

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ имени Д.В. СКОБЕЛЬЦЫНА**

М.А. Киселев

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДНЫХ НАНОСТРУКТУР НА
НЕЙТРОННЫХ И СИНХРОТРОННЫХ ИСТОЧНИКАХ**

Учебное пособие

Москва, 2014

УДК 538.91, 577.352.2

М.А. Киселев

e-mail: kiselev@nf.jinr.ru

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДНЫХ НАНОСТРУКТУР НА НЕЙТРОННЫХ И СИНХРОТРОННЫХ ИСТОЧНИКАХ

В учебном пособии изложены современные методы применения рассеяния нейтронов и синхротронного излучения для исследования наноструктуры липидных мембран и фосфолипидных наночастиц. На конкретных примерах исследований фосфолипидных мембран и мембран на основе церамидов показаны возможности взаимодополняющего использования нейтронного и синхротронного излучения для определения структурных параметров и свойств липидных мембран.

Также изложены технологии изготовления липидных мембран для нейтронных и синхротронных исследований и представлены другие методы исследования липидных мембран и липидных наночастиц.

Учебное пособие написано на основе лекций, читаемых автором на кафедре нейтронографии Физического факультета МГУ, и предназначено для студентов высших учебных заведений физического и биофизического направления, а также может быть полезно специалистам, исследующим липидные мембраны.

Табл. 3. Ил. 42. Библиогр.: 70 назв.

Рецензенты: доктор физ.-мат. наук Е.В. Земляная
доктор физ.-мат. наук А.М. Балагуров

М.А. Kiselev

METHODS FOR INVESTIGATION OF LIPID NANOSTRUCTURES AT NEUTRON AND SYNCHROTRON SOURCES

Modern methods of application of the neutron and synchrotron radiation for study of the lipid membrane nanostructure and phospholipid nanoparticles are presented in this teaching aid. The scopes of complementary application of neutron and synchrotron radiation for the determination of structural parameters and properties of the lipid membranes are demonstrated on the specific examples. The technologies of lipid membrane fabrication for neutron and synchrotron investigations are stated also. Other methods of lipid membranes and nanoparticles investigations are presented.

This teaching aid was written on the base of author lectures on the division of neutronography of the Physical Faculty of MSU and intend for university undergraduate students in physics and biophysics or for researches in the field of lipid membranes.

© М.А. Киселев

© НИИЯФ МГУ, год, <http://www.sinp.msu.ru>

Предисловие

Липидная мембрана является главной компонентой биологической мембраны. Фосфолипиды являются главной компонентой липидной мембраны клетки. Церамиды являются главной компонентой липидной матрицы верхнего орогового слоя кожи млекопитающих. По своей структуре и свойствам липидная мембрана является классическим нанообъектом. Исследования структуры и свойств липидных мембран ведутся на стыке медицины, фармакологии, биологии, физики и химии. Нобелевская премия 2013 года по физиологии и медицине (Джеймс Ротман, Рэнди Шекман, Томас Зюдхоф) присуждена за исследования внутриклеточного и межклеточного транспорта с помощью фосфолипидных наночастиц – везикул.

Современные бионанотехнологии используют фосфолипиды и церамиды как основную компоненту лекарств и косметических средств. Наночастицы на основе фосфолипидов используются как переносчики лекарств. Развитие бионанотехнологий в России требует подготовки специалистов по физическим методам диагностики наноструктуры частиц, перспективных для применения в фармакологии. Излучения с длиной волны 1-10 Å являются адекватным инструментом определения структуры липидной мембраны. С другой стороны, липидная мембрана обладает рядом свойств, которые делают её перспективным объектом для исследований на нейтронных и синхротронных источниках. Толщина мембраны находится в области 50 Å, мембрана является двумерным жидким кристаллом, возможно применение дейтерированных липидов, возможна вариация контраста заменой H₂O на D₂O на нейтронных источниках и заменой H₂O на водные растворы дисахаридов на синхротронных источниках. Богатая морфология и сложная фазовая диаграмма липидных систем позволяет проводить их исследования различными методами (дифракция, малоугловое рассеяние, рефлектометрия, спин-эхо). Учебное пособие в основном посвящено описанию дифракционных и малоугловых методов рассеяния, как наиболее широко применяемых.

Современным мировым стандартом меганауки для исследования наносистем является наличие нейтронного и синхротронного центров, расположенных в одном районе. Лаборатория нейтронной физики Объединенного института ядерных

исследований, г. Дубна обладает импульсным источником нейтронов ИБР-2. В национальном исследовательском центре «Курчатовский институт» работает синхротронный источник Сибирь-2. Подготовка специалистов в области исследования биологических наноструктур и нанолекарств на установках меганауки является, с точки зрения автора, важной задачей.

Учебное пособие написано на основе лекций, читаемых в 2009-2013 годах автором на кафедре нейтронографии физического факультета МГУ, и предназначено для студентов высших учебных заведений физического и биофизического направления, а также может быть полезно специалистам, исследующим липидные мембраны.

Автор выражает благодарность заведующему кафедрой, члену-корреспонденту РАН, профессору В.Л. Аксенову и д.ф.-м.н., профессору С.А. Гончарову за организацию лекций на кафедре нейтронографии физического факультета МГУ, а также д.ф.-м.н. Е.В. Земляной и д.ф.-м.н., профессору А.М. Балагурову, прочитавших рукопись и сделавших ряд полезных замечаний.

Используемые сокращения:

МСВ – многослойная везикула

ОСВ – однослойная везикула

SC – stratum corneum

ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолин

ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин

ДСФХ – дистеароилфосфатидилхолин

ПОФХ – пальмитоилолеоилфосфатидилхолин

ДМСО – диметилсульфоксид

NaC – холат натрия

Cer6, Cer [AP] – короткоцепочечный церамид 6

Cer1, Cer [EOS] – длинноцепочечный церамид 1

РА – пальмитиновая кислота

ВА – бегеновая кислота

q – модуль вектора рассеяния

λ – длина волны нейтрона (фотона)

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

СИ – синхротронное излучение

SAXS – малоугловая (ламиллярная) дифракция рентгеновских лучей

WAXS – широкоугловая (латеральная) дифракция рентгеновских лучей

ПЧД – позиционно-чувствительный детектор

СМС – критическая концентрация мицеллообразования

МУРН – малоугловое рассеяние нейтронов

1. Введение.

1.1. Биологическая роль липидов.

Главная биологическая роль липидов (липидных молекул) заключается в формировании липидного бислоя – основы биологической мембраны. Из множества функций, выполняемых биологической мембраной, наиболее важной является образование плазматической мембраны клетки [1]. Собственно сама клетка стала формироваться в тот момент, когда липидный бислоем замкнулся в сферическую оболочку и отделил внутреннюю часть от объемной воды мирового океана [4]. Основной липидной компонентой биологической мембраны клетки являются фосфолипиды, что и определяет интерес биологии к изучению наноструктуры и свойств мембран построенных из фосфолипидов, так называемых, модельных биологических мембран. На рис. 1.1 изображена структурная формула молекулы димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), одного из представителей фосфолипидов. Фосфолипид – полярная молекула, состоящая из двух углеводородных цепочек присоединенных к полярной голове. Полярная голова фосфолипида может быть нейтральной, заряженной или дипольной. Фосфолипиды с дипольной полярной головой называются цвиттерионными. ДМФХ является цвиттерионным насыщенным липидом. Дипольный заряд полярной головы ДМФХ обеспечивает её высокую полярность (гидратацию). ДМФХ и лецитин широко используются при изучении модельных биологических мембран, а также при производстве фармацевтических и косметических препаратов, а также пищевых добавок [2].

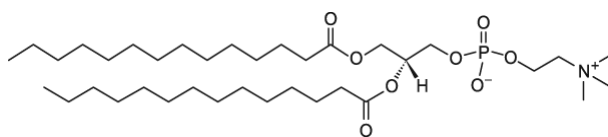


Рис. 1.1. Структурная формула молекулы димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), $C_{36}H_{72}NO_8P$.

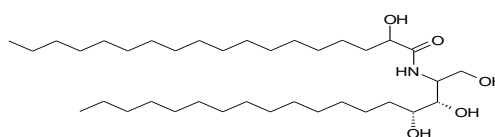


Рис. 1.2. Структурная формула молекулы церамида 6 (церамида [AP]), $C_{36}H_{73}NO_5$.

В отличие от мембраны клетки, основной компонентой липидной матрицы верхнего рогового слоя кожи stratum corneum (SC) являются церамиды. На рис. 1.2 изображена пространственная структура церамида 6, который также обозначается как церамид [AP]. Фосфолипиды не входят в состав липидной матрицы stratum corneum. Церамиды в малых количествах входят в состав плазматической мембраны. В процессе

апоптоза концентрация церамидов в клеточной мембране увеличивается. На сегодня общепризнано, что липидная матрица SC является основным барьером для проникновения воды и малых молекул через кожу. Процесс переноса лекарств через кожу человека определяется, прежде всего, наноструктурой липидной матрицы и зависимостью этой наноструктуры от физико-химического воздействия на кожу. Этим определяется интерес биологов и дерматологов к вопросам изучения структуры и свойств липидной матрицы SC млекопитающих.

На рис. 1.3 изображена структура кожи млекопитающих. Stratum corneum (роговой слой) является верхним слоем кожи. Он слой состоит из умерших клеток (корнеоцитов) окруженных липидной матрицей, которая является многослойной мембраной, как изображено на рис. 1.4. Липидный бислой этой матрицы образуется церамидами, жирными кислотами, холестерином и его производными. Молекула церамида образована жирной кислотой и сфингозином (фитосфингозином). На сегодня установлено 11 типов церамидов, входящих в состав липидной матрицы SC млекопитающих.

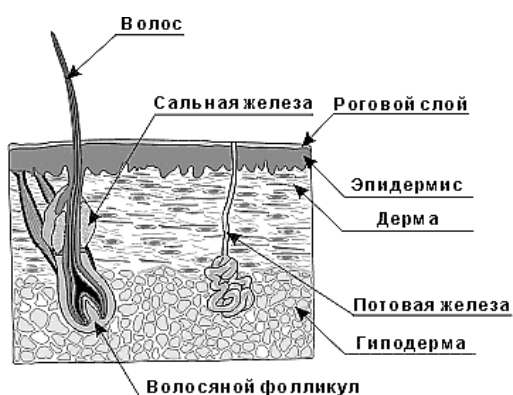


Рис. 1.3. Структура кожи млекопитающих. Верхний роговой слой кожи – stratum corneum.

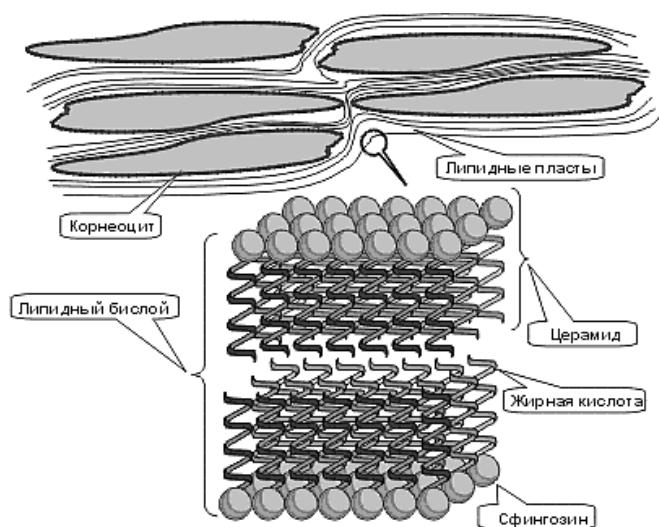


Рис. 1.4. Структура верхнего рогового слоя кожи (SC). Внизу изображена структура липидной бислоя мембраны SC.

1.2. Фармацевтические применения липидов.

Фосфолипиды и церамиды могут быть получены двумя способами. Первый – извлечение из биологических объектов или растений. Например, один из наиболее

применяемых в бионанотехнологиях фосфолипид – яичный лецитин извлекают из куриных яиц. Смесь различных церамидов может извлекаться биохимическими методами из верхнего слоя кожи млекопитающих. Второй способ – синтез молекул. Большинство фосфолипидных молекул синтезируется и предлагается в виде коммерческого продукта фирмами Avanti (<http://www.avantilipids.com>), Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/>), Lipoid (<http://www.lipoid.com>) и другими. Церамиды, в отличие от фосфолипидов, еще не получили соответствующего производства как дешевый коммерческий продукт. Производство постоянно увеличивается за счет выхода на рынок новых типов церамидов, которые в основном идут на изготовление кремов для увлажнения кожи. В косметических продуктах используются церамиды, экстрагированные из растений. Получение липидов из трав и растений является наиболее перспективным направлением их производства для фармакологии и косметологии. Церамиды (сфинголипиды) значительно увеличивают уровень увлажнения поверхности кожи. Они помогают удерживать дермальные клетки вместе, укрепляя клеточные стенки, что предотвращает преждевременное образование мелких морщин. Поэтому многие косметические фирмы делают на их основе кремы и гели. Сфинголипиды были впервые выделены из мозговой ткани.



Рис. 1.5. Лекарство фосфоглив, выпускаемое в виде капсул и лиофилизированного порошка. Разработано в институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича.

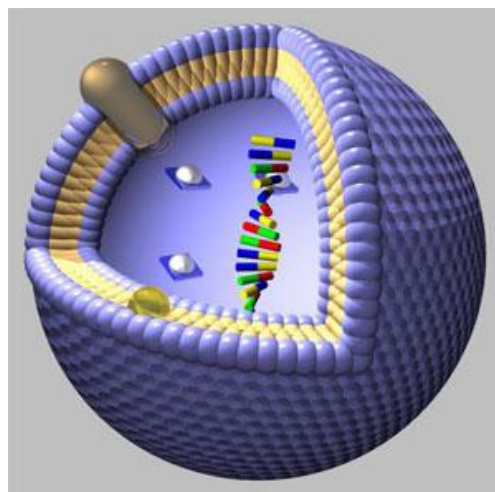


Рис. 1.6. Однослойная липидная везикула со встроенными молекулами лекарств. Молекулы водорастворимых лекарств находятся внутри везикулы, а молекулы водонерастворимых лекарств встроены в липидный бислой.

Свое второе название - церамиды (ceramides) - они получили от латинского слова cerebrum (мозг). В публикациях на русском языке и биохимических описаниях продукции используется два перевода слова ceramide: церамид и керамид. Правильным, безусловно, является церамид.

В качестве примера применения фосфолипидов приведем гепапротекторное лекарство для печени – фосфоглив (рис. 1.5) , которое представляет собой липидные наночастицы изготовленные из смеси фосфатидилхолина и глицерризиновой кислоты [3]. Размеры наночастиц фосфоглива известны и составляют 200-500Å, а вот их морфология и форма до сих пор не изучены.

80% продуктов на современном рынке бионанотехнологий составляют переносчики лекарств. Особое место здесь занимают трансдермальные везикулярные переносчики лекарств. Такие переносчики, выполненные на основе однослойных везикул с размерами от 500Å до 2000Å, способны векторно в течение нескольких минут доставлять в кожу или через кожу лекарства, чистые витамины, аминокислоты, пептиды, молекулярный кислород, активные вещества, а также церамиды. На рис. 1.6 изображена общая структура везикулярного переносчика лекарства.

Довольно часто однослойные везикулы на основе фосфолипидов называют липосомами, а в последние годы – нанолипосомами, что также приводит к терминологической путанице. В нашем учебном пособии липосомы это многослойные везикулы из фосфолипидов, состоящие из повторяющихся липидных бислоев. Они имеют микронные размеры и используются как переносчики пищевых добавок и витаминов (рис. 1.7). Высокая полярность фосфолипидов создают достаточно большое (около 15 Å) водное пространство между бислоями, в котором размещаются водорастворимые витамины и пищевые добавки. Гидрофобная часть липидного бислоя толщиной около 20 Å служит для размещения витаминов и пищевых добавок, которые нерастворимы в воде.

Переносчик лекарства это наночастица с размерами в области от 100 Å до 2000 Å. Такие размеры обеспечивают высокую проницаемость наночастиц через биологическую ткань. Использование в наночастицах фосфолипидов, с одной стороны, обеспечивает биосовместимость материала переносчика, а с другой – высокую эффективность взаимодействия переносчика с плазматической мембраной клетки.

Все вышеизложенное говорит о важности понимания физических принципов организации и функционирования биологических и липидных мембран, что невозможно без получения детальных знаний о наноструктуре липидного бислоя [4].

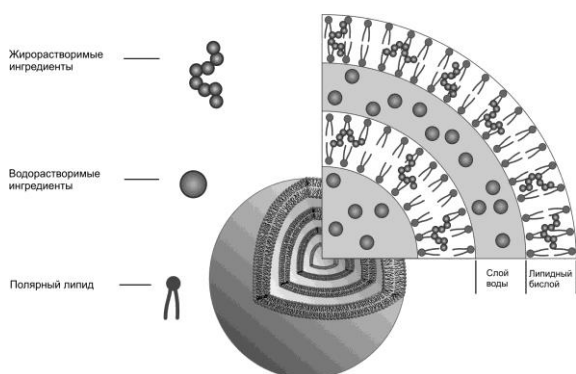


Рис. 1.7. Многослойная везикула (липосома) из полярных липидов. Жирорастворимые ингредиенты встроены в липидный бислой. Водорастворимые ингредиенты сконцентрированы в межмембранном водном пространстве. Справа показан увеличенный разрез везикулы, демонстрирующий детали структурной организации.

§2. Липидные структуры и технологии их изготовления.

Липидные системы для нейтронных экспериментов создаются в зависимости от целей исследования и используемого метода. В целом, системы можно разбить на две части: неориентированные липидные системы, приготавливаемые как в большом, так и в малом избытке воды и многослойные ориентированные липидные мембраны на кварцевых подложках.

Успех эксперимента зависит, прежде всего, от качества приготовления образцов. В виду большой стоимости экспериментов на нейтронных и синхротронных источниках и ограниченности измерительного времени следует уделять развитию технологии приготовления образцов особое внимание. Кроме чисто научного аспекта проблемы, имеется еще, не менее важный, прикладной аспект. Развитие бионанотехнологий, связанных с производством продукции на основе липидов, невозможно без развития лабораторных методов изготовления липидных систем. Производственные технологии создания липидных систем, как правило, основаны на лабораторных технологиях, развиваемых в ходе научно-исследовательской работы.

2.1. Неориентированные липидные системы.

Неориентированные липидные системы изготавливаются как многослойные и однослойные везикулы, общая структура которых изображена на рис. 2.1, или как мицеллярные системы в большом избытке воды.

Мицеллярные системы приготавливаются в виде смешанных липид/ детергентных систем. Необходимое количество липида и детергента растворяется в воде. Затем растворы смешиваются в необходимой пропорции. Для достижения равновесия образец несколько раз нагревается до 60°C и охлаждается до комнатной температуры.

Многослойные везикулы (МСВ) приготавливаются растворением липидов или липидной пленки в воде. Многослойная липидная пленка приготавливается следующим образом. Необходимое количество липидов растворяется в органическом растворителе (смесь хлороформ/ метанол $\approx 2/1 \div 1/1$). Затем органический растворитель выпаривается в вакуумном испарителе. Многослойная липидная мембрана самоорганизуется при испарении органического растворителя. Затем межмембранное пространство гидратируется водой. Количество добавляемой воды определяет степень гидратации мембраны.



