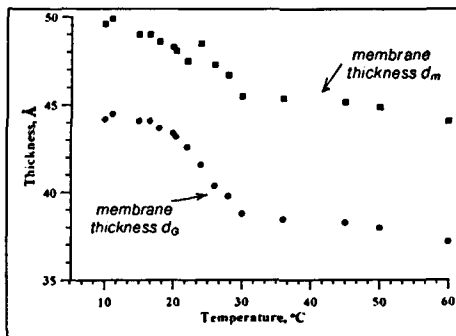
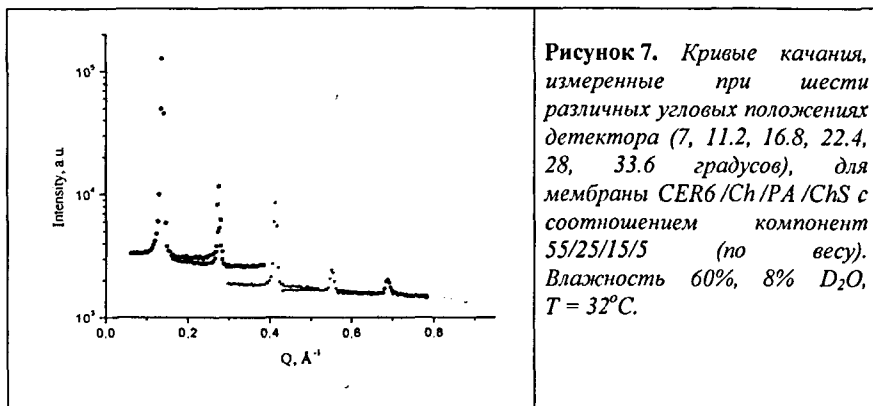


Рисунок 6. Зависимость толщины мембраны ДМФХ d_G и толщины мембраны d_m от температуры. Величина d_G определена из спектра МУРН в приближении Гинье. Величина d_m рассчитывается на основе поправок, сделанных по результатам расчетов на основе РФФ метода [10].

Проведенные экспериментальные исследования структуры везикул в трех различных фазовых состояниях бислоя и анализ происхождения систематической ошибки в расчетах толщины мембраны в приближении Гинье позволили рассчитать эмпирические поправки для приближения Гинье и построить график зависимости толщины мембраны ДМФХ от температуры, представленный на рис. 6.

Глава 4. Наноструктура четырехкомпонентных липидных мембран на основе церамид 6 (модельных мембран *stratum corneum*)

Глава 4 посвящена нейтронографическим исследованиям модельной мембраны липидной матрицы SC с композицией церамид 6 (CER6) / холестерин (Ch) / пальмитиновая кислота (PA) / сульфат холестерина (ChS). Для сравнения, были проведены исследования структуры ДМФХ в аналогичных условиях [12, 14].



В начале главы 4 сделаны расчеты разрешения фурье-синтеза в одномерном дифракционном эксперименте. Сформулировано, что требование пересечения двух дифракционных пиков на половине высоты соответствует пространственному разрешению фурье-синтеза

$$\Delta x \approx 0.6 \frac{d}{h_m}, \quad (7)$$

где d – период повторяемости мембраны, а h_m – максимальный измеряемый порядок отражения.

На рис. 7 представлен дифракционный спектр для модельной мембраны SC. Период повторяемости мембраны равен $45.68 \pm 0.05 \text{ \AA}$ при относительной влажности $RH = 60\%$, $8\% \text{ D}_2\text{O}$ и $T = 32^\circ\text{C}$. Распределения плотности длины рассеяния нейтрона в элементарной ячейке многослойной мембраны в направлении нормали (фурье-профили) и расчетные кривые представлены на рис. 8 для мембраны ДМФХ и на рис. 9 для модельной мембраны SC. Наноструктура мембраны SC существенно отличается от фосфолипидных мембран. Главное отличие мембран на основе CER6 от мембраны ДМФХ заключается в чрезвычайно малом межмембранном пространстве.

