

# Численный анализ наноструктуры и свойств многокомпонентных липидных мембран в везикулярных системах на основе данных МУРН

Е.В. Земляная<sup>1</sup>, М.А. Киселев<sup>2</sup>, В.Л. Аксенов<sup>2</sup>, Р. Нойберт<sup>3</sup>, И. Кольбрехер<sup>4</sup>

<sup>1</sup>e-mail: elena@jinr.ru, Лаборатория информационных технологий, ОИЯИ, Дубна; <sup>2</sup>Лаборатория нейтронной физики, ОИЯИ, Дубна; <sup>3</sup>Университет Мартина Лютера, Халле, Германия; <sup>4</sup>Институт Пауля Шеррера, Виллинген, Швейцария

## Введение

На протяжении ряда лет в ЛИТ ОИЯИ в сотрудничестве с ЛНФ ОИЯИ проводится численное исследование наноструктуры и свойств одно- и многокомпонентных липидных систем в полидисперсных везикулярных системах на основе экспериментальных данных малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН), получаемых как в ЛНФ, так и в зарубежных научных центрах. В 2008 году проведен анализ данных МУРН для четырехкомпонентной мембраны на основе церамида 6 в однослойных везикулах при двух значениях температуры: 32°C и 60°C [1].

Активный интерес к экспериментальным исследованиям многокомпонентных липидных систем, приготовленных на основе церамида 6, связан с возможностью получать информацию об принципиальных закономерностях строения и функционирования липидной матрицы верхнего слоя кожи млекопитающих *stratum corneum* (SC). Важнейшим вопросом организации липидной матрицы SC является физико-химическая основа сверхсильного притяжения между соседними бислоями [2]. Исследование однослойных везикул в избытке воды представляет собой один из методов проверки этого взаимодействия [3].

Малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН) [4],[5] – эффективный метод исследования структуры везикулярных систем в избытке воды, позволяющий определять размер везикулы и внутреннюю наноструктуру ее липидного бислоя (толщину бислоя, толщину гидрофильной и гидрофобной областей, количество молекул воды в гидрофильной части бислоя и др.) [5].

Ниже представлены некоторые результаты проведенного по данным МУРН численного анализа структуры и свойств четырехкомпонентной мембраны церамид 6 / холестерин / пальмитиновая кислота / сульфат холестерина в полидисперсной популяции однослойных везикул. Измерения спектров МУРН проводились на малоугловом спектрометре SANS-1 PSI (Виллинген, Швейцария) при температуре 32°C и 60°C.

## Метод численного анализа

Для определения формы и внутренней структуры везикул использовался метод разделенных формфакторов SFF [5]-[8], разработанный для исследования однослойных везикул диаметром  $\geq 500\text{\AA}$  по данным МУРН. SFF метод, в отличие от других известных подходов (например, оболочечная модель [4], приближение Гинье [9, 10]), позволяет использовать для аппроксимации распределения плотности длины рассеяния нейтронов в направлении нормали мембраны  $\rho(x)$  любую подходящую функцию [5],[6]. В наших расчетах функция  $\rho(x)$  аппроксимировалась на основе гидрофобно-гидрофильного (НН) приближения (см. рис. 1).

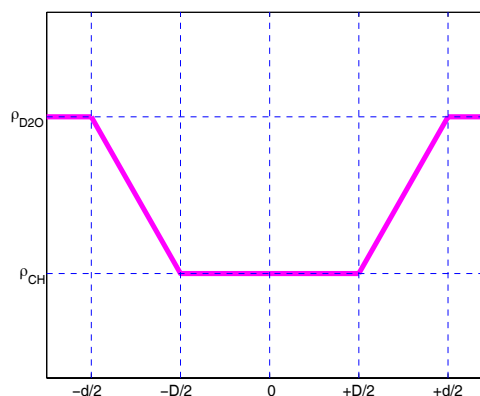


Рис. 1. НН-аппроксимация плотности длины рассеяния поперек липидного бислоя.  $d$  – толщина мембраны,  $D$  – толщина гидрофобной части мембраны. Плотность длины рассеяния углеводородных хвостов  $\rho_{CH} = -0.36 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$ , плотность длины рассеяния воды  $\rho_{D_2O} = 6.33 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$ .