Рис. 2.1а. Многослойная липидная везикула в избытке воды. Размер МСВ лежит в интервале от нескольких микрон до десятков микрон.



Рис. 2.1б. Однослойная липидная везикула в избытке воды. Размер везикулы лежит в интервале от 300 Å до 2000 Å.

МСВ приготавливаются для проведения исследований структуры и свойств липидных мембран методом дифракции синхротронного излучения в рентгеновском диапазоне и (или) методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Важным моментом приготовления МСВ в большом и малом избытке воды является создание однородного образца с большими везикулами. После приготовления образец состоит из $N_{\text{вез}}$ многослойных везикул, со средним числом бислоев в одной везикуле $N_{\text{слоев}}$.

Интенсивность дифракционного пика в экспериментах на неориентированных образцах пропорциональна $N_{\text{слоев}}^2$ и $N_{\text{вез}}$. Поэтому увеличение $N_{\text{слоев}}$ (создание малого количества больших везикул) более важно, чем увеличение $N_{\text{вез}}$ (создания большего числа малых везикул) в одном и том же образце. Используется два метода гомогенизации образца и увеличения $N_{\text{слоев}}$. Первый метод хорошо известен и широко применяется [5]. Это обработка образца ультразвуком. Наибольший эффект достигается при нагреве образца выше температуры главного фазового перехода в ультразвуковой ванне. Второй метод основан на циклическом нагреве – охлаждении образца выше и ниже температуры главного фазового перехода. Наиболее эффективно использование не только главного фазового перехода, но и фазовых переходов связанных с кристаллизацией воды в образце. Нагрев образца выше температуры главного фазового перехода, выдержка при этой температуре в течение 10-20 мин и последующее охлаждение до азотных температур приводит к образованию однородных многослойных везикул с максимальным $N_{\text{слоев}}$.

Для проведения синхротронных экспериментов методом дифракции рентгеновских лучей основными требованиями к технологии приготовления образцов являются:

- Малая толщина стенки кюветы с образцом.
- Малое количество образца – 10-30 мкг.
- Однородность образца.
- Максимальное количество слоев в МСВ.
- Известное количество молекул растворителя, приходящихся на одну молекулу липида

Малая толщина стенки кюветы с образцом необходима для уменьшения поглощения синхротронного излучения с длиной волны около 1.5 Å и, тем самым, предотвращения нагрева образца пучком. Образцы помещаются в кварцевые капилляры фирмы GLAS (Германия) с диаметром 1 – 1.5 мм и толщиной стенки 0.01 мм (рис.2.2). Гидратированная липидная суспензия помещается в верхнюю широкую часть капилляра и затем опускается вниз центрифугированием на скоростях 1000-2000 об/мин. В процессе центрифугирования, при необходимости, для опускания образца осуществляется нагрев капилляра в диапазоне температур 20°C – 60°C. Для предотвращения испарения воды (уменьшения заданной гидратации мембраны)

верхняя часть капилляра запаивается на газовой горелке. Герметичность запаянной части проверяется на микроскопе. В среднем, четыре из пяти запаянных кварцевых капилляра имеют дефекты в виде микроотверстий. С точки зрения герметизации, использование стеклянных капилляров вместо кварцевых имеет преимущество, так как стеклянные капилляры практически не дают дефектов при пайке. Это связано с тем, что температура размягчения стекла составляет 815°C , соответствующая температура для кварца равна 1730°C . Линейный коэффициент поглощения рентгеновских лучей при $\lambda=1.5 \text{ \AA}$ для боросиликатного стекла ($\mu=71 \text{ см}^{-1}$) не значительно отличается от кварцевого стекла ($\mu=75.8 \text{ см}^{-1}$). Главным недостатком стеклянных капилляров, который ограничивает их использование в экспериментах на синхротронных источниках, является их хрупкость. Стеклянные капилляры имеют большую вероятность разрушения при установке в держатель, что приводит к полной потере образца и необходимости чистки держателя.

В капиллярах размещается 10-30 мкг исследуемого образца. Такое малое количество образца и его однородность необходимы для проведения одновременно дифракционного эксперимента в реальном времени и измерения кривой ДСК. Одновременные дифракционные и калориметрические измерения осуществляются при скоростях нагрева (охлаждения) $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

МСВ приготавливаются при различном избытке или недостатке воды. Приготовление МСВ в большом избытке воды дает слабую интенсивность дифракционных спектров. Весовое соотношение липид/вода выбирается обычно в интервале от 1/1 до 1/9. При малом соотношении липид/вода (система 1/1) образцы имеют соизмеримое количества молекул липида, молекул свободной воды и молекул связанной воды, что позволяет исследовать особенности гидратации липидных мембран свободной и связанной водой.

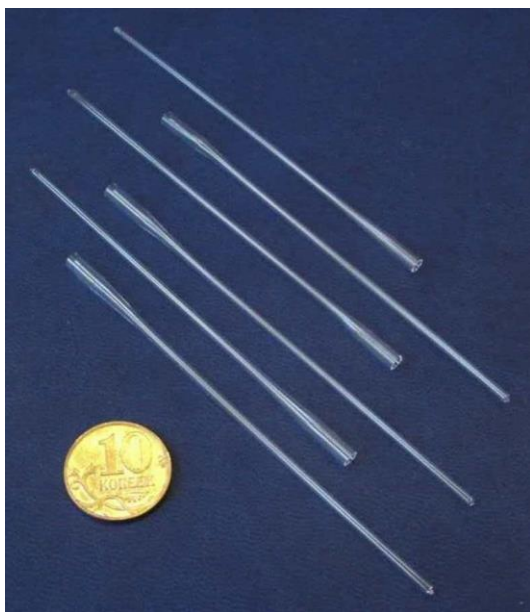


Рис. 2.2. Кварцевые капилляры фирмы GLAS, Германия.



Рис. 2.3. Кварцевая кювета QX-404.000 фирмы Hellma, Германия.

Однослойные липидные везикулы (рис. 2.1б) в большом избытке воды приготавливаются методом экструзии многослойных везикул, при весовой концентрации липида в воде 1-5%. Обычно в экспериментах методом малоуглового рассеяния нейтронов используется 1% концентрация липидов в D_2O или смесях D_2O и H_2O (вариация контраста). При применении малоуглового рассеяния рентгеновских лучей используется H_2O , вариация контраста осуществляется за счет применения водных растворов дисахаридов (сахарозы и трегалозы) [7]. Для проведения измерений методом малоуглового рассеяния нейтронов сильноразбавленные растворы ОСВ в тяжелой воде помещаются в кварцевые кюветы. На рис. 2.3 изображена кварцевая кювета для проведения исследований методом малоуглового рассеяния нейтронов. Толщина рабочего объема кюветы составляет 1 мм, внутренний объем 700 мкл. Размеры кюветы: высота 47.5 мм, внешняя ширина 23.6 мм, внутренняя ширина 18.5 мм, высота заливаемой жидкости 35 мм, толщина в области рабочей поверхности 2.5 мм. В аналогичную кювету заливается буфер (вода, используемая при приготовлении образца), спектр которого затем вычитается из спектра образца.

В экспериментах методом малоуглового рассеяния рентгеновского синхротронного излучения использование двух капилляров для проведения измерений

образца и буфера создает систематическую ошибку, связанную с различным диаметром капилляров и различной толщиной капилляра в зоне прохождения пучка. Попытки заменить капилляры на кюветы с лавсановыми окнами не решают эту проблему. Гидростатическое давление образца приводит к разной кривизне окна и, соответственно, к разной толщине образца. Наиболее подходящими для решения проблемы равенства толщин образца и буфера являются окна, сделанные из слюды. Недостатком применения слюды являются дефекты (трещины) её поверхности, на которых происходит паразитное рассеяние. В малоугловом рентгеновском эксперименте наиболее эффективно использование капилляра, установленного в вакуумную камеру, с возможностью его многократного заполнения образцом и буфером. Образец в капилляр заливается за счет малого разрежения, создаваемого шприцом. После проведения измерения образец удаляется из капилляра малым избыточным давлением. Затем капилляр промывается водой и заливается следующий образец или буфер. Наличие вакуума вокруг капилляра снижает некогерентный фон от рассеяния фотонов на атомах воздуха.

Существует несколько способов приготовления ОСВ [1]. Везикулы малых размеров могут быть приготовлены из МСВ при их обработке ультразвуком, при инъекции липидов, растворенных в этаноле, в водную среду, или при экструзии МСВ через поры с диаметром от 400 Å до 2000 Å. В смешанных липид/ детергентных системах также существует несколько способов создания ОСВ из мицеллярных систем [6]. Экструзия позволяет приготавливать везикулы с заданными размерами. Размеры везикул определяются диаметром используемого фильтра и величиной приложенного давления. В наших экспериментах однослойные везикулы готовились из МСВ методом экструзии через поликарбонатные фильтры. Для приготовления везикул использовался ручной экструдер Liposofast Basic фирмы Avestin, Канада, изображенный на рис. 2.4. Технология приготовления однослойных везикул следующая. Многослойные везикулы заливаются в шприц (левый на рис. 2.4). Прибор нагревается в термостате на 20°C - 30°C выше температуры главного фазового перехода T_m . Для ДМФХ $T_m = 23^\circ\text{C}$, для ДПФХ $T_m = 41^\circ\text{C}$. Затем образец продавливаются через нанопоры поликарбонатного фильтра, как показано на рис. 2.4.



Рис. 2.4. Продавливание раствора через фильтр экструдера *Liposofast Basic*. Многослойные везикулы из левого шприца продавливаются через нанопоры фильтра и собираются в правом шприце.

При экструзии происходит уменьшение количества $N_{\text{слоев}}$ в МСВ. Образец скапливается в правом шприце. Затем экструзия повторяется и образец собирается в левом шприце. Процесс превращения многослойных везикул в однослойные требует 20 – 30 кратного прохождения образца через фильтр. При этом важно сделать нечетное количество продавливаний. В этом случае образец будет собран в правом шприце. Тем самым, МСВ, ни разу не прошедшие через фильтр, останутся в левом шприце. А в правом шприце будут собраны везикулы, которые более одного раза прошли через фильтр. Вторая технологическая тонкость экструдирования связана с образованием пузырьков воздуха в образце. Сами по себе пузырьки воздуха не представляют опасности для измерения кривой малоуглового рассеяния (не вызывают искажений). Микронные размеры пузырьков воздуха превышают возможности их регистрации методом МУРН. На кривой МУРН рассеяние от неоднородности плотности длины рассеяния нейтрона, возникшей из за пузырька, будет лежать в области малых значений вектора рассеяния, недоступных для малоугловых установок на нейтронных источниках. Минимальный размер пузырьков воздуха в воде составляет 15-20 мкм, а максимальный 100-200 мкм. Для пузырька с радиусом 10 мкм, вклад в интенсивность малоуглового рассеяния будет существенен в области значений модуля вектора рассеяния $q < 3 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}^{-1}$. Пузырьки больших размеров будут давать вклад в меньшие углы рассеяния. Однако, пузырек является границей раздела вода – воздух. На этой границе может образоваться липидный монослой. Радиус пузырька существенно ($10^5 - 10^6$) превышает толщину липидного монослоя. Поэтому монослой можно рассматривать как плоский. Рассеяние нейтронов от плоского монослоя с толщиной в два раза меньшей толщины бислоя будет искажать кривую малоуглового рассеяния. Для удаления пузырьков следует использовать нагрев образца с последующим увеличением давления. При этом пузырьки всплывают из объема образца на поверхность. Наличие липидной пленки на

водной поверхности образца опасности для эксперимента не представляет, так как поверхность образца не попадает в падающий пучок.

Таб. 2.1. Процентное содержание в образце однослойных везикул ПОФХ. D – диаметр пор поликарбонатного фильтра, N – количество прохождений образца через поликарбонатный фильтр [8].

N	D=500Å	D=1000Å	D=2000Å	D=4000Å
5	92%	80%	77%	71%
9	95%	81%	78%	71%
29	98%	84%	81%	79%

Технология приготовления однослойных везикул экструдированием через поликарбонатные фильтры изучена профессором университета Лейпцига Г. Шмидел [8]. Методом малоуглового рассеяния нейтронов была исследована зависимость количества слоев в везикуле от количества прохождения образца через поры различных радиусов. В расчетах учитывалось образование в образце однослойных, двухслойных, трехслойных и четырехслойных везикул. В таб. 2.1 приведено процентное содержание однослойных везикул, полученных при экструзии через поликарбонатные фильтры с различным диаметром пор.

2.2. Многослойные ориентированные мембраны на кварцевых подложках.

Наиболее полная информация, получаемая о структуре липидных мембран в дифракционном эксперименте, основана на восстановлении функции плотности длины рассеяния нейтрона в направлении нормали к бислою (рис. 2.5). Точность восстановления функции $\rho(x)$ зависит от разрешения дифрактометра и от качества приготовления многослойной мембраны. Интегрально эти две зависимости выражаются количеством дифракционных пиков измеренных в эксперименте N . С точки зрения приготовления образцов, идеальным является многослойная мембрана ориентированная на кварцевых подложках. Именно такие мембраны используются в нейтронных дифракционных экспериментах. Чем больше количество слоев в многослойной мембране, тем выше её качество для проведения эксперимента. Технология создания многослойных мембран фосфолипидов на кварцевых подложках была развита в 1970 годах при проведении их исследований на нейтронных источниках.

Построение функции $\rho(x)$ позволяет определить внутреннюю структуру липидной мембраны. Липидный бислой симметричен, поэтому при построении функции $\rho(x)$ удобно за начало координат взять середину липидного бислоя. На рис. 2.5 изображены: функция $\rho(x)$, соответствующие ей участки многослойной липидной мембраны, а также определяемые параметры.

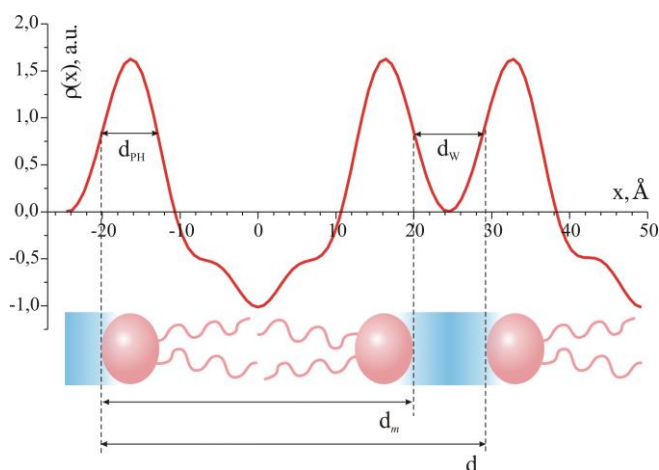


Рис. 2.5. Плотность длины рассеяния нейтрона в направлении нормали к бислою многослойной мембраны $\rho(x)$, рассчитанная по N дифракционным пикам. d - период повторяемости, d_m - толщина липидного бислоя, d_w - толщина липидного бислоя, d_{PH} – толщина области полярных голов.

Технология приготовления фосфолипидных мембран была использована для разработки технологии изготовления модельных мембран SC. Основные компоненты липидной мембраны SC (церамиды, жирные кислоты, холестерин и сульфат холестерина) растворяются в смеси хлороформ/метанол (1/1 по весу) с концентрацией 10 мг/мл. Далее растворы липидных компонент смешиваются в необходимой пропорции. 1200 мкл полученного раствора липидов в органическом растворителе выливаются на поверхность кварцевой пластины площадью 2.5 см x 6.4 см. После испарения органического растворителя и образования липидной пленки на поверхности кварца пластина накрывается колпаком в котором задается 100% влажность воздуха. Затем проводится операция отжига образца - медленный нагрев пластины до температуры 70-80°C в течение 30-60 минут и охлаждение до комнатной температуры. Остатки органического растворителя удаляются помещением образца в форвакуум на 6-8 часов. Образцы хранятся при комнатной температуре в течении 2-3 месяцев (рис. 2.6). Средняя толщина липидной пленки на кварце составляет 7.5 мк.

На рис. 2.7 представлены в качестве примера молекулярные структуры липидов, используемых при приготовлении мембраны на основе церамид 6. На рис. 2.6

представлены фотографии трех образцов, используемых в нейтронных дифракционных экспериментах.



Рис. 2.6. Образцы модельных мембран липидной матрицы SC. Многослойная липидная мембрана с составом *церамид6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина* на кварцевых подложках.

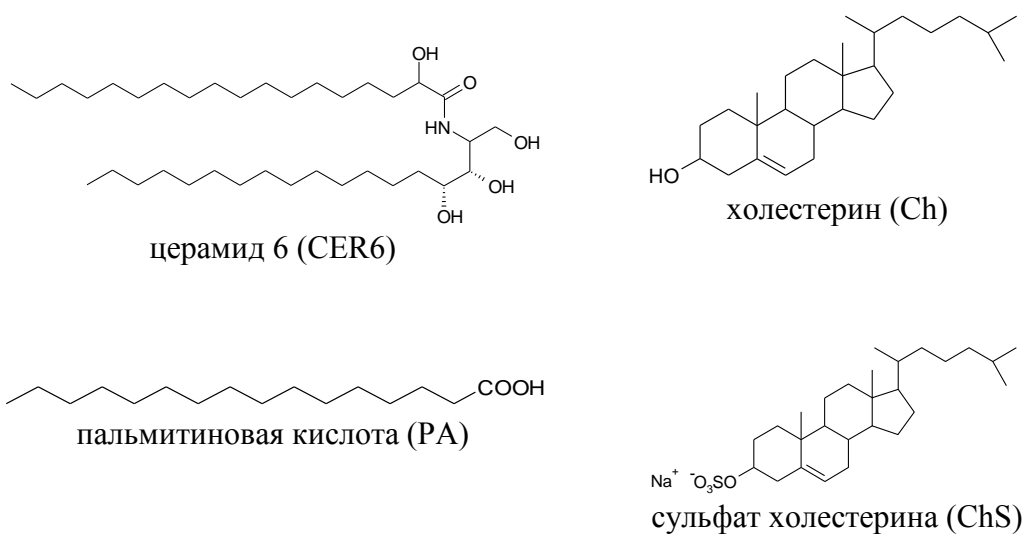


Рис.2.7. Молекулярная структура компонент модельной мембраны липидной матрицы SC млекопитающих с композицией *Cer6 /Ch /PA /ChS*.

§3. Методы исследования структуры и свойств липидных мембран и липидных наночастиц.

Характерные размеры липидного бислоя (около 50\AA) требуют применения для определения его структуры длинноволнового излучения с длиной волны в несколько ангстрем. Здесь наиболее эффективными методами изучения являются рассеяние нейтронов с длиной волны в интервале от 1 до 10\AA (тепловые и холодные нейтроны) и рассеяние синхротронного рентгеновского излучения с длиной волны от 1 до 2\AA . Детально нейтронные и синхротронные методы описаны в последующих параграфах. Здесь мы кратко представим другие методы.

Методом определения локальной структуры липидной мембраны является ядерный магнитный резонанс, который позволяет определять локализацию молекул в мембране и, тем самым, строить функции распределения различных веществ в липидном бислое. Особо эффективно применение ЯМР для определения кинетики проникновения веществ через мембрану в диффузионных процессах [9]. Электронная микроскопия позволяет исследовать структуру липидных агрегатов, помещенных в вакуум или охлажденных до низких температур в воде. Получаемое при этом разрешение не бывает лучше, чем 50\AA . При этом, всегда остается вопрос об изменении структуры при дегидратации и охлаждении.