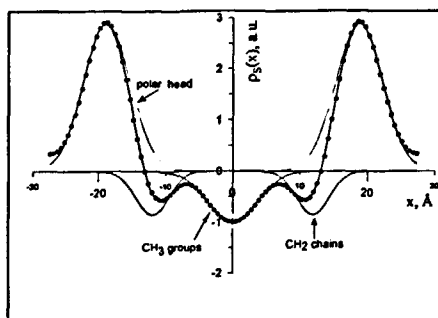


Рисунок 8. Распределение плотности длины рассеяния нейтрона $\rho_s(x)$ в однослойной мембране ДМФХ при $RH = 60\%$, $T = 32^\circ\text{C}$ и 8% содержании D_2O (точки) и расчетные кривые (сплошная линия). Стрелки показывают положение трех молекулярных групп: CH_3 группы, CH_2 цепочки и группы полярных голов.

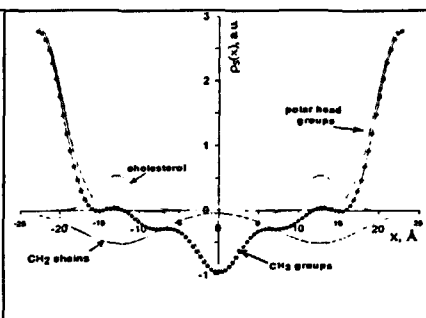


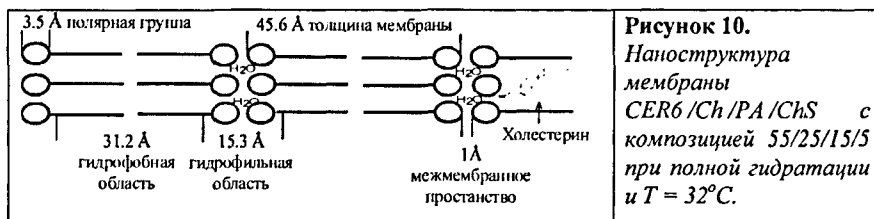
Рисунок 9. Распределение плотности длины рассеяния нейтрона $\rho_s(x)$ в однослойной мембране CER6 /Ch /PA /ChS=55/25/15/5 при $RH = 60\%$, $T = 32^\circ\text{C}$ и $8\% \text{ D}_2\text{O}$ (точки) и расчетные кривые (сплошная линия). Стрелки показывают положение четырех молекулярных групп.

Применение вариации контраста (измерения с 8% , 20% и 50% D_2O в парах воды) позволило определить функцию распределения воды и гидрофобно-гидрофильную границу липидного бислоя, которая аналогична фосфолипидам.

Таблица 2. Структурные параметры мембраны CER6 /Ch /PA /ChS с композицией 55/25/15/5 при полной гидратации и $T = 32^\circ\text{C}$. d – период повторяемости, d_m – толщина мембраны, d_w – толщина межмембранного пространства, $d_{\text{hydrophilic}}$ – толщина гидрофильного слоя, $d_{\text{hydrophobic}}$ – толщина гидрофобной части бислоя.

$d, \text{ \AA}$	$d_m, \text{ \AA}$	$d_w, \text{ \AA}$	$d_{\text{hydrophilic}}, \text{ \AA}$	$d_{\text{hydrophobic}}, \text{ \AA}$
46.45 ± 0.03	45.63 ± 0.04	0.82 ± 0.07	7.22 ± 0.24	31.2 ± 0.2

Полученные на основе фурье-синтеза результаты представлены в табл. 2. Окончательно, с учетом результатов экспериментов по набуханию мембраны в избытке воды, наноструктура мультислойной мембраны изображена на рис. 10. Толщина межмембранного пространства практически равна нулю при 60% влажности. Касающиеся друг друга полярные головы противоположных бислоев создают гидрофильную поверхность раздела между двумя соседними бислоями. Полученные результаты продемонстрировали высокую эффективность применения дифракции нейтронов для исследования модельных мембран SC, ориентированных на кварцевых подложках.