Рассеяние нейтронов и рентгеновского синхротронного излучения эффективны для определения наноструктуры липидной мембраны, липидных мицелл и более сложных фаз (гексагональной, кубической и других), но неэффективны для определения микроскопических параметров липидных систем с размерами более 1000\AA (липосомы и др.). Здесь более информативно применение статического и динамического рассеяния света, комбинацией которых можно определять как форму, так и размер сильнорастворенных липидных частиц [10]. Комбинированное применение динамического и статического рассеяния света является одним из наиболее применяемых методов в бионанотехнологиях как при разработке технологий изготовления переносчиков лекарств [11], так и при изготовлении соответствующих приборов и аппаратов [12].

Флюоресценция позволяет исследовать структуру как липидных, так и биологических мембран. С помощью флуоресцентных зондов были одновременно впервые измерены потенциалы электрических полей на плазматической и

митохондриальной мембранах в лимфоцитах крови [13]. Хроматография является основным методом разделения и очистки липидных компонент. Одновременно, хроматографические методы могут использоваться для определения распределения липосом по размерам [14]. Для определения размеров липидных агрегатов, в частности стержнеобразных мицелл, иногда весьма эффективно применяется вискозиметрия. Наиболее эффективно применение вискозиметрии в комбинации с малоугловым рассеянием нейтронов.

Одной из важнейших характеристик липидной системы является её фазовое состояние. Дифференциальная сканирующая калориметрия позволяет определять температуры и энтальпии термотропных фазовых переходов в липидных системах, возникающих как при положительных температурах [15], так и при охлаждении, что позволяет исследовать свойства фазовых переходов свободной и связанной воды, находящейся в липидной мембране [16]. Изотермическая титрационная калориметрия позволяет исследовать лиотропные фазовые переходы и получать термодинамические параметры в смешанных системах липид / детергент, что важно для исследования процесса растворения – самосборки липидной мембраны и реконструкции мембранных белков. В современных исследованиях липидных мембран ДСК является одним из первых методов, который следует применять для получения информации о свойствах новых объектов. Вторым методом определения фазового состояния липидного бислоя и, прежде всего, конформационных состояний углеводородных цепочек является рамановская спектроскопия. Инфракрасная спектроскопия занимает важное положение в исследованиях структуры и свойств липидных систем, позволяя фиксировать изменение интенсивности различных связей в липидных молекулах при воздействии на них других веществ или изменении физико – химических параметров.

Менее широко используемыми, но иногда чрезвычайно полезными для интерпретации результатов методами являются гравиметрия и измерение прозрачности.

В последнее время появились приборы, одновременно использующие несколько методов для определения размеров липидных частиц. В качестве примера приведем установку, использующую одновременно падение частиц в потоке жидкости и рассеяние света (flow field-flow fractionation fractograms in combination with multi-angle light scattering) [17].

Вычислительные мощности современных компьютеров позволяют делать расчеты структуры мембран методами моделирования молекулярной динамики. Результаты таких расчетов чрезвычайно полезны в сочетании с проведением экспериментальных измерений [18].

§4. Методы применения нейтронного и синхротронного излучения для определения структуры и свойств липидных мембран и липидных наночастиц.

В рассеянии нейтронов и рентгеновских лучей исследуется зависимость интенсивности рассеяния от модуля вектора рассеяния $q = \frac{4\pi \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda}$. Здесь θ - угол рассеяния падающего излучения, λ - длина волны используемого излучения. Основными методами рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей применительно к липидным мембранам являются дифракция, малоугловое рассеяние и рефлектометрия.

Дифракция тепловых нейтронов от ориентированных многослойных липидных мембран являлась первым методом, который стал применяться для исследования наноструктуры липидного бислоя [19]. Это связано с двумя причинами. Первая – решение фазовой проблемы. Внутренняя структура липидного бислоя может быть определена по функции распределения плотности длины рассеяния в направлении нормали к мембране. Распределение плотности длины рассеяния нейтрона (фотона) в элементарной ячейке в направлении нормали к плоскости мембраны вычисляется в относительных единицах как фурье-синтез

$$\rho_z(x) = A + B \cdot \sum_{h=1}^{h_{\max}} \alpha_h \cdot |F_h| \cdot \cos\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot h \cdot x}{d}\right) \quad (1)$$

Здесь A и B – неизвестные константы, F_h – структурный фактор, определяемый по интенсивности дифракционных пиков, d – период повторяемости мембраны, определяемый по положению дифракционных пиков, h – порядок дифракционного отражения и α_h – фазовый множитель.

В случае рентгеновского излучения функция $\rho_z(x)$ пропорциональна плотности распределения электронов $\rho_z^e(x)$

$$\rho_z(x) = r_D \cdot \rho_z^e(x) \quad (2)$$

здесь $r_D = e^2/mc^2 = 2,82 \cdot 10^{-13}$ см – классический (томсоновский) радиус электрона. Знание $\rho_z^e(x)$ позволяет определить толщину мембраны, толщину полярной области липидов, толщину области углеводородных хвостов, а также ответить на вопрос о влиянии различных веществ на параметры мембраны.

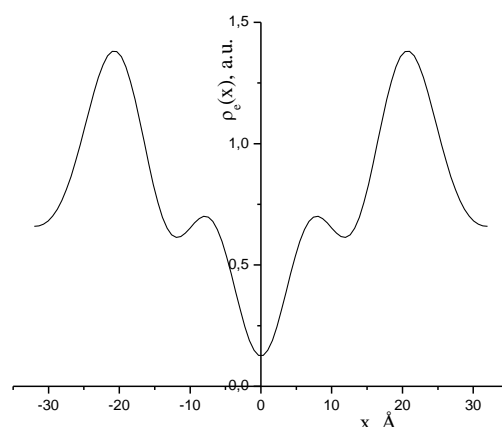
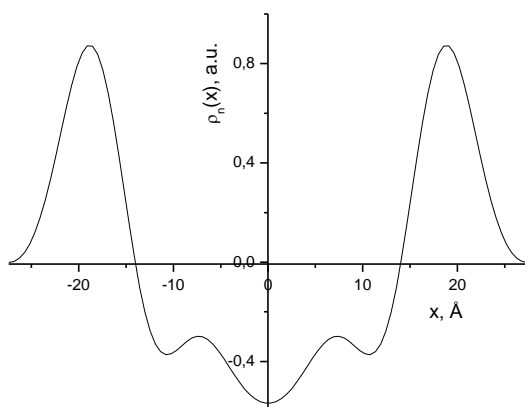


Рис. 4.1. Распределение плотности длины рассеяния нейтрона в направлении нормали к бислою $\rho_n(x)$ в мультислойной мембране ДМФХ, измеренное при относительной влажности 60%, $T=32^\circ\text{C}$ и 8% содержании D_2O в парах воды.

Рис. 4.2. Распределение плотности электронов $\rho_e(x)$ в направлении нормали к бислою ДПФХ. Измерения проводились на мультислойных везикулах ДПФХ в избытке воды при $T=20^\circ\text{C}$.

Во втором случае – случае дифракции нейтронов – $\rho_z(x)$ соответствует плотности длины рассеяния нейтрона на ядрах, входящих в состав липидной молекулы. Длины рассеяния тепловых нейтронов на ядрах определяются экспериментально и являются табличными величинами.

Если монослои, образующие бислои, одинаковы, то мембрана обладает центральной симметрией и фазовый множитель может принимать только два значения +1 или -1. В этом случае проблема определения фазового множителя сводится к определению знака структурного фактора F_h . В нейтронном дифракционном эксперименте проблема определения знака структурного фактора решается за счет вариации контраста. Для этого измерения проводятся при гидратации мембраны водой с различным процентным содержанием H_2O и D_2O [20]. Достаточно провести

измерения при трех различных значениях содержания D₂O, например 8%, 20% и 50% по весу. На рис. 4.1 показана плотность распределения длины рассеяния нейтрона для мембраны ДМФХ. Дополнительно, в нейтронном эксперименте применение вариации контраста позволяет определять функцию распределения воды в направлении нормали к бислою. Применение липидов с дейтерированными метками позволяет определять позиции этих меток с высокой точностью.

В случае рентгеновского излучения определение знаков структурных факторов требует проведения серии дополнительных измерений и восстановления из этих измерений кривой $F(q)$ по теореме Шеннона [21]. На рис. 4.2 представлено распределение плотности электронов, измеренное для мембраны ДПФХ в избытке воды на установке Дикси Курчатовского центра синхротронного излучения.

Вторая причина применения дифракции нейтронов начиная с 70 годов прошлого века связана с тем, что нейтронные источники реакторного типа с высокими потоками на образце (10^6 - 10^7 н/см²·сек) появились существенно ранее синхротронных центров по применению рентгеновского излучения для исследований в области биофизики. К концу 20 века большая часть исследований структуры фосфолипидных мембран сместилась в область применения синхротронного рентгеновского излучения. Несмотря на это, новые липидные структуры или решение сложных структурных задач требуют применения дифракции нейтронов на ориентированных липидных мембранах.

Применение нейтронов эффективно при исследовании дифракции от ориентированных на кварцевых подложках многослойных мембран, которые гидратируются парами воды и, соответственно, находятся в частично гидратированном состоянии. Биологическая мембрана находится в избытке воды. Поэтому более важным является исследование мембран фосфолипидов в полностью гидратированном состоянии. К таким объектам относятся многослойные везикулы в избытке воды (липосомы). Интенсивности современных источников нейтронов оказывается недостаточно для исследования неориентированных многослойных везикул в избытке воды. Здесь наиболее эффективно применение источников синхротронного излучения (СИ). Спектрометры на установках СИ имеют три преимущества по сравнению с нейтронными. Первое – более высокие потоки фотонов, второе – высокая когерентность пучка, третье – существенно лучшее разрешение в пространстве векторов рассеяния.

Малоугловое рассеяние нейтронов и рентгеновских лучей позволяет исследовать мицеллярные и везикулярные системы в большом избытке воды, когда концентрация липидов в воде составляет 1-2 % по весу. Для улучшения контраста и снижения некогерентного фона в экспериментах на нейтронных источниках применяют тяжелую воду. Улучшение контраста при использовании рентгеновского излучения возможно за счет увеличения плотности электронов в водных растворах дисахаридов. Применение дисахаридов для контрастирования малоуглового рассеяния рентгеновских лучей подробно описано в работах [7, 22]. В настоящее время в Институте биомедицинской химии РАН разработаны транспортные фосфолипидные системы (нанофосфолип, доксолип, фосфоглив), которые будут выпускаться в лиофилизированном виде как фосфолипидные везикулы, заключенные в матрицу из мальтозы. Применение малоуглового рассеяния рентгеновских лучей для нанодиагностики таких систем на основе методик, разработанных в ЛНФ ОИЯИ, является перспективным направлением деятельности ближайшего будущего. Более подробно применение и развитие методов малоуглового рассеяния на нейтронных и синхротронных источниках описано в параграфах 5 и 8.

Рентгеновская и нейтронная рефлектометрия являются методами исследования липидных монослоев (лэнгмюровских пленок) на водных подложках. Наиболее значительные результаты получены на синхротронных источниках при использовании излучения от виглера. Низкий некогерентный фон позволяет получать рефлектометрическую кривую в широком диапазоне векторов рассеяния вплоть до максимального значения $q=0.8\text{\AA}^{-1}$, а высокая интенсивность – проводить измерения скользящей дифракции от углеводородных цепей. Квазимолекулярный метод описания рефлектометрической кривой позволяет определять положение отдельных молекул и молекулярных групп [23]. Методом рентгеновской рефлектометрии была решена задача о расположении молекул диметилсульфоксида (ДМСО) в липидном бислое [24]. Было показано, что молекулы ДМСО проникают в область углеводородных хвостов, что объясняет высокую проникающую способность молекул ДМСО через липидную мембрану. Недостатком исследования липидных монослоев на водной подложке является зависимость фазового состояния монослоя от поверхностного давления, а также вопрос идентичности структуры монослоя структуре липидной мембраны. На рис. 4.3 изображена зависимость площади A , приходящейся на одну молекулу липида,

от величины поверхностного давления липидной пленки π (π -A изотерма), а на рис. 4.4 – рентгеновская рефлектометрическая кривая от монослоя ДПФХ на поверхности водного раствора ДМСО с мольной фракцией $X_{DMSO} = 0.01$, $\pi=15\text{mN/m}$, $T=20^\circ\text{C}$.

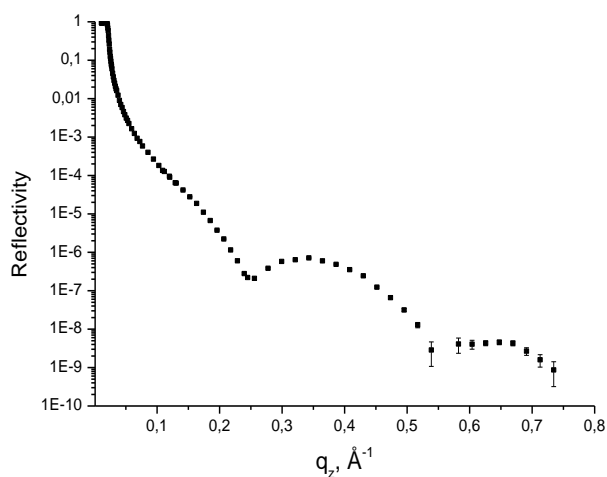
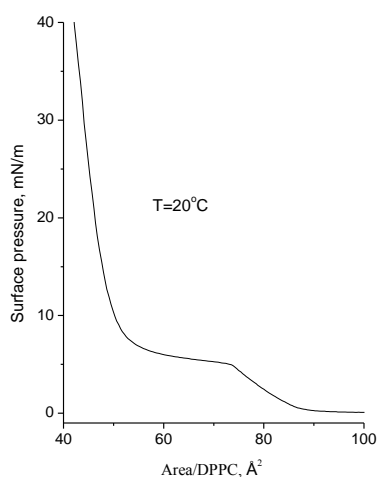


Рис. 4.3. Зависимость площади, приходящейся на молекулу ДПФХ, от величины поверхностного давления липидного монослоя на поверхности воды (π -A изотерма).

Рис. 4.4. Рентгеновская рефлектометрическая кривая от монослоя ДПФХ на поверхности водного раствора ДМСО с $X_{DMSO} = 0.01$, $\pi=15\text{mN/m}$, $T=20^\circ\text{C}$.

Квазиупругое рассеяние нейтронов широко и успешно применяется как для исследования динамики белков в водных растворах, так и для исследования влияния различных растворителей на динамику молекул воды. Применение квазиупругого рассеяния нейтронов к проблемам исследования динамических свойств липидного бислоя наиболее эффективно при использовании метода спин-эхо, который позволяет определять упругие свойства липидного бислоя однослойных везикул [25]. Определение модуля упругости бислоя везикул имеет большое значение при создании везикулярных наночастиц – переносчиков лекарств через кожу. Основным физическим требованием к таким переносчикам является наличие высоких деформационных свойств, что позволяет везикулам проникать через дефекты, имеющиеся в липидной матрице верхнего слоя кожи, размеры которых существенно меньше размера везикул.

Исследования липидных мембран в Лаборатории нейтронной физики начались в восьмидесятых годах прошлого века с вводом в действие импульсного реактора ИБР-2,

потоки нейтронов от которого позволяли проводить исследования жидких кристаллов. Основная часть исследований выполнялась на высокопоточном дифрактометре ДН-2 методом дифракции нейтронов на многослойных ориентированных мембранах фосфолипидов. Возможности методики по времени пролета на импульсном источнике позволяют исследовать кинетические процессы. Одной из первых работ, выполненных на реакторе ИБР-2 по липидной тематике, было исследование кинетики сорбции и десорбции воды в многослойных мембранах лецитинов [26]. Было показано, что эти процессы с хорошей точностью подчиняются экспоненциальному закону и имеют, как правило, две или более стадий, различающихся характерным временем. Изучение сорбции и десорбции воды в мультислоях из лецитина показало, что существует быстрая фаза гидратации с характерным временем $\tau_c \approx 1$ мин и медленная фаза гидратации с τ_c до десятков минут. Также было показано, что быстрая фаза процесса изотопического замещения легкой воды на тяжелую $\tau_c (\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D}_2\text{O}) = 92$ сек больше, чем при обратном замещении $\tau_c (\text{D}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}) = 71$ сек. Проведенные эксперименты демонстрировали различную скорость диффузии легкой и тяжелой воды. Последующие исследования, выполненные в 2005 году, показали, что эти различия связаны с различием в силах водородных и дейтериевых связей между молекулами воды и полярной головой фосфолипидов [27]. В экспериментах, выполненных в 1986 году, регистрация нейтронов осуществлялась одномерным позиционно-чувствительным детектором. Для определения характерных времен регистрировалось изменение во времени структурного фактора только одного, наиболее интенсивного дифракционного пика, что возможно и в эксперименте на дифрактометре с монохроматическим пучком нейтронов. Однако, еще в первых нейтронографических исследованиях на дифрактометре ДН-2 было показано, что на дифрактометре по времени пролета на импульсном источнике нейтронов возможна одновременная регистрация нескольких порядков отражения от ламеллярной структуры. При этом появляется возможность наблюдения кинетических структурных изменений по восстанавливаемой из дифракционных спектров функции $\rho_n(x)$. Метод дифракции в реальном времени на импульсном реакторе ИБР-2 описан в параграфе 6.

Исследованию флуктуаций структуры липидной многослойной мембраны и определению из экспериментально измеряемой формы дифракционного пика свойств липидного бислоя и сил межмембранного взаимодействия посвящен обзор [28].

В период 1987 – 1991 гг. методом малоуглового рассеяния нейтронов на установке ЮМО были выполнены исследования дефектов, возникающих в липидном бислое лецитина и ДПФХ [29]. Исследовались многослойные мембраны, ориентированные на кварцевых подложках и частично гидратированные тяжелой водой. Было установлено наличие дефектов в упаковке углеводородных хвостов, которые приводили к образованию кластерной структуры липидного монослоя с размером кластера 24\AA в плоскости мембраны. Предложенная теория образования дефектов предполагает, что дефекты в упаковке углеводородных хвостов не пронизывают липидный бислой, то есть не формируют мембранных пор (размер дефекта в направлении нормали бислоя составляет 7\AA). Площадь поверхности мембраны, занимаемая дефектами составляет 9%. Теория образования пор в полностью гидратированном фосфолипидном бислое была развита в работах В.Ф. Антонова в 2003-2005 годах [30]. Исследование геометрических характеристик пор, их зависимости от фазового состояния липидного бислоя, влияние холестерина и детергентов на процесс порообразования в фосфолипидном бислое является интересной задачей будущего, требующей проведения прецизионных экспериментов.

§5. Однослойные везикулы и переносчики лекарств. Метод разделенных формфакторов.

Производство транспортных наносистем и нанолекарств на основе фосфолипидов показало, что методы, описанные в параграфе 3, не могут ответить на ряд важных вопросов. К таким вопросам относится морфология частицы (мицелла или везикула), форма частицы, полидисперсность везикулярной популяции, место локализации лекарства в липидном бислое. Ответы на эти вопросы являются предметом специализации МУРН. Но в малоугловом рассеянии нейтронов и рентгеновских лучей методы анализа структуры были развиты для глобулярных частиц (белок, мицелла, полимерный гауссов клубок), имеющих один характерный размер [31]. Липидная везикула имеет два характерных размера: радиус везикулы R и толщина липидного бислоя d_m , которые существенно отличаются друг от друга, как изображено на рис. 5.1. Информация о форме и размерах везикул находится в начале кривой рассеяния, а информация о толщине липидного бислоя и его внутренней структуре находится в конце кривой рассеяния.

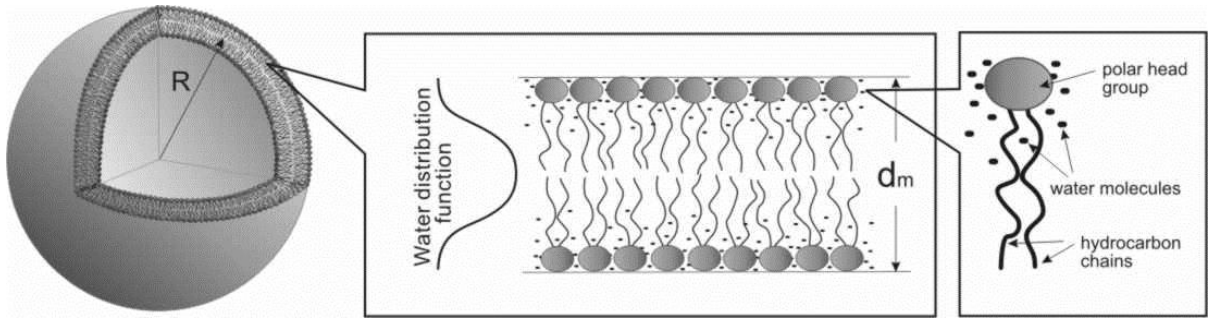


Рис. 5.1. Изображение структуры однослойных везикул. Радиус везикул R в 5 и более раз превышает толщину липидного бислоя d_m . Функция распределения воды описывает расположение молекул воды в бислое.

В работах [37-40] был развит метод разделенных формфакторов (РФФ) для исследования везикулярных систем методом малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей. Применение этого метода к исследованию однослойных везикул ДМФХ позволило впервые получить важную информацию о свойствах везикулярных фосфолипидных систем [40-41]. Приведем основные положения метода.

Макроскопическое когерентное сечение рассеяния нейтрона монодисперсной популяцией везикул определяется выражением [31]

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega_{mon}}(q) = n \cdot A^2(q) \cdot S(q), \quad (3)$$

где n – количество везикул в единице объема, q – модуль вектора рассеяния, $A(q)$ – амплитуда рассеяния нейтрона одной везикулой, $S(q)$ – структурный фактор популяции везикул. Проблема расчета структурного фактора решена в [39], где показано, что $S(q) \approx 1$ для концентрации липидов в образце 1% по весу. В РФФ методе показано, что амплитуда рассеяния для везикулы записывается в виде:

$$A_{ves}(q) = 4\pi \cdot \frac{R^2}{qR} \cdot \sin(qR) \cdot \int_{-d_m/2}^{d_m/2} \rho_c(x) \cdot \cos(qx) \cdot dx + 4\pi \cdot \frac{R}{qR} \cdot \cos(qR) \cdot \int_{-d_m/2}^{d_m/2} \rho_c(x) \cdot x \cdot \sin(qx) \cdot dx \quad (4)$$

Здесь: d_m – толщина мембраны (липидного бислоя), R – радиус везикулы, $\rho_c(x) = \rho(x) - \rho_{D_2O}$ – контраст, $\rho(x)$ – плотность длины рассеяния нейтрона вдоль нормали к плоскости бислоя, ρ_{D_2O} – плотность длины рассеяния нейтрона растворителем (тяжелой водой). В выражении (4) параметр размера R отделен от параметров бислоя d_m и $\rho(x)$. При этом появляется возможность описания внутренней структуры бислоя с помощью любых приближений функции $\rho(x)$. Для липидных везикул выполняется условие $R \gg d_m/2$. Тогда можно написать [37, 40], что

$$A_{SFF}(q) = 4\pi \cdot \frac{R^2}{qR} \cdot \sin(qR) \cdot \int_{-d_m/2}^{d_m/2} \rho_c(x) \cdot \cos(qx) \cdot dx. \quad (5)$$

Мы получили выражение для амплитуды рассеяния, в котором размер везикулы (радиус) и внутренняя структура бислоя (интеграл) разделены на два сомножителя. Разделение на два сомножителя важно, так как измеряемая в эксперименте интенсивность рассеяния пропорциональна квадрату амплитуды рассеяния. Теперь макроскопическое сечение рассеяния для монодисперсной популяции везикул записывается как

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega_{mon}}(q) = n \cdot F_s(q, R) \cdot F_b(q, d) \cdot S(q), \quad (6)$$

где $F_s(q, R)$ – формфактор сферической поверхности с радиусом R

$$F_s(q, R) = \left(4\pi \cdot \frac{R^2}{qR} \cdot \sin(qR) \right)^2, \quad (7)$$

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

$$F_b(q, d) = \left(\int_{-d_m/2}^{d_m/2} \rho_c(x) \cdot \cos(qx) \cdot dx \right)^2. \quad (8)$$

Выражение (6) составляет основу метода разделенных формфакторов. Разделение формфактора формы везикулы и формфактора бислоя позволяет описывать деформацию формы везикулы. Для везикул с формой вытянутого эллипсоида вращения

с полуосями $(a, a, \varepsilon a)$ формфактор эллиптической поверхности записывается в виде [40]

$$F_E(q, a) = \int_0^1 A_E^2 \left(q \cdot a \cdot \sqrt{1 + x^2 \cdot (\varepsilon^2 - 1)} \right) dx, \quad (9)$$

где функция $A_E(z)$ записывается как

$$A_E(z) = 4\pi \cdot \varepsilon \cdot a^2 \cdot \frac{\sin(z)}{z}. \quad (10)$$

Липидная везикулярная система (популяция везикул) обладает полидисперсностью по размерам. Распределение везикул около среднего значения радиуса $\langle R \rangle$ (или среднего значения малой полуоси эллипса $\langle a \rangle$) описывается несимметричным распределением Шульца [42, 43]

$$G(R, \langle R \rangle) = \frac{R^m}{m!} \cdot \left(\frac{m+1}{\langle R \rangle} \right)^{m+1} \cdot \exp \left[-\frac{(m+1) \cdot R}{\langle R \rangle} \right], \quad (11)$$

где m – коэффициент полидисперсности. Относительное стандартное отклонение радиуса везикул определяется как

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{m+1}} \quad (12)$$

и характеризует полидисперсность везикулярной популяции.

На рис. 5.2 представлено гидрофобно-гидрофильное приближение, используемое для описания функции $\rho(x)$, а на рис. 5.3 - спектр малоуглового рассеяния нейтронов и расчетная кривая, из которой определялись форма везикулы, полидисперсность размера, толщина липидного бислоя, толщина гидрофобной части бислоя. Полный набор параметров липидного бислоя, определенных на основе РФФ метода представлен в таб. 5.1 для везикул, приготовленных экструзией через поры диаметром 500Å и 1000Å. Применение РФФ метода к популяции везикул ДМФХ в различных фазовых состояниях [37, 40] продемонстрировало его высокую эффективность, что позволяет применять в будущем этот метод для исследования морфологии и наноструктуры везикулярных переносчиков лекарств (фосфолипидная транспортная наносистема) в виде фосфолипидных наночастиц.

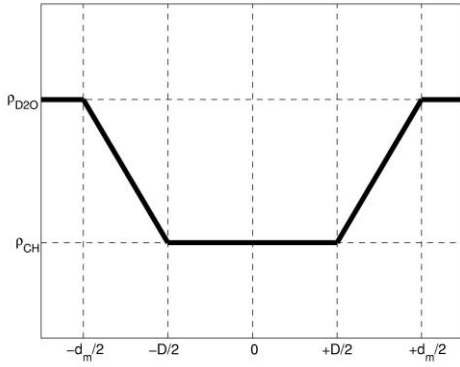


Рис. 5.2. Гидрофобно-гидрофильное приближение плотности длины рассеяния нейтрона вдоль нормали к плоскости бислоя. Свободные параметры: d_m – толщина бислоя, D – толщина гидрофобной части бислоя.

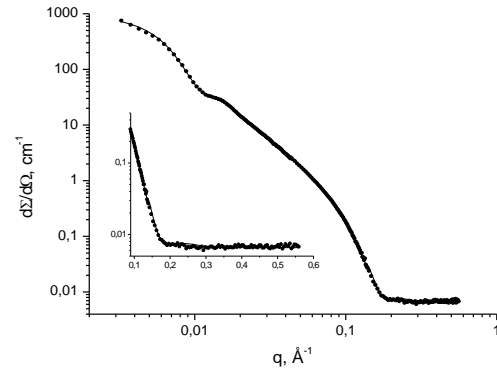


Рис. 5.3. Экспериментальное макроскопическое сечение рассеяния нейтронов от популяции ОСВ при $T = 30^\circ\text{C}$ (точки) и расчетная кривая в ГГ приближении. Вставка показывает более детально кривую при больших значениях q .

Таб. 5.1. Результаты расчетов для везикул ДМФХ в L_α фазе ($T=30^\circ\text{C}$): $\langle a \rangle$ – среднее значение малой полуоси вытянутого эллипсоида вращения, ε – отношение большой и малой полуоси эллипса, $\langle R \rangle$ – средний радиус везикул для $\varepsilon \equiv 1$, σ – полидисперсность везикул (относительное среднеквадратичное отклонение радиуса или малой полуоси эллипса), d_m – толщина мембраны (липидного бислоя), D – толщина гидрофобной части липидного бислоя, N_w и A – количество молекул воды и площадь мембранной поверхности на одну молекулу ДМФХ.

$\langle R \rangle$ или $\langle a \rangle$, Å	ε	σ , %	d_m , Å	D , Å	N_w	A , Å ²
275.6	1	27	47.8±0.2	20.5±0.3	11.9±0.3	61.0±0.4
266	1.11	26	48.9±0.2	19.9±0.4	12.8±0.3	60.7±0.5
450	1	48	45.5±0.6	20.8±0.4	10.8±0.4	62.6±1.0

Методом РФФ была впервые определена 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 : $d_m=48.9\pm0.9$ Å и $N_w = 12.8\pm0.3$ для $R\approx 250$ Å, $d_m=45.5\pm0.6$ Å и $N_w = 10.8\pm0.4$ для $R\approx 500$ Å, $d_m=44.2$ Å, $N_w = 7.2$ для $R=\infty$. Также было доказано, что форма однослойных везикул не является сферической. Отклонение формы везикулы от сферической более существенно в $L_{\beta'}$ и $P_{\beta'}$ фазах ($\varepsilon=1.6$), чем в L_α фазе ($\varepsilon=1.1$) [40].

Важнейшей функцией плазматической мембраны клетки является её проницаемость для молекул воды. Диффузия воды на плоских однослойных липидных мембранах ДПФХ происходит через поры диаметром 10-17 Å, образуемых в липидном бислое при наложении электрического поля или в момент фазового перехода из жидкокристаллической L_α фазы в гель L_β' фазу. При этом на 1 мм² плоской поверхности мембраны ДПФХ образуется около 50 пор [30]. Поверхность, занимаемая порами, составляет всего 10⁻⁸% поверхности мембраны. Поэтому прямое измерение их размеров является нетривиальной задачей. Однако косвенно информацию о порах можно получать, измеряя другие параметры: например, электрический ток через мембрану, диффузию воды, функцию распределения воды.

Применение метода РФФ позволило рассчитать функцию распределения воды в липидном бислое однослойной везикулы ДМФХ в L_α фазе. Было показано, что вероятность нахождения молекул воды в середине бислоя не равна нулю, как изображено на рис. 5.4 [41]. Полученные результаты принципиально отличаются от распределения воды в плоских многослойных мембранах. Исследования функции распределения воды, выполненные на многослойных мембранах ненасыщенного липида ПОФХ методом дифракции нейтронов, показали, что молекулы воды не проникают в область углеводородных хвостов [55].

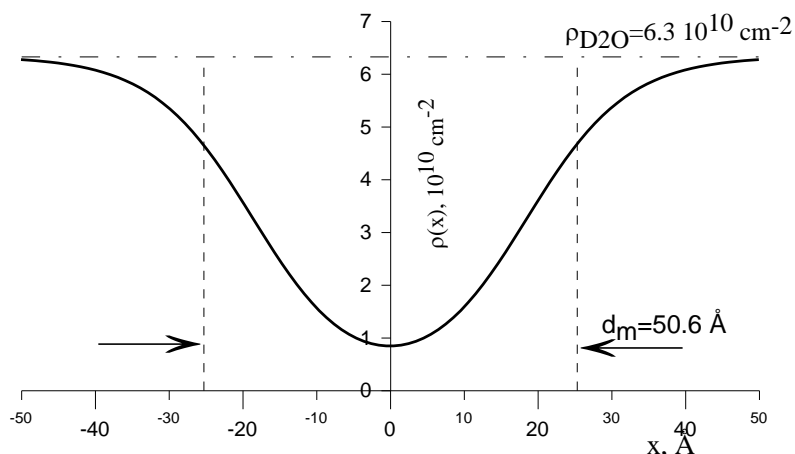


Рис. 5.4. Плотность длины рассеяния молекул D_2O в направлении нормали к липидному бислою однослойной липидной везикулы ДМФХ со средним радиусом $\langle R \rangle = 272 \text{ \AA}$ в большом избытке воды (D_2O). $T = 30^\circ \text{C}$ (L_α фаза). Вертикальные пунктирные линии изображают границу липидного бислоя.

Отличие в диффузии воды через однослойные и многослойные мембраны фосфолипидов носит принципиальный характер. Плазматическая мембрана является однослойной, поэтому исследование структуры и свойств многослойных мембран дифракционными методами не всегда даёт правильную информацию о физических свойствах плазматической мембраны. Наиболее адекватным и, одновременно, более сложным является исследование однослойных мембран (липидных бислоев) в избытке воды. Метод РФФ позволяет выполнять такие исследования на современных высокопоточных нейтронных источниках, оснащенных установками малоуглового рассеяния с низким значением некогерентного фона.

§6. Дифракция в реальном времени.

6.1 Дифракция в реальном времени на синхротронных источниках.

Процессы охлаждения и хранения биологической ткани при низких температурах важны как в медицине (хранение имплантатов, крови и т.д.), так и в микробиологии (хранение коллекции бактерий). Здесь основной проблемой является наличие свободной воды в охлаждаемом объекте, которая при кристаллизации разрушает клетку. Диффузия свободной воды при охлаждении идет через плазматическую мембрану клетки в физиологический раствор. Задачей криобиологии является поиск криопротекторов и разработка технологии охлаждения, обеспечивающей быструю диффузию свободной воды через клеточную мембрану в окружающий раствор.

Для исследований использовались три типа фосфолипидов: димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) и дистеароилфосфатидилхолин (ДСФХ). Эти липиды имеют одинаковую полярную голову и отличаются длиной углеводородной цепочки. Количество атомов углерода в углеводородной цепочке молекул ДМФХ, ДПФХ и ДСФХ составляет соответственно 14, 16 и 18. Исследования проводились методом порошковой рентгеновской дифракции на канале D22 синхротронного источника DCI (LURE, Франция). Для получения необходимой информации важным является приготовление образцов. Тройная система фосфолипид/ криопротектор/ вода была изготовлена так, чтобы количество связанной воды, свободной воды и воды в объемном водном растворе было соизмеримо. Для двойной системы ДПФХ/ вода количество связанной воды на молекулу ДПФХ в гель фазе равно 10.8, а количество свободной воды на молекулу ДПФХ равно 4. В

мультислойных липосомах ДПФХ, приготовленных с весовым соотношением липид вода 1/1 (система 1/1), общее количество воды на молекулу ДПФХ составляет 40.8, из которых 26 молекул находятся в объемном водном растворе, окружающем липисомы и образующем избыток воды. Аналогично системе 1/1 приготавливались тройные системы.

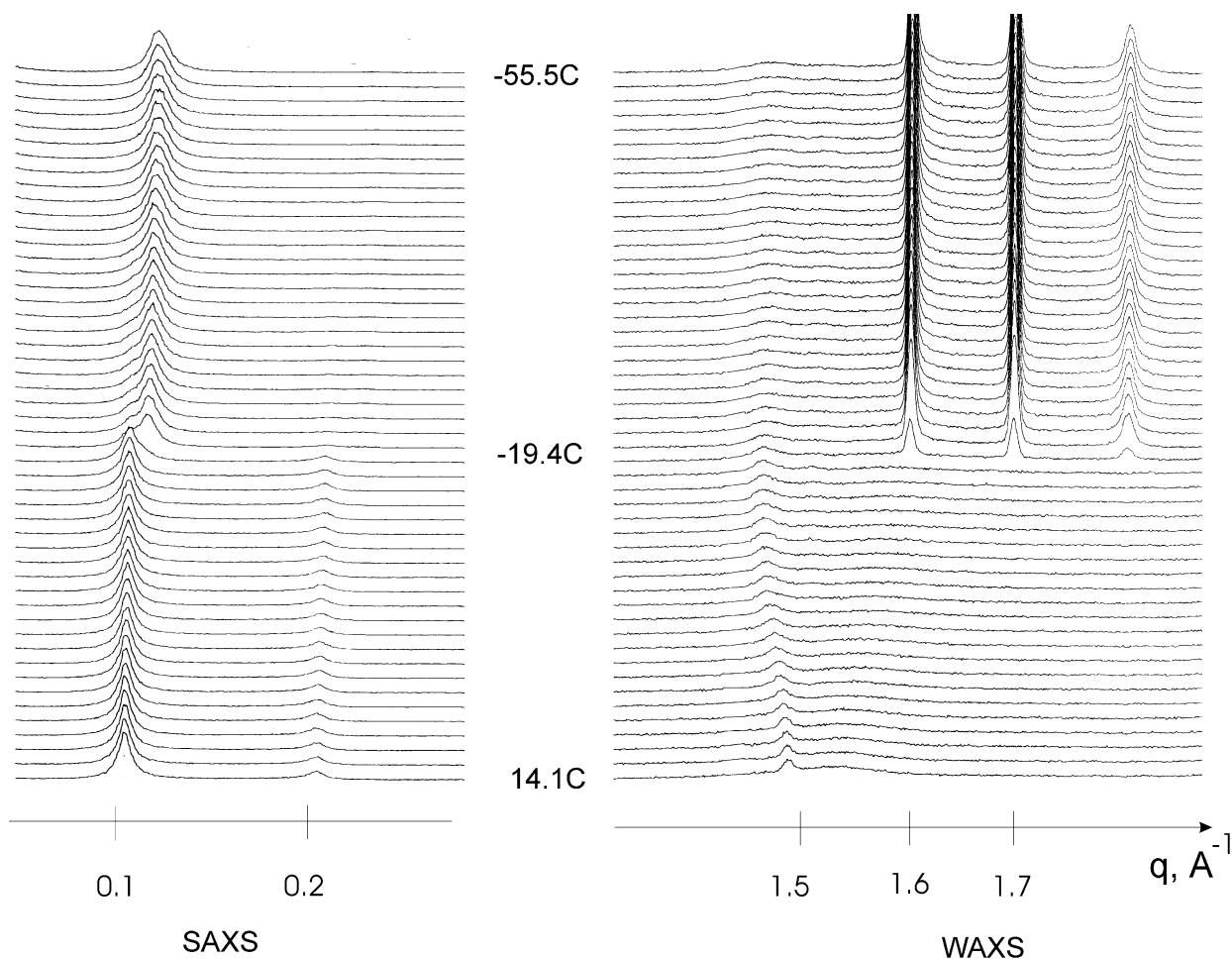


Рис.6.1. Последовательность SAXS и WAXS дифракционных спектров записанных в реальном времени при охлаждении мультислойных везикул ДПФХ в избытке воды. SAXS спектры имеют два дифракционных пика от мультислойной структуры ДПФХ. WAXS спектры соответствуют дифракции от двухмерной решётки углеводородных хвостов (маленький пик при $T = 14.1^{\circ}\text{C}$) и дифракции от гексагонального льда (три пика при $T_{ice} = -19.4^{\circ}\text{C}$). Скорость охлаждения $1.5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Время набора одного спектра 1°мин .