Основные результаты:

1. Создан метод разделенных формфакторов (РФФ) для исследования везикулярных систем. Получены аналитические выражения для сечения рассеяния однослойных везикул, позволяющие вводить любые функции для описания плотности длины рассеяния нейтрона $\rho(x)$ в направлении нормали к бислою, а также описывать как сферическую, так и эллиптическую форму везикулы. Аналитически и экспериментально обоснованы рамки приближения Гинье в малоугловом эксперименте с везикулами. Сформулированы методические требования к малоугловому эксперименту по исследованию везикул.
2. Развита метод контрастирования однослойных везикул в рентгеновском малоугловом рассеянии за счет изменения концентрации дисахаридов в водном растворе. Метод основан на том, что дисахариды при весовой концентрации 40% увеличивают в 100 раз интенсивность малоуглового рассеяния от однослойных липидных везикул, не вызывая существенных изменений в структуре бислоя.

3. Предложен метод уменьшения полидисперсности размера однослойных везикул водными растворами дисахаридов. Показано, что при использовании водных и тяжеловодных растворов дисахаридов полидисперсность везикул по размерам может быть уменьшена на 10%. Полидисперсность везикул минимальна при концентрации сахарозы 20%.
4. Впервые получена функция распределения воды в изогнутом бислое ДМФХ. Методом МУРН получена функция распределения воды в липидном бислое ДМФХ однослойной везикулы, которая демонстрирует проницаемость бислоя для воды.
5. Впервые определена наноструктура липидного бислоя однослойных везикул ДМФХ в трех фазовых состояниях: L_{β} , P_{β} , L_{α} . Методом МУРН для везикул, приготовленных экструзией через поры диаметром 500 Å, определены: форма везикулы; средний размер и полидисперсность размера; толщина бислоя d_m ; толщина гидрофобной части бислоя D ; количество молекул воды, проникающих в гидрофильную область и в область полярных групп; площадь мембраны, приходящаяся на одну молекулу ДМФХ.
6. Впервые установлена зависимость наноструктуры липидного бислоя ДМФХ в L_{α} фазе от его кривизны. Показано, что толщина липидного бислоя d_m и его гидратация N_w уменьшаются с увеличением радиуса везикулы R : $d_m=48.9\pm 0.9$ Å и $N_w = 12.8\pm 0.3$ для $R\approx 250$ Å; $d_m=45.5\pm 0.6$ Å и $N_w = 10.8\pm 0.4$ для $R\approx 500$ Å; $d_m=44.2$ Å, $N_w = 7.2$ для $R=\infty$.
7. Измерена зависимость толщины липидного бислоя ДМФХ от температуры. Применение РФФ метода позволило рассчитать систематические ошибки приближения Гинье и получить зависимость толщины мембраны ДМФХ от температуры в диапазоне от 10°C до 60°C.
8. Впервые дифракция нейтронов с пространственным разрешением 5.5 Å была применена для исследования наноструктуры модельных мембран липидной матрицы верхнего слоя кожи млекопитающих. Определены толщина липидного бислоя, толщина гидрофобной области, толщина области полярных голов, функция распределения воды, положение молекул холестерина.

9. Установлено, что главной особенностью четырехкомпонентной липидной мембраны на основе церамида 6 является чрезвычайно малое межмембранное пространство (1 Å).