На рис. 6.1 представлена последовательность SAXS и WAXS дифракционных спектров, записанных в режиме реального времени на установке D22 при охлаждении мультислойных везикул ДПФХ в избытке воды, от температуры $+14.1^{\circ}\text{C}$ до температуры -55.5°C . Для записи спектров использовалось два детектора: SAXS и

WAXS. Малоугловая дифракция (SAXS) в интервале температур от $+14.1^{\circ}\text{C}$ до -19.4°C соответствует началу кристаллизации геля $L_{\beta'}$ фазы в L_c фазу. Сдвиг дифракционного пика при $T = -19.4^{\circ}\text{C}$ в сторону больших значений вектора рассеяния q соответствует уменьшению периода повторяемости мембраны d на величину $\Delta d = 5.9 \pm 0.6 \text{ \AA}$. Резкое (за время 1-2 мин) уменьшение периода повторяемости мембраны связано с образованием льда в объемной воде, окружающей везикулы.

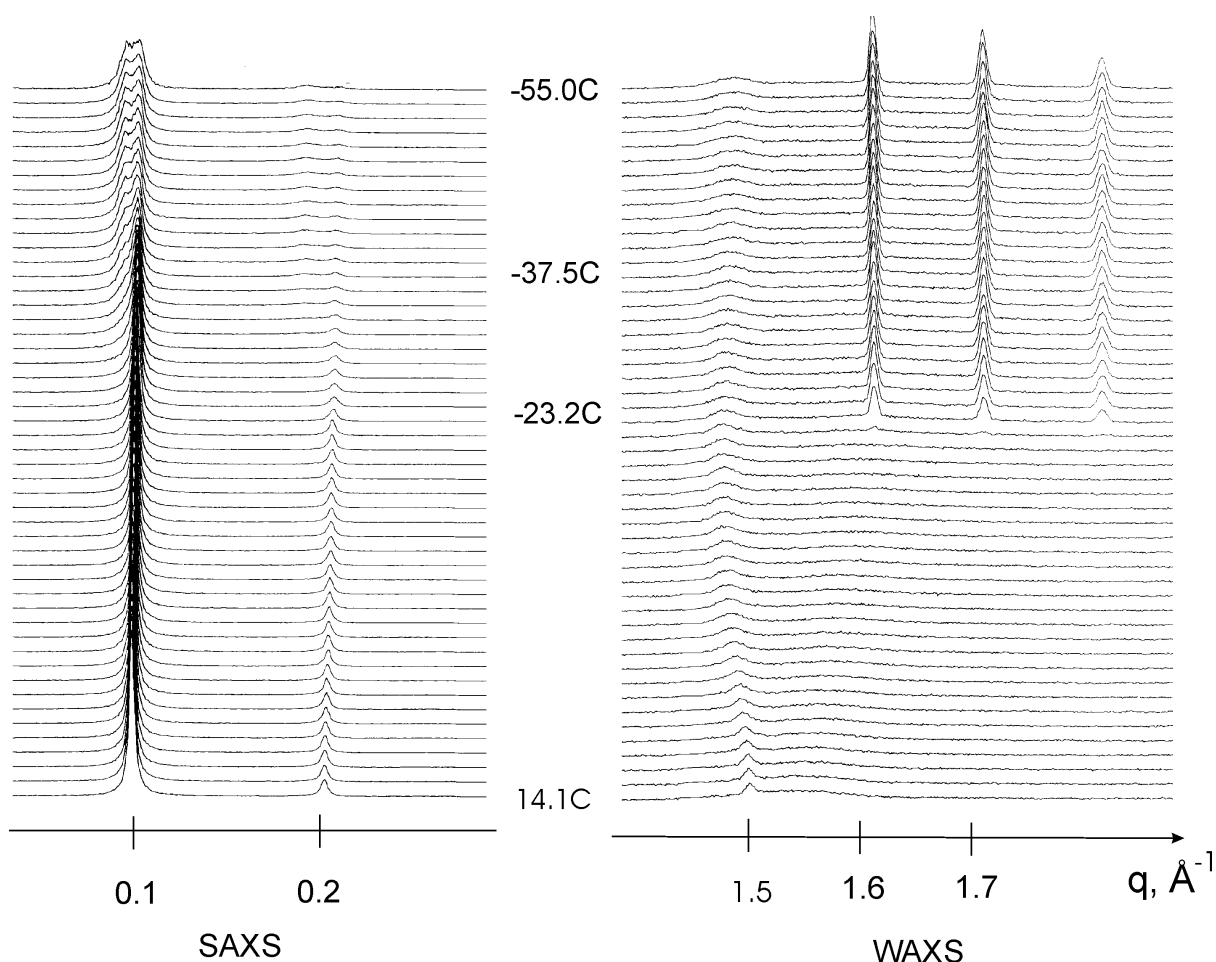


Рис. 6.2. Последовательность SAXS и WAXS дифракционных спектров записанных в реальном времени при охлаждении мультислойных везикул тройной системы ДПФХ/ДМСО/ вода с $X_{\text{DMSO}}=0.05$. SAXS спектры соответствуют дифракции от мультислойной структуры ДПФХ. WAXS спектры соответствуют дифракции от двухмерной решётки углеводородных хвостов (маленький пик при $T = 14.1^{\circ}\text{C}$) и дифракции от гексагонального льда (три пика при $T_{\text{ice}} = -23.2^{\circ}\text{C}$). Скорость охлаждения $1.5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Время набора одного спектра 1 мин.

Спектр широкоугольной дифракция (WAXS) при $T = -19.4^{\circ}\text{C}$ демонстрирует образование трех дифракционных пиков, соответствующих гексагональной решетке кристаллов льда с межплоскостными расстояниями решетки: 3.9°Å , 3.6°Å , 3.4°Å . При

$T = 14.1^\circ\text{C}$ широкоугольная дифракция от углеводородных хвостов демонстрирует (2,0) пик при $q = 1.49 \pm 0.002 \text{ \AA}^{-1}$ и широкое (1,2) «плечо» при $q = 1.53 \pm 0.01 \text{ \AA}^{-1}$. Положение этих двух дифракционных рефлексов соответствует прямоугольной ячейке с постоянными решетки $a = 8.46 \pm 0.01 \text{ \AA}$, $b = 9.38 \pm 0.07 \text{ \AA}$, что соответствует упаковке углеводородных хвостов ДПФХ в гель $L_{\beta'}$ - фазе. Рефлексы (2,0) и (2,1) монотонно раздвигаются друг от друга при охлаждении до температуры образования льда, достигая положения $1.46 \pm 0.002 \text{ \AA}^{-1}$ и $1.58 \pm 0.002 \text{ \AA}^{-1}$, что соответствует прямоугольной ячейке $a = 8.61 \pm 0.01 \text{ \AA}$ и $b = 8.97 \pm 0.08 \text{ \AA}$. Происходит медленное преобразование $L_{\beta'}$ - фазы в кристаллическую L_c фазу.

На рис. 6.2 представлены SAXS и WAXS дифракционные спектры, записанные в реальном времени при охлаждении мультислойных везикул тройной системы ДПФХ/ ДМСО/ вода с $X_{\text{DMSO}} = 0.05$. При температуре -23.2°C происходит образование льда без изменения величины периода повторяемости. При температуре -37.5°C возникает новая мультиламеллярная L_{sr} фаза, которая сосуществует с основной L_c фазой при дальнейшем охлаждении. Образование фазы с большим содержанием растворителя зависит от типа криопротектора (при использовании глицерина L_{sr} фаза не образуется) и от длины углеводородной цепочки фосфолипида. L_{sr} фаза образуется при длине цепи, большей или равной 16.

Главным результатом представленных экспериментов является обнаружение новой L_{sr} фазы в тройных системах фосфолипид/ ДМСО/ вода. На сегодня не существует теоретического объяснения этого явления. Скорее всего, оно связано со спецификой взаимодействия молекул ДМСО с углеводородными цепочками.

6.2 Дифракция в реальном времени на импульсных источниках нейтронов.

Основным преимуществом кинетических экспериментов на синхротронных источниках является возможность фиксировать структурные изменения с временными характеристиками порядка минуты. На рис. 6.1 видно, что при $T = -19.4^\circ\text{C}$ в момент образования льда происходит диффузия свободной воды за время 1 – 2 мин. из межмембранного пространства многослойных липосом. Применение метода времени пролета на импульсных реакторах позволяет проводить измерения в большем объеме обратного пространства по сравнению с дифракционными измерениями, выполняемыми на монохроматических пучках синхротронных источников или

реакторов постоянной мощности. Наиболее перспективно исследование кинетических процессов, временные характеристики которых составляют десятки минут и более. К таким процессам относится диффузия связанной воды в многослойных фосфолипидных мембранах, ориентированных на кварцевых подложках и частично гидратированных. В таких образцах гидратация осуществляется, в основном, связанной водой, которая, в свою очередь, состоит из слабосвязанной и сильносвязанной воды – как изображено на рис. 6.3.

На дифрактометре по времени пролета ДН-2 импульсного реактора ИБР-2 была проведена одновременная регистрация нескольких (до пяти, при минимальном времени накопления статистики в 3 минуты) порядков отражения от ламеллярной структуры многослойной мембраны ДПФХ, ориентированной на кварцевой подложке, как изображено на рис. 6.4 [47]. Исследовалась кинетика диффузии воды для случая гидратации мембраны ДПФХ парами воды при переходе из состояния с комнатными условиями к высокой относительной влажности (RH) паров воды и затем дегидратации, при переходе к низкой относительной влажности: $[46\% RH] \rightarrow [98\% RH] \rightarrow [58\% RH]$.

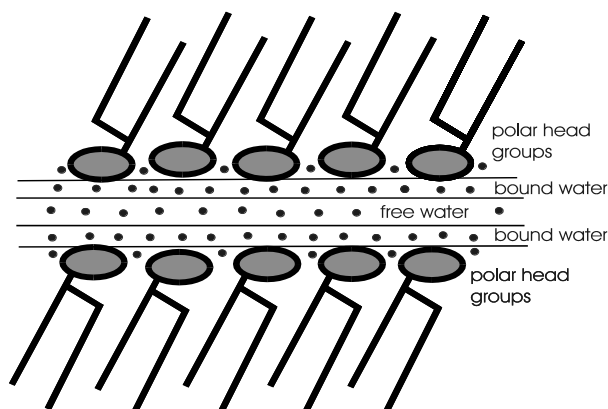


Рис. 6.3. Расположение молекул воды внутри межмембранного пространства. Схематично изображено расположение трех типов молекул воды: свободной (в центре межмембранного пространства), слабосвязанной (в межмембранном пространстве около области полярных голов), сильносвязанной (в области полярных голов липидных молекул).

Одновременная регистрация нескольких порядков отражения позволяет вычислять плотность распределения нейтронов в соответствии с уравнением (1) как функцию времени и, соответственно, прослеживать в процессе гидратации – дегидратации последовательность кинетических изменений следующих параметров мембраны: период повторяемости мембраны $d(t)$, толщина липидного бислоя $d_B(t)$, толщина водной прослойки $d_W(t)$, толщина области углеводородных хвостов $d_C(t)$. Анализ, проведенный в [47], показал, что зависимости $d(t)$, $d_B(t)$, $d_W(t)$, $d_C(t)$ хорошо описываются экспоненциальными законами, что позволяет определить временные характеристики кинетических изменений.

Влажность воздуха в камере образца задается парами насыщенных растворов солей. При помещении в камеру раствора, увеличивающего влажность, возникает систематическая ошибка, связанная с медленным увеличением влажности внутри камеры. Процесс дегидратации не имеет такой проблемы, так как открытие камеры мгновенно уменьшает влажность до комнатной. Поэтому временные характеристики, полученные при дегидратации, более важны. Толщина липидной мембраны является суммой двух компонент, $d_B = d_C + d_{PH}$. Характерные времена изменения d_B в начале процесса дегидратации мембраны ($\tau_I = 27$ мин) сильно отличаются от аналогичных характеристик для d_W ($\tau_I = 15$ мин) и d_C ($\tau_I = 18$ мин). Таким образом, кинетика гидратации области полярных голов примерно в два раза медленнее по сравнению с кинетикой гидратации водной прослойки. Отсюда следует вывод о том, что диффузия сильносвязанной воды в липидных мембранах идет в два раза медленнее по сравнению с диффузией слабосвязанной воды.

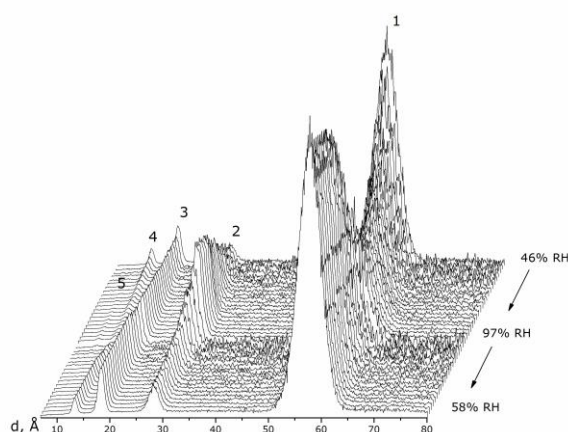


Рис. 6.4. Последовательность нейтронных дифракционных спектров от мембраны ДПФХ, измеренных в реальном времени в процессе гидратации и последующей дегидратации мембраны. Указаны номера порядков отражения. Пятый дифракционный пик становится виден через полтора часа после начала процесса гидратации. Спектр, соответствующий мембране в состоянии равновесия при 58% относительной влажности, содержит четыре видимых дифракционных пика.

§7. Дифракция нейтронов для исследований структуры липидной матрицы верхнего слоя кожи.

Дифракция нейтронов по сравнению с дифракцией рентгеновских лучей имеет важное преимущество, связанное с определением знаков структурных факторов в уравнении (1). По этой причине первые работы на новых структурах следует проводить на нейтронных источниках, а уточнение структуры в избытке воды возможно в

дальнейшем на синхротронных источниках рентгеновского излучения. Именно так исторически развивались исследования фосфолипидных мембран. История повторилась и с исследованиями мембран на основе церамидов. Первая работа, в которой структура модельной мембраны верхнего слоя кожи была определена с хорошим пространственным разрешением, была выполнена методом дифракции нейтронов на дифрактометре V1 Берлинского центра по рассеянию нейтронов в 2005 году [32]. Затем для исследования аналогичной мембраны в избытке воды методом дифракции в реальном времени было применено синхротронное излучение [33]. В настоящее время исследования модельных мембран SC в избытке воды ведутся методом дифракции рентгеновского излучения на спектрометре ДИКСИ синхротронного источника КЦСИиНТ, Москва [34].

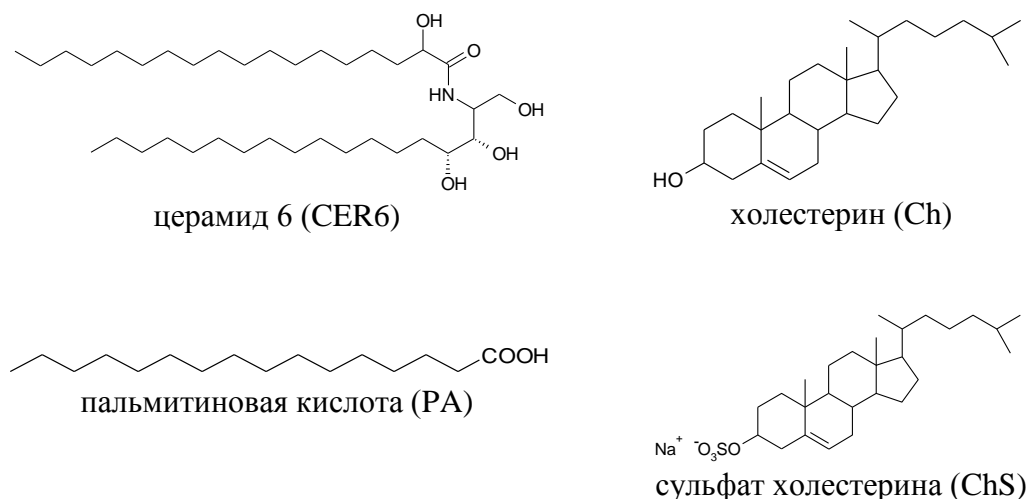


Рис. 7.1. Молекулярная структура компонент модельной мембраны липидной матрицы SC млекопитающих с композицией CER6 /Ch /PA /ChS.

В работе [32] была создана ориентированная на кварцевой подложке модельная мембрана SC, обладающая низкой мозаичностью. При создании этой мембраны использовались четыре основных компонента, входящие в состав липидной матрицы SC. Молекулярная структура липидов, используемых при приготовлении этой мембраны, показана на рис. 7.1.

Создание высокоориентированной мембраны позволило провести измерение пяти порядков отражения от её мультислойной структуры и, соответственно, построить плотность длины рассеяния нейтрона в направлении перпендикуляра к мембране $\rho_s(x)$

(рис. 7.3). Для сравнения на рис. 7.2 представлена функция $\rho_s(x)$ для многослойной мембраны ДМФХ, измеренной в аналогичных условиях на том же самом инструменте. Два наблюдаемых на рис. 7.3, максимума функции $\rho_s(x)$ (слева и справа) соответствуют положению областей полярных голов липидов. Минимум при $x=0$ соответствует положению CH_3 групп молекул церамида 6 и пальмитиновой кислоты. Вычисленный фурье-профиль модельной мембраны SC не имеет на концах уменьшения $\rho_s(x)$, типичного для фосфолипидов и соответствующего заполненному водой, межмембранному пространству. Такой спад $\rho_s(x)$ показан на рис. 7.2 для многослойной мембраны ДМФХ, измеренной в тех же самых экспериментальных условиях. Для четырехкомпонентной CER6 /Ch /PA /ChS=55/25/15/5 мембраны $d_{ph} = 45.6 \text{ \AA}$ является расстоянием между максимумами, относящимися к полярным группам. Одинаковые значения d_{ph} и d говорят о том, что межмембранное пространство достаточно мало, чтобы быть измеренным в дифракционном эксперименте. Важным выводом, основанным на проведенном фурье-синтезе, является равенство $d_m = d_{ph} = d$, из которого следует, что толщина слоя воды в межмембранном пространстве $d_w \approx 0$ при относительной влажности $RH = 60\%$.

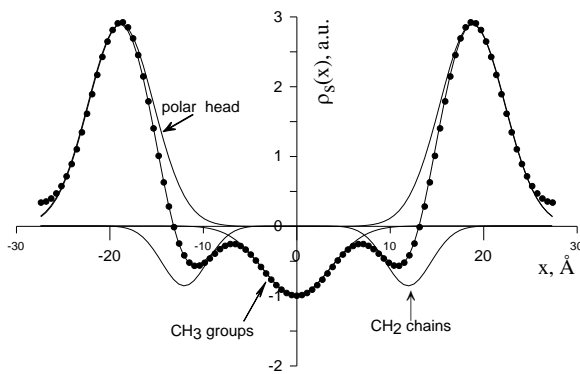


Рис. 7.2. Распределение плотности длины рассеяния нейтрона $\rho_s(x)$ в мультислойной мембране ДМФХ при $RH = 60\%$, $T=32^\circ\text{C}$ и 8% содержании D_2O (точки) и расчетные кривые (сплошная линия). Стрелки показывают положение трех молекулярных групп: CH_3 группы, CH_2 цепочки и группы полярных голов.

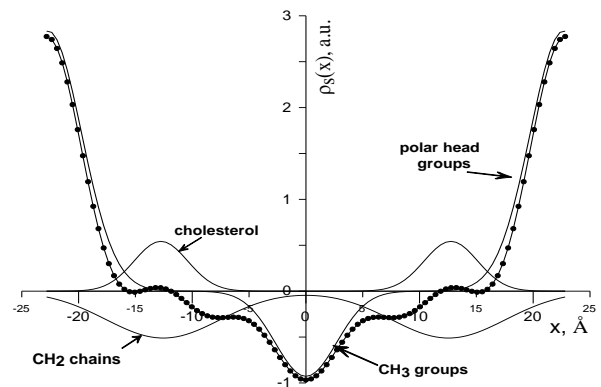


Рис. 7.3. Распределение плотности длины рассеяния нейтрона $\rho_s(x)$ в мультислойной мембране CER6 /Ch /PA /ChS с композицией 55/25/15/5 при $RH = 60\%$, $T=32^\circ\text{C}$ и 8% содержании D_2O (точки) и расчетные кривые (сплошная линия). Стрелки показывают положение четырех молекулярных групп: CH_3 группы, CH_2 цепочки, холестерин и группы полярных голов.

Положение холестеринового максимума в функции $\rho_s(x)$ при $x = 12.8 \text{ \AA}$ соответствует положению стероидных ядер. Этот вывод был в дальнейшем подтвержден экспериментами с применением дейтерированного холестерина [48]. Полученные структурные результаты для липидной мембраны CER6/Ch/PA/ChS с композицией 55/25/15/5 в избытке воды при $T = 32^\circ\text{C}$ представлены на рис. 7.4.

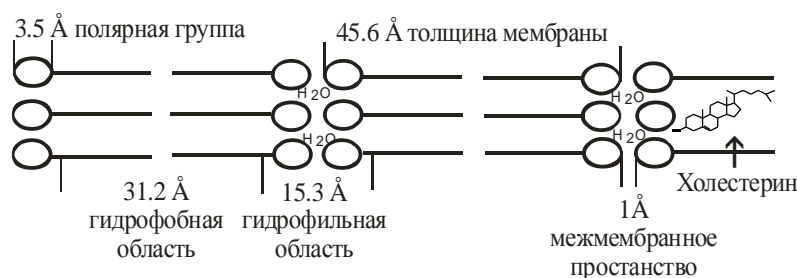


Рис. 7.4.
Наноструктура мембраны CER6/Ch/PA/ChS с композицией 55/25/15/5 при полной гидратации и $T = 32^\circ\text{C}$.

Низкая гидратация межмембранного пространства модельной мембраны липидной матрицы SC является существенным отличием этой мембраны от фосфолипидных мембран, в которых межмембранное пространство составляет от 8 до 20 \AA . Толщина межмембранного пространства мембраны SC практически равна нулю при 60% влажности. Такая структура многослойной мембраны является результатом сверхсильного межмембранного взаимодействия создаваемого молекулами церамида 6 [54]. Для проверки роли церамида 6 в образовании прочной липидной матрицы была выполнена серия экспериментов, в которых варьировалась длина углеводородной цепи жирной кислоты, вводимой в состав мембраны вместо пальмитиновой [50]. Применение длинноцепочечных жирных кислот должно было привести к увеличению периода повторяемости мембраны. Однако результаты экспериментов, представленные на рис. 7.5, показали, что при увеличении длины молекулы кислоты происходит уменьшение периода повторяемости и толщины мембраны. Введение в состав мембраны более длинных молекул кислоты не может разрушить сверхсильное взаимодействие, создаваемое церамидом 6, и поэтому длинные углеводородные цепочки жирных кислот начинают проникать в углеводородное пространство соседнего монослоя, как изображено на рис. 7.6 для случая церотовой кислоты ($C=26$). Даже для самой длинной кислоты ($C=26$) её длины не хватает, чтобы полностью заполнить

пространство соседнего монослоя. Минимизация свободного пространства выражается в уменьшении толщины бислоя, наблюдаемой в эксперименте. Проникновение молекул длинноцепочечных кислот в соседний монослой было показано в дальнейших экспериментах с применением дейтерированных липидов. Фурье профили плотности длины рассеяния мембраны, построенной с применением длинноцепочечных жирных кислот дейтерированных в конце углеводородной цепочки, ясно демонстрировали проникновение дейтерированной метки в соседний монослой [52].

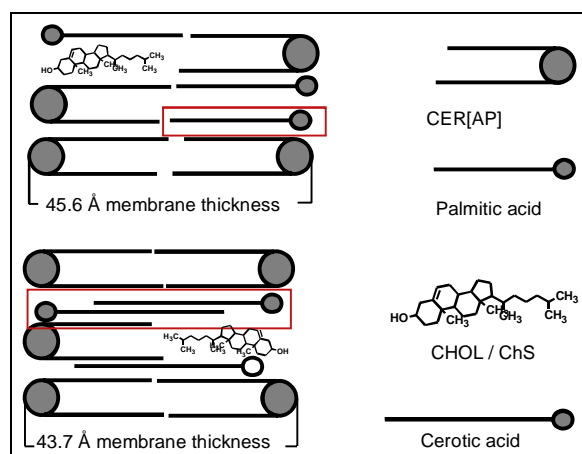
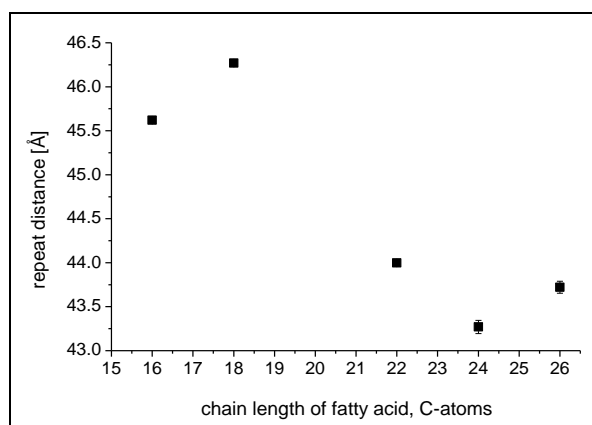


Рис. 7.5. Зависимость периода повторяемости модельной мембраны SC от длины углеводородной цепочки жирной кислоты, выраженной количеством атомов углерода в ней, С. Для пальмитиновой кислоты С=16.

Рис. 7.6. Структура модельной мембраны SC построенной с пальмитиновой и церотовой кислотами. Углеводородные цепочки молекул церотовой кислоты проникают в соседний монослой мембраны.

Следующим шагом в экспериментальном доказательстве явления сверхсильного межмембранного взаимодействия, создаваемого церамидом 6 в липидной матрице, было исследование наноструктуры мембран, построенных с введением в их состав длинноцепочечного церамида 1 (Cer [EOS]). Была изготовлена многослойная мембрана с составом CER[EOS] (Cer1) / CER[AP] (Cer (6) / Ch/ BA с весовым соотношением компонент 23/ 10/ 33/ 33. Исследования её структуры методом дифракции нейтронов показали, что толщина липидного бислоя такой мембраны 47.5Å близка к толщине мембраны с составом Cer6 /Ch /PA /ChS – 45.6Å [51]. Длина жирнокислотного остатка молекулы Cer1 превышает на 30 атомов углерода длину жирнокислотного остатка молекулы Cer6, что соответствует разнице примерно 37Å в длине молекул Cer1 и Cer6.

Молекула Cer1 не может уложиться в один липидный бислой и проникает в соседний бислой, как изображено на рис. 7.7. Основным выводом проведенных в [51] исследований является то, что молекулы длинноцепочечного церамида не могут разрушить сверхсильное взаимодействие, создаваемое молекулами Cer6, и создать длиннопериодную фазу с периодом повторяемости 130Å.

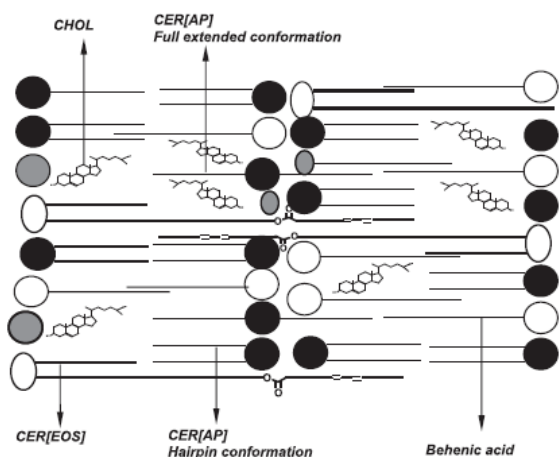


Рис. 7.7. Структура модельной мембраны SC с составом CER[EOS] (Cer1) / CER[AP] (Cer (6) / Ch/ BA = 23/ 10/ 33/ 33. Молекулы длинноцепочечного Cer1 проникают в соседний бислой. Молекулы короткоцепочечного Cer6 находятся в двух конформациях: hairpin и full extended.

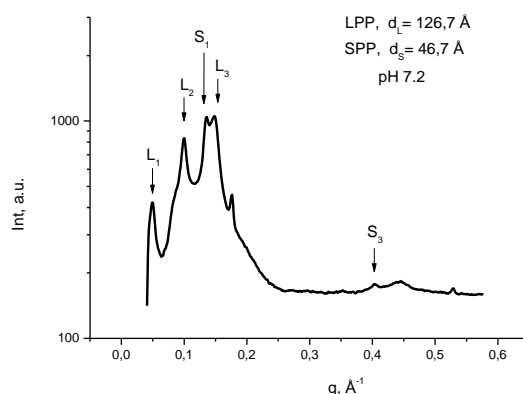


Рис. 7.8. Спектр ламеллярной дифракции от многослойных везикул в избытке воды с pH=7.2. LPP – длиннопериодная фаза, SPP – короткопериодная фаза. Спектрометр ДИКСИ синхротронный источник КЦСИиНТ, Курчатовский институт.

Наличие в составе мембраны длинноцепочечного церамида 1 является необходимым, но недостаточным условием формирования длиннопериодной фазы. Достаточным условием формирования длиннопериодной фазы является полная гидратация мембраны и низкое значение pH воды, pH=6-7. Длиннопериодная фаза была обнаружена при проведение измерений мембран с весовым соотношением компонент Cer1/Cer6/Chol/PA/ChS = 30/30/20/15/5 в избытке воды при значениях pH=7.2 [56]. Методом дифракции рентгеновского синхротронного излучения исследовались многослойные везикулы в области ламеллярной и латеральной дифракции. На рис. 7.8 представлен спектр, демонстрирующий три порядка отражения L₁, L₂, L₃ от длиннопериодной фазы с периодом повторяемости 126.7Å. При этом часть образца находится в короткопериодной фазе с периодом повторяемости 46.7Å. На рис. 7.8

видны первый S1 и третий S3 порядки отражения от короткопериодной фазы многослойной мембраны. Увеличение pH до 9 вызывает переход липидного бислоя из кристаллического в жидкокристаллическое состояние. При этом происходит разрушение длиннопериодной фазы.

Главным выводом проведенных в [32, 48-54] исследований являлось экспериментальное доказательство сверхсильного межмембранного взаимодействия создаваемого молекулами церамида 6, находящимися в состоянии полностью протяженной конформации (full extended), как изображено на рис. 7.7. Это свойство церамида 6 определяет механическую прочность липидной матрицы SC и препятствует гидрофильной диффузии воды и лекарств в латеральном направлении. Отсюда следует важный практический вывод о том, что главным направлением диффузии через липидную матрицу SC будет липофильный путь в ламеллярном (перпендикулярном бислою) направлении. Для усиления липофильной диффузии следует применять вещества, увеличивающие дефекты в мембранной поверхности. Одним из путей увеличения дефектов является образование двухфазных систем с развитой доменной структурой. Как было показано в [44-46, 70], этим свойством обладает ДМСО – жидкость, нанесение которой на кожу увеличивает её проницаемость. Это свойство ДМСО используется при изготовлении лекарств, применяемых трансдермально.

§8. Применение ориентации липидных молекул в магнитном поле в нейтронных экспериментах.

Углеводородные цепи фосфолипидов обладают различной диамагнитной восприимчивостью в направлении вдоль цепи и перпендикулярно цепи. Благодаря этому, фосфолипидные молекулы, организованные в бислой (мембрану), обладают анизотропией диамагнитной восприимчивости в двух взаимно перпендикулярных направлениях: в направлении плоскости мембраны и в направлении нормали к мембранной поверхности $\Delta\chi = \chi_{||} - \chi_{\perp}$, что приводит к их ориентации в магнитном поле. Оси углеводородных цепочек липидов ориентируются перпендикулярно к направлению вектора напряженности магнитного поля. Анизотропия максимальна для насыщенных фосфолипидов. Для ДМФХ в жидкой L_{α} фазе анизотропия диамагнитной восприимчивости характеризуется величиной $\Delta\chi_{DMPC} = -1.06 \cdot 10^{-29}$ эрг·гс⁻². Параметр

ориентации β плоского бислоя ДМФХ в магнитном поле напряженностью H зависит от количества липидных молекул N , образующих бислоем [57]

$$\beta = \frac{N \cdot |\Delta\chi_{DMPC}| \cdot H^2}{k_B \cdot T} . \quad (13)$$

Энергия теплового движения $k_B T$ для комнатных температур составляет $4 \cdot 10^{-14}$ эрг. Так как величина $\Delta\chi_{DMPC}$ мала, то для получения эффекта ориентации требуется большое количество молекул липида в бислое и (или) использование сильных магнитных полей (более 10^4 гс=1 Тл), так чтобы числитель уравнения (13) был соизмерим с $k_B T$. С другой стороны, измерение степени ориентации липидного бислоя или более сложных структур позволяет определять количество липидных молекул, образующих надмолекулярную структуру.

В работе [58] было обнаружено влияние магнитного поля на нейтронный дифракционный спектр от многослойных везикул ДМФХ в избытке воды. Спектры измерялись на малоугловом спектрометре PAXY (LLB, Saclay, France), оснащенный двухмерным ПЧД. Измерения проводились в магнитном поле 0 Тл и 2 Тл, создаваемом горизонтальным электромагнитом, установленным на пучке спектрометра. Образец в кварцевой кювете Hellma толщиной 2мм помещался между полюсами электромагнита. Температура образца составляла $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$, концентрация ДМФХ в D_2O составляла 15 мМ (1% по весу). Дифракционная картина, регистрируемая двухмерным ПЧД, представлена на рис. 8.1. При наличии магнитного поля 2 Тл видна анизотропия рассеяния. При отключении магнитного поля анизотропия, изображения на рис. 8.1, исчезает и интенсивность дифракционного пика становится аксиально симметричной. Включение поля восстанавливает анизотропию рассеяния, возникающую из-за деформации многослойных везикул и их ориентации вдоль направления магнитного поля. Степень ориентации липидного бислоя (степень деформации многослойной) везикулы можно охарактеризовать параметром ориентации

$$\beta = 2 \cdot \ln\left(\frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}}\right) \quad (14)$$

Здесь I_{\perp} - интенсивность рассеяния в направлении перпендикулярном направлению магнитного поля, I_{\parallel} - интенсивность рассеяния в направлении параллельном направлению магнитного поля. Для ДМФХ при $T=24^\circ\text{C}$, $\beta = 1.06$ при наложении поля

2 Тл. Деформация везикул существенно уменьшается при переходе бислоя ДМФХ из жидкокристаллической фазы в гель фазу. При $T = 10^{\circ}\text{C}$, $\beta = 0.46$ при наложении поля 2 Тл.

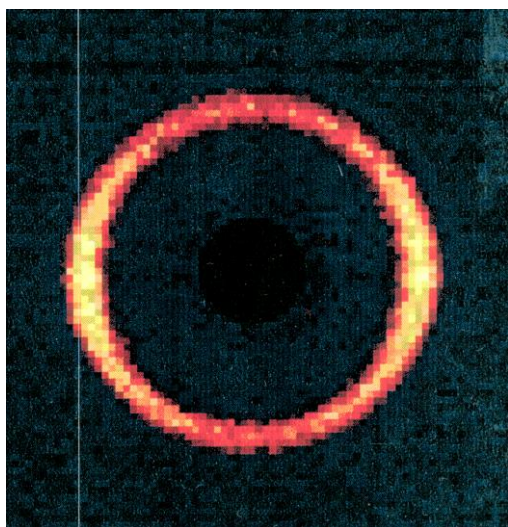


Рис. 8.1. Дифракционная картина от мультислойных везикул ДМФХ в магнитном поле 2 Тл записанная на двухмерном ПЧД спектрометре PAXY, LLB, France. Магнитное поле направлено вертикально относительно изображения.

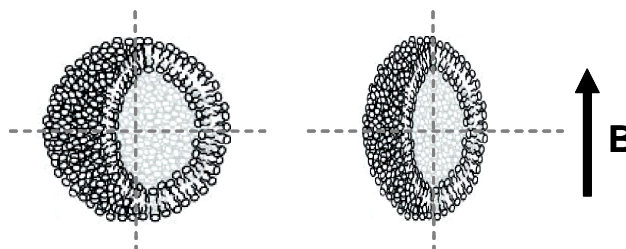


Рис. 8.2. Однослойная сферическая везикула в воде в отсутствии внешнего магнитного поля (слева). При включении магнитного поля происходит деформация формы везикулы и её ориентация вдоль направления магнитного поля.

Многослойная липидная везикула имеет размеры порядка микрон, содержит порядка сотни повторяющихся липидных бислоев и состоит из $10^7 - 10^9$ молекул ДМФХ. Однослойная везикула ДМФХ с диаметром 500\AA состоит из 10^4 молекул ДМФХ. Разница в три порядка между числом молекул в однослойных и многослойных везикулах делает весьма затруднительной определение деформации и ориентации однослойных везикул в малоугловом нейтронном эксперименте. Впервые ориентация однослойных везикул с диаметром 500\AA была обнаружена экспериментально при их помещении в магнитное поле 4Тл [59]. На рис. 8.2 схематично изображена однослойная липидная везикула без внешнего магнитного поля и её деформация вдоль направления магнитного поля, которая возникает при включении внешнего магнитного поля. Описанный в [59] эффект ориентации везикул достаточно слабый, что не позволяет сделать количественный расчет величины деформации формы везикулы. Применение липидных бислоев с меньшим модулем упругости и использование в будущем

сверхпроводящих магнитов с полями больше 10 Тл позволит развить методику измерения упругих свойств везикулярных переносчиков лекарств через кожу. Основным требованием к таким переносчикам является высокие деформационные свойства, позволяющие везикулам существенно изменять форму при прохождении узких каналов липидной матрицы верхнего слоя кожи [60]. Формулирование (молекулярный дизайн) таких переносчиков наиболее эффективно осуществлять с одновременной диагностикой их упругих и деформационных свойств методом МУРН при наложении магнитного поля.