Публикации по теме диссертации:

1. 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.
2. M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, D. Lombardo, M. Killany, S. Lesieur, M. Ollivon. A sucrose solutions application to the study of model biological membranes. *Nucl. Inst&Method A* 470 (2001) 409-416.
3. 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.
4. M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, D. Lombardo, V.L. Aksenov. Model of separated form factors for unilamellar vesicles. *Applied Physics A* 74 (2002) S1654-S1656.
5. М.А. Киселёв, П. Лёзи, А.М. Киселёв, Д. Ломбардо, М. Оливо. Влияние сахарозы на структуру и свойства мембран димиристоилфосфатидилхолина. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования* 7 (2002) 63-66.
6. М.А. Киселёв, Д. Ломбардо, А.М. Киселёв, П. Лёзи, В.Л. Аксёнов. Исследования структурного фактора однослойных везикул димиристоилфосфатидилхолина методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования* 11 (2003) 20-24.
7. M.A. Kiselev, S. Wartewig, M. Janich, P. Lesieur, A.M. Kiselev, M. Ollivon, R. Neubert. Does sucrose influence the properties of DMPC vesicles? *Chemistry and Physics of Lipids* 123 (2003) 31-44.
8. M.A. Kiselev, E.V. Zemlyanaya, V.K. Aswal. SANS study of unilamellar DMPC vesicles: Fluctuation model of a lipid bilayer. *Crystallography Reports* 49 Suppl. 1 (2004) s136-s141.

9. M.A. Kiselev, J. Zbytovska, D. Matveev, S. Wartewig, I. V. Gapienko, J. Perez, P. Lesieur, A. Hoell, R. Neubert. Influence of trehalose on the structure of unilamellar DMPC vesicles. *J. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 256 (2005) 1-7.
10. M.A. Kiselev, N.Yu. Ryabova, A.M. Balagurov, S. Dante, T. Hauss, J. Zbytovska, Š. Wartewig, R.H.H. Neubert. New insights into structure and hydration of stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. *European Biophys. J.* 34 (2005) 1030–1040.
11. J. Zbytovska, M.A. Kiselev, S. S. Funari, V. Garamus, S. Wartewig, R. Neubert. Influence of Ceramides [NP] and [AP] on the DMPC membrane structure. *Chemistry and Physics of Lipids* 138 (2005) 69–80.
12. M.A. Kiselev, E.V. Zemlyanaya, V.K. Aswal, R.H.H. Neubert. What can we learn about the lipid vesicle structure from the small-angle neutron scattering experiment? *European Biophys. J.* 35 (2006) 477-493.
13. E.V. Zemlyanaya, M.A. Kiselev, J. Zbytovska, L. Almasy, V.K. Aswal, P. Strunz, S. Wartewig, R.H.H. Neubert. Numerical analysis of the unilamellar vesicle structure based on the SANS data. *Crystallography Reports* 51 Suppl. 1(2006) s22-s26.
14. М.А. Киселев. Конформация молекул церамида 6 и chain-flip переходы в липидной матрице верхнего слоя кожи - Stratum Corneum. *Кристаллография* 52 (2007) 572-576.

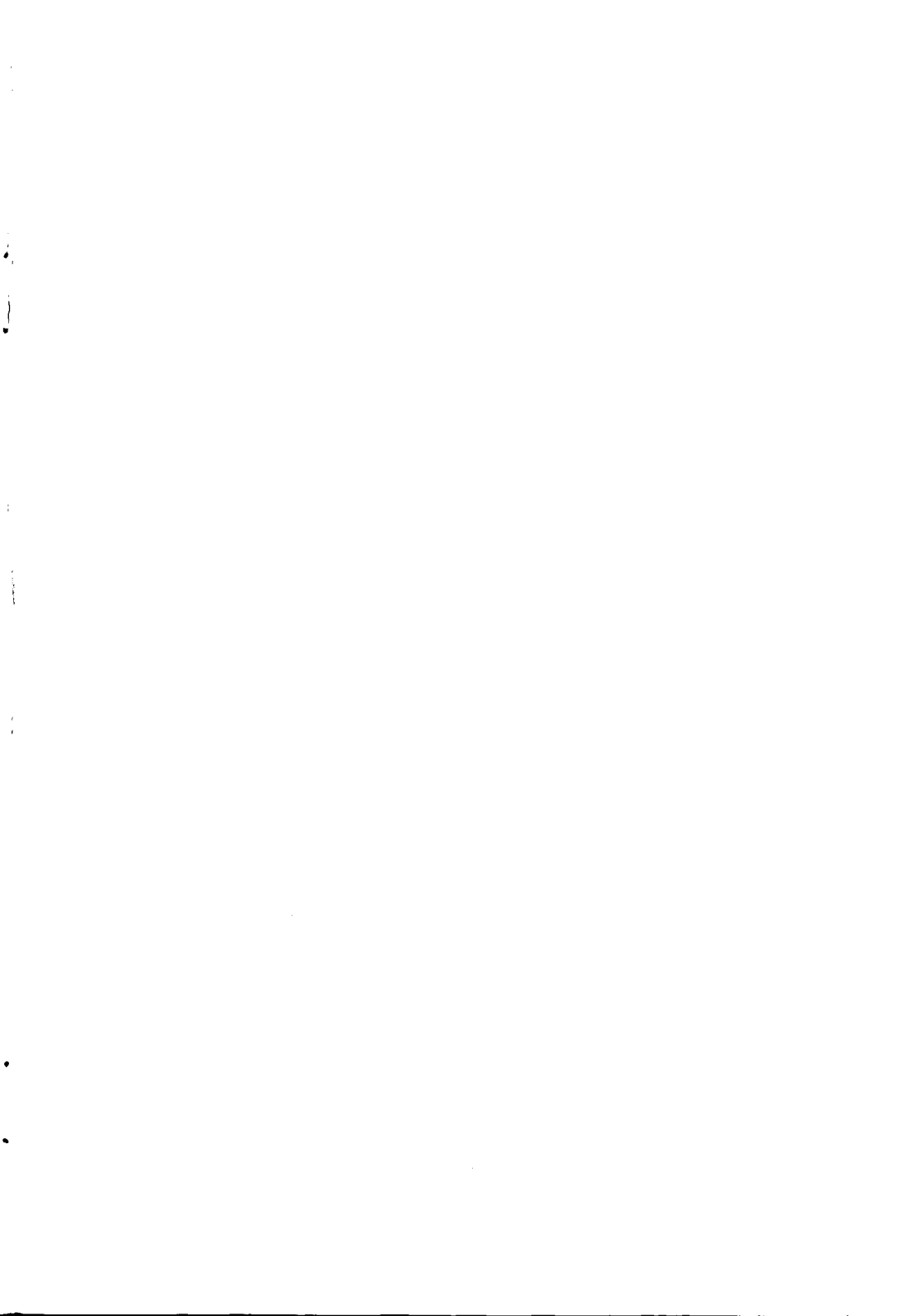
Цитируемая литература:

- 1L. M.C. Wiener, S.H. White. Fluid bilayer structure determination by the combined use of X-ray and neutron diffraction. *Biophys J.* (1991) 59 162-173.
- 2L. J.F Nagle, S. Tristram-Nagle. Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000) 159-195.
- 3L. K. Gawrisch, H.C. Gaede, M. Mihailescu, S.H. White. Hydration of POPC bilayers studied by ¹H-PFG-MAS-NOESY and neutron diffraction. *European Biophys. J.* 36 (2007) 281-289.
- 4L. Ю.Н. Овчинников. Биоорганическая химия. Москва, Просвещение (1987).