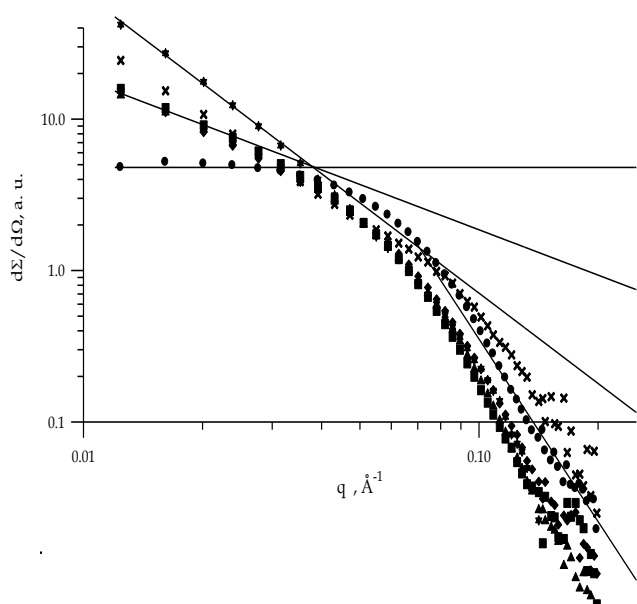


Рис. 8.3. Кривые малоуглового рассеяния от смешанных агрегатов ДМФХ/ холат натрия в D_2O . Кривая изображенная точками – 15 мМ ДМФХ/ 12 мМ холата натрия при $T = 20^\circ C$. Остальные кривые соответствуют концентрации 15 мМ ДМФХ/ 6 мМ холата натрия при $T = 20^\circ C$ (квадраты), $T = 25^\circ C$ (треугольники), $T = 30^\circ C$ (крестики), $T = 40^\circ C$ (звездочки). Переход из мицеллярного в везикулярное состояние происходит за счет увеличения температуры образца, ЮМО спектрометр, Дубна [68].

Ориентация липидных молекул в сильных магнитных полях также используется для исследования процесса самосборки липидного бислоя в смешанных липид/детергентных системах с ионным детергентом холат натрия и неионным детергентом $C_{12}E_8$. Изучение самосборки модельных биологических мембран важно как для понимания физико-химических основ существования липидного бислоя, так и для развития методов реконструкции мембранных белков. Наиболее существенным моментом в процессе самосборки липидного бислоя в смешанной системе фосфолипид/детергент является преобразование надмолекулярных наноструктур из мицеллярного состояния в везикулярное [61]. Малоугловое рассеяние нейтронов и рентгеновских лучей успешно используется для исследования таких преобразований [62-64].

Чрезвычайно удобным подходом к изучению самосборки липидных мембран является создание систем, в которых мицелло – везикулярный переход возникает при изменении температуры системы. Температурно – индуцированный мицелло – везикулярный переход наблюдается в различных смешанных системах: яичный лецитин / октилглюкозид [65], фосфатидилхолин / холат натрия [66], фосфатидилхолин / C₁₂E₈ [67]. Использование температурочувствительных систем дает ряд существенных преимуществ для исследования мицелло-везикулярного перехода, главными из которых являются: постоянство концентраций веществ в образце и возможность многократного индуцирования перехода в одном и том же образце, обуславливаемая полной обратимостью перехода. Более того, эволюция системы может быть остановлена на любой её стадии, что позволяет проводить измерения при стационарных изотермических условиях. Мицелло – везикулярный переход в системе фосфолипид / детергент исследовался методом малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей [36, 63, 68]. Было показано, что как в системе с ионным детергентом (холат натрия), так и в системе с неионным детергентом (C₁₂E₈) в процессе медленного увеличения температуры (0.3°C/мин) происходит следующая последовательность морфологических изменений наноструктуры частиц: сферическая мицелла, эллиптическая мицелла, стержнеобразная мицелла, гауссов клубок стержнеобразных мицелл, однослойная везикула, многослойная везикула. Наблюдение всей последовательности морфологических преобразований от сферической мицеллы до мультислойной везикулы в одном образце невозможно. Для этого требуется несколько образцов с различной концентрацией детергента. Но переход из мицеллярного в везикулярное состояние, то есть процесс самосборки липидного бислоя (образование мембраны) происходит в одном образце, как показано на рис. 8.3 и таб. 8.1. Анализ спектров МУРН выполнялся в приближении Гинье

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = \frac{d\Sigma}{d\Omega}(0) \cdot q^a \cdot \exp[-q^2 \cdot b], \quad (15)$$

здесь параметр a определяет морфологию частицы: $a = 0$ для сферических или эллиптических мицелл, $a = -1$ для стержнеобразных мицелл и $a = -2$ для плоских протяженных мембран или везикул. Радиус инерции наночастицы определяется по значению параметра b , что, совместно со знанием морфологии частицы, позволяет определять её геометрические параметры. На рис. 8.3 представлено преобразование

наноструктуры агрегатов от мицеллярной системы с $a = 0$ в систему стержнеобразных мицелл $a = -1$ и, окончательно, в везикулярную систему с $a = -2$. Определенные из эксперимента параметры смешанной системы 15 мМ ДМФХ / 6 мМ холата натрия представлены в таб. 8.1. При температуре 20°C смешанные агрегаты ДМФХ/ NaC представляют собой стержнеобразные мицеллы с сечением в виде эллипса с полуосями $a = 21.7 \pm 0.5 \text{ \AA}$ и $b = 38.7 \pm 0.5 \text{ \AA}$, что соответствует соотношению полуосей $\varepsilon = 1.8$. При увеличении температуры до 30°C сечение этих мицелл уменьшается без существенного изменения величины ε . При 33°C система невзаимодействующих стержнеобразных мицелл преобразуется в гауссов клубок стержнеобразных мицелл, но эллиптическое сечение мицеллы существенно не изменяется. При 40°C происходит самосборка липидного бислоя и образуются однослойные везикулы больших размеров. При этом толщина липидного бислоя увеличивается с увеличением температуры.

Увеличение толщины мембраны с ростом температуры объясняется выходом молекул холата натрия из липидного бислоя в окружающую воду, то есть температурной зависимостью критической концентрации мицеллообразования (СМС) для холата натрия. Температурная зависимость СМС холата натрия была определена методом титрационной калориметрии [69]. В зависимости от рН и ионной силы воды, минимум СМС находится между 22°C и 27°C. Для рН = 7.5 и концентрации холата натрия 0.1 М, СМС равна 12.5 мМ при 10°C, затем СМС, при увеличении температуры до 24°C, уменьшается до 10 мМ (минимум) и монотонно увеличивается до значения 15.5 мМ при 70°C [69]. Такая зависимость СМС от температуры является физико-химической основой температурно – индуцированного мицелло – везикулярного перехода. Аналогичные температурно-индуцированные мицелло-везикулярные переходы были исследованы методом МУРН в смешанных системах с неионным детегентом $C_{12}E_8$. Наиболее важной и малоизученной является структура, предшествующая образованию бислоя. Анализ спектров МУРН, выполненный для ионного и неионного детергенов, говорит о том, что кривая рассеяния перед образованием бислоя соответствует гауссову клубку [68]. Для получения большей информации об этой особенности были проведены измерения в сильных магнитных полях на малоугловом спектрометре V4, оснащенном сверхпроводящим магнитом [58]. Для исследований были выбраны два образца с различной концентрацией неионного детергента: 45 мМ ДМФХ /12 мМ $C_{12}E_8$ и 45 мМ ДМФХ /18 мМ $C_{12}E_8$. Величина

магнитного поля составляла 0 и 4 Тл. Кривые малоуглового рассеяния для образца с концентрацией липидов 45 мМ ДМФХ /12 мМ $C_{12}E_8$ представлены на рис. 8.4. Кривые измерялись при температуре образца 10°C без магнитного поля и с включенным полем величиной 4 Тл.

Таб. 8.1. Параметры наноструктуры смешанных 15 мМ ДМФХ/ 6 мМ NaC агрегатов в D_2O . *RL* - стержнеобразные мицеллы с эллиптическим сечением и полуосями *a* и *b*, *GC* - гауссов клубок из стержнеобразных мицелл с эллиптическим сечением и полуосями *a* и *b*, *UV* - однослойные везикулы с толщиной бислоя d_G .

Т, °С	20	25	28	30	33	35	40	50	60
Тип частицы	<i>RL</i>	<i>RL</i>	<i>RL</i>	<i>RL</i>	<i>GC</i>	<i>GC</i>	<i>UV</i>	<i>UV</i>	<i>UV</i>
Размер, Å	21.7	20.8	19.9	19.6	19.	19.3			
<i>a, b</i>	38.7	36.4	35.4	34.2	5	33.0			
или d_G					34.		35.2	35.6	36
					3				

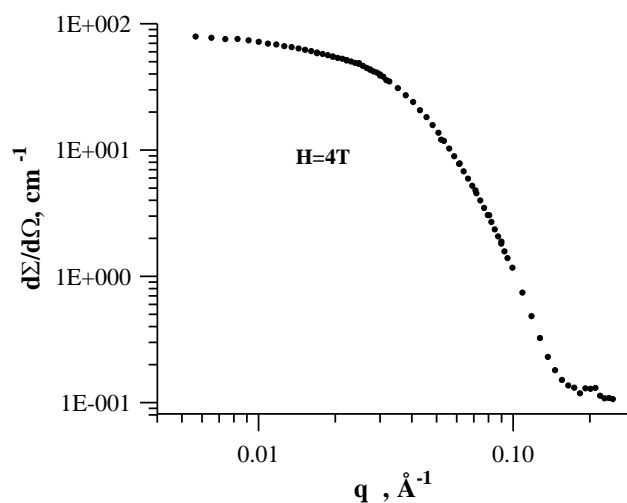
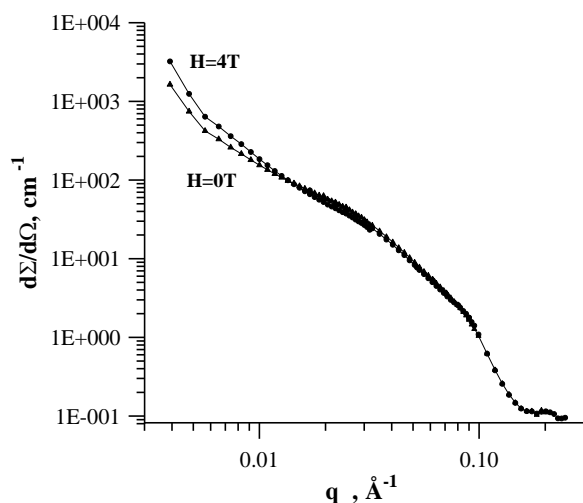


Рис. 8.4. Спектры малоуглового рассеяния от гауссова клубка стержнеобразных мицелл 45 мМ ДМФХ /12 мМ $C_{12}E_8$ без и в магнитном поле 4 Тл. Температура образца 10°C .

Рис. 8.5. Спектр малоуглового рассеяния от эллиптических мицелл 45 мМ ДМФХ /18 мМ $C_{12}E_8$ в магнитном поле 4 Тл. Температура образца 10°C .

Кривая МУРН без магнитного поля соответствует рассеянию от гауссова клубка стержнеобразных мицелл с круглым поперечным сечением мицеллы. При включении магнитного поля 4 Тл увеличивается интенсивность рассеяния в области малых значений вектора рассеяния, что демонстрирует увеличение размера гауссова клубка. Длина персистентности L_p гауссова клубка стержнеобразных мицелл вычислялась из графика Хольтцера, а размеры поперечного сечения – из графика Гинье. Параметры гауссова клубка без поля составили: $L_p=170\pm 15\text{Å}$, радиус поперечного сечения мицеллы $R=28\pm 1\text{Å}$. В магнитном поле $H=4$ Тл: $L_p=160\pm 15\text{Å}$, $R=26.0\pm 2\text{Å}$. Как видно, ни длина персистентности клубка, ни радиус его сечения не меняются при наложении магнитного поля.

Постоянное значение L_p без поля и при включении поля даёт возможность утверждать, что гауссов клубок состоит именно из стержнеобразных, а не нитевидных мицелл, так как нитевидные мицеллы должны менять персистентную длину при их вытягивании в магнитном поле. Длина стержнеобразных мицелл $L=2\cdot L_p$ [31]. Концы стержнеобразных мицелл являются областями с высоким содержанием детергента. Эти концы обладают высокой эластичностью и подвижностью в угловом расположении одной стержнеобразной мицеллы относительно другой. При наложении магнитного поля происходит изменение углового распределения в местах соединения стержнеобразных мицелл, при этом длина самих стержней $L=320\pm 30\text{Å}$ не меняется. Можно назвать такую структуру полимероподобной. Как видно на рис. 8.4, в области малых значений вектора рассеяния q , макроскопическое сечение существенно изменяется при наложении магнитного поля. Это изменение демонстрирует изменение ориентации гауссового клубка. Изотропное пространственное распределение углов между соседними стержнеобразными мицеллами в гауссовом клубке, существующее без поля, изменяется при наложении поля на анизотропное, которое сопровождается вытягиванием клубка вдоль поля. Движение клубка является кооперативным, так как в соответствии с уравнением (13) в нем должно участвовать много молекул. Для проверки того, что движение является кооперативным, то есть стержнеобразные мицеллы связаны между собой, были выполнены измерения на системе, состоящей из невзаимодействующих эллиптических мицелл. Такая система получается при увеличении концентрации детергента и соответствует смеси 45 мМ ДМФХ /18 мМ $C_{12}E_8$. Малоугловые измерения, проведенные на мицеллах с концентрацией липидов

45 мМ ДМФХ /18 мМ C₁₂E₈, показали, что спектры МУРН, измеренные без поля и при наложении магнитного поля 4 Тл, полностью совпадают. На рис. 8.5 показан спектр МУРН, измеренный на такой системе при температуре образца 10°C и магнитном поле 4 Тл. Анализ кривой рассеяния в Гинье приближении говорит о том, что мицеллы имеют эллиптическую форму со значениями полуосей 27.5Å и 81.6±2.5Å.

Как уже было сказано выше, для исследования самосборки липидного бислоя наиболее удобны системы, в которых самосборка происходит при увеличении температуры. Естественно, возникает вопрос о зависимости параметров самосборки от скорости роста температуры. В представленных выше экспериментах наборы спектров производились при фиксированной температуре, а изменение температуры образцов со скоростью примерно 0.3°C/мин производилось между измерениями. Большой объем образца (1-2 мл) и инерционность системы нагрева термостатов, используемых на малоугловых нейтронных спектрометрах, не позволяют нагревать образец в кварцевой кювете со скоростью выше 1°C/мин. Размер пучка на синхротронном источнике (около 0.1 x 1 мм) существенно меньше размера нейтронного пучка (около 14 мм в диаметре), что позволяет использовать для измерений объемы образца в несколько микролитров. В этом случае возможен быстрый нагрев образца со скоростью около 100°C/мин (путем инъекции образца в предварительно разогретых капилляр).

Температуро – индуцированные мицелло – везикулярные переходы в смешанных системах с ионным (холат натрия) и неионным (C₁₂E₈) детергентом исследовались методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на установке D22 синхротронного источника DCI, LURE, Франция. Главный результат представлен на рис. 8.6 и заключается в формировании смешанных монодисперсных везикул с радиусом 225 Å при скачке температуры со скоростью более 100°C/мин в системе ДМФХ/ холат натрия. При быстром температурном скачке были получены качественные спектры с осцилляциями (рис. 8.6), характерными для сферических однослойных везикул. Средний радиус везикул составляет 225 Å. Большая амплитуда осцилляций говорит о низкой полидисперсности размеров везикул и, следовательно, о прецизионности молекулярного механизма их формирования. Помимо этого, было обнаружено, что малые везикулы стабильны в течение нескольких часов, что говорит о том, что не происходит деградации системы и, следовательно, нельзя говорить о кинетической эволюции, основанной на слиянии или делении везикул. Малая

амплитуда осцилляций на кривой рассеяния, полученная для более медленных скоростей увеличения температуры, говорит о большом размере и высокой полидисперсности полученных везикул. При уменьшении скорости нагрева системы увеличиваются как размер, так и полидисперсность везикул. Образующиеся при мицелло-везикулярном переходе промежуточные структуры и сам путь перехода зависят от скорости изменения температуры.

Аналогичные измерения с системой ДМФХ / $C_{12}E_8$, основанной на неионном детергенте с углеводородной цепочкой, проникающей в бислои, показали, что, вне зависимости от скорости нагрева образца, всегда образуются большие везикулы с высокой полидисперсностью. Создание везикулярных систем малого радиуса и полидисперсности на основе применения $C_{12}E_8$ невозможно. Процесс самосборки липидного бислоя в присутствии детергента $C_{12}E_8$ не зависит от скорости нагрева, в то время как система на основе холата натрия демонстрирует существенную зависимость морфологии конечных структур от скорости нагрева.

Представленные нейтронные и рентгеновские синхротронные исследования позволили сформировать последовательность процесса самосборки липидного бислоя в исследуемых системах представленную на рис. 8.7. Первый шаг (А) это мицеллы с малым процентным содержанием ДМФХ и большим содержанием детергента, структура которых близка к сферической. Нагрев таких систем не приводит к самосборке липидного бислоя, так как процесс морфологических преобразований заканчивается на стадии стержнеобразных мицелл.

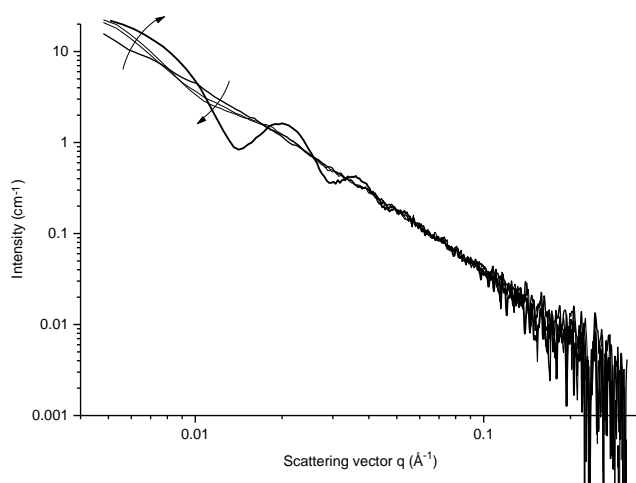


Рис. 8.6. Малоугловые рентгеновские спектры системы 15 мМ ДМФХ / 8 мМ NaC в водно-сахарозном буфере (40 % сахарозы) при различных скоростях нагрева. Стрелки показывают расположение спектров в соответствии с увеличением скорости нагрева (<5, 5, 20 и 100 °С/мин).

Мицеллы, содержащие детергент в которых при их нагреве достаточно для самосборки мембраны, как правило, имеют эллиптическую форму (B) за счет маленького радиуса кривизны участков мицеллы, обогащенных детергентом. Дальнейшее уменьшение содержания детергента в системе или увеличение температуры приводит к образованию стержнеобразных мицелл, торцевые стороны которых обогащены детергентом (C). При медленном квазистатическом нагреве образца стержнеобразные мицеллы соединяются торцами, образуя гауссов клубок (B). Такую структуру мы называем полимероподобной. Незначительное нагревание системы приводит к самосборке липидного бислоя, который при дальнейшем нагревании преобразуется в мультислойные везикулы. Бислой после самосборки мембраны существует в виде больших однослойных замкнутых или незамкнутых везикул, не исключено и существование бислоя в виде плоских структур.