- 5L. P. Balgavy, M. Dubnickova, N. Kucerka, M.A. Kiselev, S.P. Yaradaikin, D. Uhrikova. Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2-diacylphosphatidylcholine liposomes: A small-angle neutron scattering study. *Biochim. Biophys. Acta* 1521 (2001) 40-52.
- 6L. N. Kucerka, M. Kiselev, P. Balgavy. Determination of bilayer thickness and lipid surface area in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine vesicles from small-angle neutron scattering curves: a comparison of evaluation methods. *European Biophys. J.* 33 (2004) 328-334.
- 7L. J. Pencer, S. Krueger, C. Adams, J. Katsaras. Method of separated form factors for polydisperse vesicles. *J. Appl. Cryst.* 39 (2006) 1-11.
- 8L. W. Knoll, J. Haas, H.B. Stuhmann, H.-H. Fuldner, H. Vogel, E. Sackmann. Small-angle neutron scattering of aqueous dispersions of lipids and lipid mixtures. A contrast variation study. *J. Appl. Cryst.* 14 (1981) 191-202.
- 9L. V.I. Gordeliy, V. Cherezov, J. Teixeira. Strength of thermal undulations of phospholipid membranes. *Phys. Rev. E* 72 (2005) 061913.
- 10L. G. Cevc, A. Schatzlein, H. Richardsen. Ultradformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label SLSM experiments and direct size measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 1564 (2002) 21-30.
- 11L. G. Cevc. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 675-711.
- 12L. S.F. Friberg, D.W. Osborne. Small angle X-ray diffraction patterns of stratum corneum and a model structure for its lipids. *J. Dispersion Science and Technology* 6 (1985) 485-495.
- 13L. J. Bouwstra, G. Pilgram, G. Gooris, H. Koerten, M. Ponc. New aspects of the skin barrier organization. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14, suppl 1 (2001) 52-62.
- 14L. G.C. Charalambopoulou, T.A. Steriotis, T. Hauss, K.L. Stefanopoulos, A.K. Stubos. A Neutron diffraction study of the effect of hydration on the stratum corneum structure. *Applied Physics A* 74 (2002) S1245-S1247.

- 15L. В.А. Твердислов, А.Н. Тихонов, Л.В. Яковенко. Физические механизмы функционирования биологических мембран. *Москва, Московский университет* (1987).
- 16L. N. Kucerka, Y. Liu, N. Chu, H.I. Petrache, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle. Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using X-Ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 88 (2005) 2626-2637.
- 17L. H. Schmiedel, L. Almasy, G. Klose. Multilamellarity, structure and hydration of extruded POPC vesicles by SANS. *European Biophys. J.* 35 (2006) 181-189.
- 18L. T. McIntosh. Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol. *Biophys. J.* 85 (2003) 1675-1681.
- 19L. Д.И. Свергун, Л.А. Фейгин. Малоугловое рассеяние нейтронов и рентгеновских лучей. *Москва, Наука* (1986).
- 20L. F.R. Hallet, J. Watton, P. Krygsmann. Vesicle sizing. Number distributions by dynamic light scattering. *Biophys. J.* 59 (1991) 357-362.
- 21L. A.J. Jin, D. Huster, K. Gawrisch, R. Nossal. Light scattering characterization of extruded lipid vesicles. *European Biophys. J.* 28 (1999) 187-199.
- 22L. N. Ohta, S. Ban, H. Tanaka S. Nakata, I. Hatta. Swelling of intercellular lipid lamellar structure with short repeat distance in hairless mouse stratum corneum as studied by X-ray diffraction. *Chemistry and Physics of Lipids* 123 (2003) 1-8.
- 23L. P. Lesieur, M.A. Kiselev, L.I. Barsukov, D. Lombardo. Temperature induced micelle to vesicle transition: kinetic effects in the DMPC / NaC system. *J. Appl. Cryst.* 33 (2000) 623-627.

Получено 21 сентября 2007 г.



2007A
20352
№ 20352

Отпечатано методом прямого репродуцирования
с оригинала, предоставленного автором.

Подписано в печать 24.09.2007.

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

Усл. печ. л. 1,44. Уч.-изд. л. 1,41. Тираж 100 экз. Заказ № 55897.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/