Быстрый нагрев системы на основе холата натрия от состояния (B) приводит к образованию однослойных везикул низкой полидисперсности и малого радиуса (225 \AA). Быстрый нагрев системы на основе детергента $C_{12}E_8$ от состояния (B) образует везикулы с большой полидисперсностью и большим радиусом. Таким образом, в процессе изучения самосборки мембраны был разработан новый метод создания везикул низкой полидисперсности в системе ДМФХ / холат натрия. Также впервые для исследования процесса самосборки применялась ориентация липидов в сильных магнитных полях.

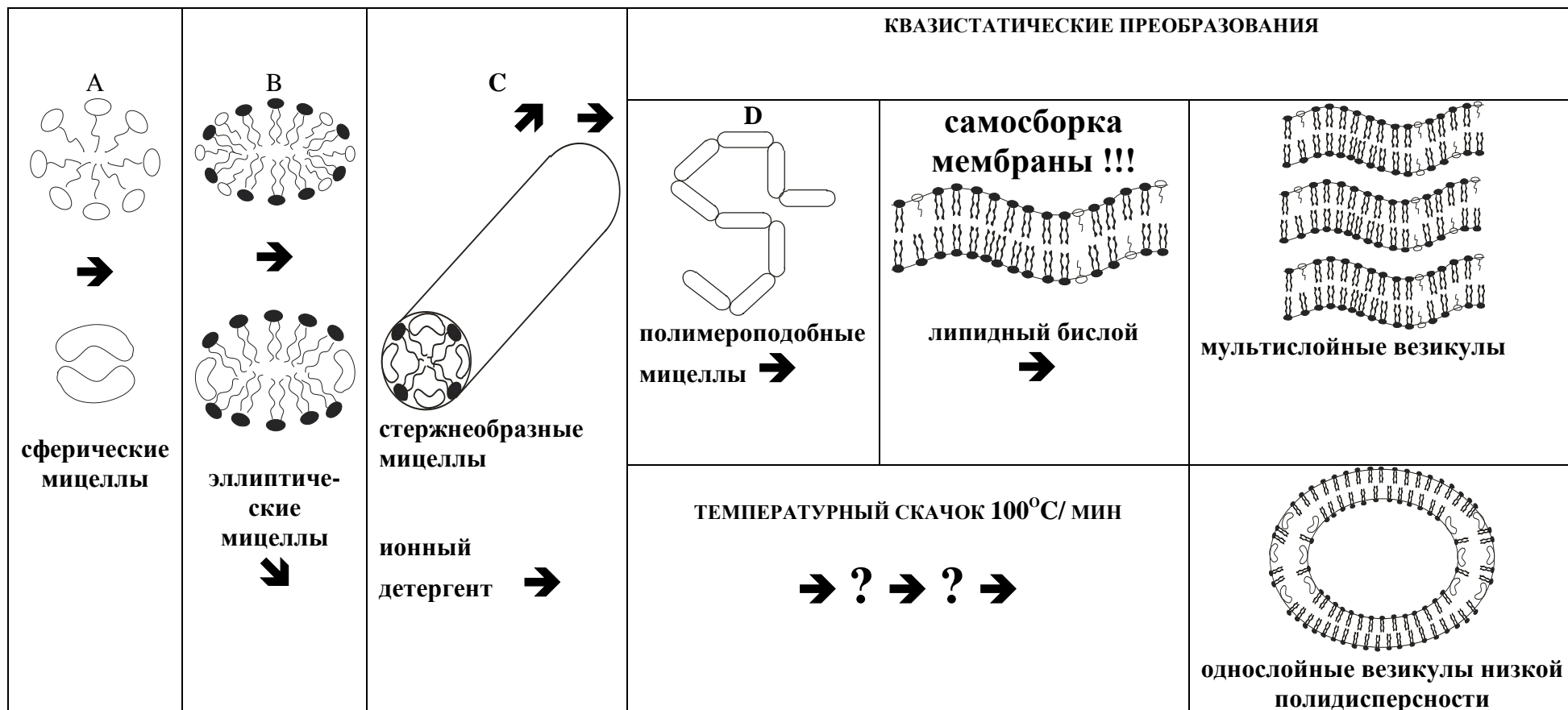





Рис. 8.7. Последовательность морфологических преобразований при температурно-индуцированной самосборке мембраны в смешанных липид/ детергентных системах.

Обозначения молекул:  - неионный детергент $C_{12}E_8$,  - ионный детергент холат натрия,  - ДМФХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997.
2. Барсуков Л.И. Липосомы. Соросовский образовательный журнал // 1988. Т.10. С.2-9.
3. Ипатова О.М. Фосфоглив: механизм действия и применения в клинике. М.: ГУ НИИ Биомедхим., 2005.
4. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. Физические механизмы функционирования биологических мембран. М.: Московский университет, 1987.
5. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. М.: Наука, 1981.
6. Ollivon M, Lesieur S., Grabielle-Madelmont C., Paternostre M. Vesicle reconstitution from lipid -detergent mixed micelles // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2000. V1508. P.34-50.
7. Kiselev M.A., Lesieur P., Kisselev A.M., et al. A sucrose solutions application to the study of model biological membranes // *Nuclr. Inst&Method A.* 2001. V.470. P.409-416.
8. Schmiedel H., P. Almasy L., Klose G.. Multilamellarity, structure and hydration of extruded POPC vesicles by SANS. *European Biophys. J.* 2006. V35.P.181-189.
9. Huster D., Jin A.J., Arnold K., et al. Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by ^{17}O NMR // *Biophysical J.* 1997. V.73. P855-864.
10. Hallet F.R., Watton J., Krygsman P. Vesicle sizing. Number distributions by dynamic light scattering // *Biophysical J.* 1991. V.59. P.357-362.
11. Hunter D.G., Frisken B.J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles // *Biophysical J.* 1998. V74. P.2996-3002.
12. MacDonald R.C., MacDonald R.I., Menco B.P., et al. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1991. V.1061. P.297-303.
13. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980.
14. Lesieur S., Grabielle-Madelmont C., Paternostre M., et al. Study of size distribution and stability of liposomes by high performance gel exclusion chromatography // *Chemistry and physics of lipids.* 1993. V.64. P.57-82.
15. Crabielle-Madelmont C., Perron R. Calorimetric studies on phospholipids-water systems. I. DL-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)-water system // *J. of Colloid and Interface Science.* 1983a. V.95. P.471-482.
16. Crabielle-Madelmont C., Perron R. Calorimetric studies on phospholipids-water systems.

- II. Study of water behavior // *J. of Colloid and Interface Science*. 1983b. V.95. P.483-493.
17. Augsten Ch., Kiselev M.A., Gehrke R., et al. A detailed analysis of biodegradable nanospheres by different techniques. A combined approach to detect particle sizes and size distributions // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008. V.47. P.95-102.
 18. Smondyrev A.M., Berkowitz M.L. Molecular dynamic simulation of DPPC bilayer in DMSO // *Biophysical J*. 1999. V.76. P.2472-2478.
 19. Schoenborn B.P. Neutron scattering for the analysis of membranes // *Biochim. et Biophys. Acta*. 1976. V.457. P.41-55.
 20. Worcester D.L. Neutron diffraction studies of biological membranes and membrane components // *Brookhaven Symp. Biol*. 1976. V.27. P.III-37 – III-57.
 21. Franks N.P., Lieb W.R. The structure of lipid bilayers and the effects of general anaesthetics // *J. Molecular Biology*. 1979. V.133. P.469-500.
 22. Kiselev M.A., Zbytovska J., Matveev D., et al. Influence of trehalose on the structure of unilamellar DMPC vesicles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* // 2005. V.256. P.1-7.
 23. Schalke M., Kruger P., Weygand M., et al. Submolecular organization of DMPA in surface monolayers: beyond the two-layer model // *Biochim. et Biophys. Acta*. 2000. V.1464. P.113-126.
 24. Dyck M., Kruger P., Bettio A., et al. Adsorption of small molecules on lipid surface monolayers. In: *Lecture Notes in Physics: Molecules in interaction with surfaces and interfaces*. Springer, New York, 2004. V.634. P.429-437.
 25. Arriaga L.R., Lopez-Montero I., Monroy F., et al. Stiffening effect of cholesterol on disordered lipid phases: a combined neutron spin echo + dynamic light scattering analysis of the bending elasticity of large unilamellar vesicles // *Biophysical J*. 2009. V.96. P.3629-3637.
 26. Балагуров А.М., Горделий В.И., Ягужинский Л.С. Исследование кинетики сорбции и десорбции воды липидными мембранами методом дифракции нейтронов // *Биофизика*. 1986. Т.31. С.1004-1010.
 27. Matsuki H., Okuno H., Sakano F., et al. Effect of deuterium oxide on the thermodynamic quantities associated with phase transitions of phosphatidylcholine bilayer membranes // *Biochim. and Biophys. Acta*. 2005. V.1712. P.92 – 100.
 28. Nagle J.F., Tristram-Nagle S. Structure of lipid bilayers // *Biochim. et Biophys. Acta*. 2000. V.1469. P.159-195.

29. Gordeliy V.I., Ivkov V.G., Ostanevich Yu.M., et al. Detection of structural defects in phosphatidylcholine membranes by small-angle neutron scattering. The cluster model of a lipid bilayer // *Biochim. and Biophys. Acta.* 1991. V.1061. P.39-48.
30. Антонов В.Ф. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран // *Соросовский образовательный журнал.* 1998. Т.10. С.10-17.
31. Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Малоугловое рассеяние нейтронов и рентгеновских лучей. М.: Наука, 1986.
32. Kiselev M.A., Ryabova N. Yu., Balagurov A.M., et al. New insights into structure and hydration of stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction // *European Biophys. J.* 2005. V.34. P.1030–1040.
33. Zbytovska J., K. Vávrová, M.A. Kiselev, et al. The effects of transdermal permeation enhancers on thermotropic phase behaviour of a stratum corneum lipid model // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2009. V.351 P. 30-37.
34. Киселев М.А., Ермакова Е.В., Н.Ю. Рябова и др. Структурные исследования липидных мембран на синхротронном источнике СИБИРЬ-2 // *Кристаллография.* 2010. Т.55. С.500-506.
35. Groen D., Gooris G.S., Bouwstra J.A. New insights into the stratum corneum lipid organization by X-ray diffraction analysis // *Biophysical Journal/* 2009. V. 97. P. 2242–2249.
36. Lesieur P., Kiselev M.A., Barsukov L.I., et al. Temperature induced micelle to vesicle transition: kinetic effects in the DMPC/NaC system // *J. Applied Crystallography.* 2000. V.33. P.623-627.
37. Kiselev M.A., Lesieur P., Kisselev A.M., et al., Model of separated form factors for unilamellar vesicles // *Applied Physics A.* 2002. V.74 Suppl. P.S1654-S1656.
38. Kiselev M.A., Wartewig S., Janich M., et al. Does sucrose influence the properties of DMPC vesicles? // *Chemistry and Physics of Lipids.* 2003. V.123. P.31-44.
39. Киселёв М.А., Ломбардо Д., Киселёв А.М. и др. Исследования структурного фактора однослойных везикул димиристоилфосфатидилхолина методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования.* 2003. Т.11. С.20-24.
40. Kiselev M.A., Zemlyanaya E.V., Aswal V.K., et al. What can we learn about the lipid vesicle structure from the small angle neutron scattering experiment? // *European Biophysics J.* 2006. V.35. P.477-493.
41. Kiselev M.A., Zemlyanaya E. V., Ryabova N.Y., et al. Water distribution function across the curved lipid bilayer: SANS study // *Chemical Physics.* 2008. V. 345. P.185-190.

42. Hallet F.R., Watton J., Krygsman P. Vesicle sizing. Number distributions by dynamic light scattering // *Biophysical J.* 1991. V.59. P.357-362.
43. Schmiedel H., Joerchel P., Kiselev M., et al. 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. Physical Chemistry B.* 2001. V.105. P.111-117.
44. Kiselev M.A., Lesieur P., Kisselev A.M., et al. DMSO-induced dehydration of DPPC membranes studied by X-ray diffraction, small-angle neutron scattering and calorimetry // *J. Alloys and Compounds.* 1999. V.286. P.195-202.
45. Kiselev M.A., Lesieur P., Kisselev A.M., et al. Ice formation in model biological membranes in the presence of cryoprotectors // *Nucl. Inst&Method. A.* 2000. V.448. P. 255-260.
46. Kiselev M.A., Gutberlet T., Lesieur P., et al. Properties of ternary phospholipid / dimethyl sulfoxide / water systems at low temperatures // *Chemistry and physics of lipids.* 2005. V.133. P.181-193.
47. Рябова Н.Ю., Киселев М.А., Бескровный А.И. и др. Исследование структуры многослойных липидных мембран методом дифракции нейтронов в реальном времени // *Физика твердого тела.* 2010. Т.52. С.984-991.
48. Kessner D., Kiselev M.A., Hauss Th., et al. Localisation of partially deuterated cholesterol in quaternary SC lipid model membranes. A neutron diffraction study // *European Biophys. J.* 2008. V.37. P.1051-1057.
49. Ruettinger A., Kiselev M.A., Hauss Th., et al. Fatty acid interdigitation in the stratum corneum model membranes: A neutron diffraction study // *European Biophys. J.* 2008. V.37. P.759-771.
50. Schroeter A., Kiselev M.A., Hauss Th., et al. Evidence of free fatty acid interdigitation in stratum corneum model membranes based on ceramide [AP] by deuterium labeling // *Biochim. and Biophys. Acta.* 2009. V.1788. P.2194-2203.
51. Kessner D., Kiselev M., Dante S., et al. Arrangement of ceramide[EOS] in a stratum corneum lipid model matrix – new aspects revealed by neutron diffraction studies // *European Biophys. J.* 2008. V.37. P.989-999.
52. Schroeter A., Kessner D., Kiselev M.A., et al. Basic nanostructure of CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL/ FFA multilamellar membranes. A neutron diffraction study // *Biophysical J.* 2009. V.97. P1104-1114.

53. Ryabova N.Y., Kiselev M.A., Dante S., et al. Investigation of stratum corneum lipid model membranes with free fatty acid composition by neutron diffraction // *European Biophysics J.* Published online 15 December 2009, DOI: 10.1007/s00249-009-0569-z.
54. Киселев М.А. Конформация молекул церамида 6 и chain-flip переходы в липидной матрице верхнего слоя кожи - stratum corneum // *Кристаллография.* 2007. Т.52. С.549-553.
55. Gawrisch K., Gaede H.C., Mihailescu M., et al. Hydration of POPC bilayers studied by 1H-PFG-MAS-NOESY and neutron diffraction // *European Biophys. J.* 2007. V.36. P.281-291.
56. Киселев М.А., Ермакова Е.В., Грузинов А.Ю. и др. Формирование длиннопериодной фазы в модельных мембранах верхнего слоя кожи (stratum corneum) // *Кристаллография.* 2013. Т. 58. С. 891–896.
57. Speyer J.B., Sripada P.K., Gupta S.K.D., et al. Magnetic orientation of sphingomyelin- lecithin bilayers // *Biophys. J.* 1987. V.51. P.687-691.
58. Kiselev M.A., Janich M., Lesieur P., et al., DMPC vesicles and mixed DMPC/C₁₂E₈ micelles orientation in strong magnetic fields // *Appl. Phys. A.* 2002. V.74. P.S1239-S1241.
59. Kiselev M.A., Gutberlet T., Hoell A., et al. Orientation of the DMPC unilamellar vesicle system in the magnetic field: SANS study // *Chemical Physics.* 2008. V.345. P.181-184.
60. Cevc G., Schatzlein A., Richardsen H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label SLSM experiments and direct size measurements // *Biochim. and Biophys. Acta.* 2002. V.1564. P.21-30.
61. Ollivon M., Lesieur S., Grabielle-Madelmont C., et al. Vesicle reconstitution from lipid - detergent mixed micelles // *Biochim. and Biophys. Acta.* 2000. V.1508. P.34-50.
62. Hjelm R.P., Thiagarajan P., Alkan-Onyuksel H.J. Organization of phosphatidylcholine and bile salt in rodlike mixed micelles // *Phys. Chem.* 1992. V.96. P.8653-8661.
63. Gutberlet T., Kiselev M., Heerklotz H., et al. SANS Study of Mixed POPC/C₁₂E_n Aggregates // *Physica B.* 2000. V.381-383. P.276-278.
64. Weiss T.M., Narayanan T., Wolf C., et al. Dynamics of the self-assembly of unilamellar vesicles // *Phys. Rev. Letters.* 2005. V.94. P.038303.
65. Miguel M.G., Eidelman O., Ollivon M., et al. Temperature dependence of the vesicle-micelle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside // *Biochemistry.* 1989. V.28. P.8921-8928.

66. Polozova A.I., Dubachev G.E., Simonova T.N., et al. Temperature-induced micellar-lamellar transformation in binary mixtures of saturated phosphatidylcholines with sodium cholate // FEBS Lett. 1995. V.385. P.17-22.
67. Otten D., Lobbecke L., Beyer K. Stages of the bilayer-micelle transition in the system phosphatidylcholine-C12E8 as studied by deuterium- and phosphorous-NMR, light scattering, and calorimetry // Biophys. J. 1995. V.68. P.584-597.
68. Kiselev M.A., Lombardo D., Lesieur P., et al. Membrane self assembly in mixed DMPC/NaC systems by SANS // Chemical Physics. 2008. V.345. P.173-180.
69. Garidel P., Hildebrand A., R. Neubert, et al. Thermodynamic characterization of bile salt aggregation as a function of temperature and ionic strength using isothermal titration calorimetry // Langmuir. 2000. V.16. P.5267-5275.
70. Киселев М.А. Комбинированное применение нейтронного и синхротронного излучения для исследования влияния диметилсульфоксида на структуру и свойства везикул из дипальмитоилфосфатидилхолина // Кристаллография. 2007. Т.52. С.554-559.

Содержание:

Предисловие	3
§1. Введение	6
1.1. Биологическая роль липидов. Фосфолипиды и церамиды	6
1.2. Фармацевтические применения липидов	7
§2. Липидные структуры и технологии их изготовления	10
2.1. Неориентированные липидные системы	11
2.2. Многослойные ориентированные мембраны на кварцевых подложках	17
§3. Методы исследования структуры и свойств липидных мембран и липидных наночастиц	20
§4. Методы применения нейтронного и синхротронного излучения для определения структуры и свойств липидных мембран и липидных наночастиц	22
§5. Однослойные везикулы и переносчики лекарств. Метод разделенных формфакторов	28
§6. Дифракция в реальном времени	34
6.1. Дифракция в реальном времени на синхротронных источниках	34
6.2. Дифракция в реальном времени на импульсных источниках нейтронов	37
§7. Дифракция нейтронов для исследований структуры липидной матрицы верхнего слоя кожи	39
§8. Применение ориентации липидных молекул в магнитном поле в нейтронных экспериментах	45
Список литературы	57

Киселев Михаил Алексеевич

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДНЫХ НАНОСТРУКТУР НА НЕЙТРОННЫХ И
СИНХРОТРОННЫХ ИСТОЧНИКАХ

Учебное пособие

Работа поступила в ОНТИ *12.03. 2014*