Как показано в [11], НН-приближение с линейным распределением воды внутри мембраны является эффективным для моделирования липидных систем с большой величиной гидратации или малой полярной головой молекул, поскольку для таких везикулярных систем вклад распределения воды внутри бислоя в общее распределение плотности длины рассеяния нейтрона  $\rho(x)$  доминирует по сравнению с вкладом от

полярной части мембраны [12]. В рамках НН-приближения только два свободных параметра необходимы для моделирования функции  $\rho(x)$ : толщина мембраны  $d$  и толщина гидрофобной области  $D$ . Поэтому такой подход существенно улучшает качество подгонки по сравнению с более сложными моделями  $\rho(x)$  и обеспечивает возможность определить основные параметры везикулярных систем без привлечения дополнительных экспериментальных методов (рассеяние света, дифракция и т.д.).

Приведем кратко основные формулы, определяющие SFF метод. Макроскопическое сечение монодисперсной популяции везикул определяется формулой

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega_{mon}} = nF_s(q, R)F_b(q, d)S(q), \quad (1)$$

где  $S(q)$  – структурный фактор в форме Дебая [8],  $n$  – число везикул на единицу объема,  $F_s$  и  $F_b$  – соответственно формфактор бесконечно тонкой сферы и формфактор бислоя:

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

$$F_b(q, d) = \left(\int_{-d/2}^{d/2} \rho(x) \cdot \cos(qx) \cdot dx\right)^2. \quad (3)$$

С учетом полидисперсности везикулярной системы, описываемой распределением Шульца

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

где  $\langle R \rangle$  – средний радиус везикулы,  $m$  – коэффициент полидисперсности, макроскопическое сечение  $d\Sigma(q)/d\Omega$  полидисперсной популяции везикул имеет вид

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = \frac{\int_{R_{min}}^{R_{max}} \frac{d\Sigma}{d\Omega_{mon}}(q, R) \cdot G(R, \langle R \rangle) \cdot dR}{\int_{R_{min}}^{R_{max}} G(R, \langle R \rangle) \cdot dR}$$

и далее корректируется с учетом некогерентного фона  $IB$  и функции разрешения спектрометра [13], которая вычисляется согласно [14]. Пределы интегрирования  $R_{min}$  и  $R_{max}$  соответственно равны 100 Å и 1000 Å. Параметрами фитирования являются: средний радиус везикулы  $\langle R \rangle$ , коэффициент полидисперсности  $m$ , число везикул  $n$  на единицу объема, величина некогерентного фона  $IB$  и параметры функции  $\rho(x)$ , моделирующей плотность длины рассеяния нейтронов (в нашем случае это толщина мембраны  $d$  и толщина гидрофобной области  $D$ ). Плотность длины рассеяния углеводородных хвостов

фиксировалась  $\rho_{CH} = -0.36 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$  так же как и плотность длины рассеяния воды  $\rho_{D_2O} = 6.33 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$  [4]. Среднеквадратичное отклонение от среднего радиуса  $\langle R \rangle$  рассчитывалось по формуле  $\sigma = \sqrt{(m+1)^{-1}}$ .

Расчеты проводились с использованием программы DFUMIL из библиотеки JINRLIB (<http://www.jinr.ru/programs/jinrlib>), реализующей обобщенный метод наименьших квадратов.

## Результаты и выводы

Подгонка расчетных спектров МУРН к экспериментальным данным в полном диапазоне значений вектора рассеяния  $0.0033 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.56 \text{ \AA}^{-1}$  на основе метода SFF-НН не обеспечила хорошего согласия с экспериментальными спектрами в области малых значений  $q$  [1]. Это можно объяснить наличием сильного короткодействующего взаимодействия везикул между собой и образованием кластерных структур, что не учитывается в рамках рассматриваемой модели.

Данное предположение обусловлено следующими факторами. Экспериментальные спектры в области малых значений  $q$  лежат выше расчетных кривых, хотя влияние структурного фактора в форме Дебая учитывалось при проведении вычислений, а кулоновское взаимодействие, возникающее из-за наличия сульфата холестерина, экранировалось за счет Ph=9 и наличия в водном растворе молекул NaCl. С другой стороны, влияние дальнедействующего кулоновского межмембранного взаимодействия привело бы к уменьшению экспериментальных значений по сравнению с расчетом в области влияния формфактора сферы (малые значения  $q$ ). Поэтому можно заключить, что увеличение макроскопического сечения МУРН связано с агрегацией однослойных везикул в кластеры.

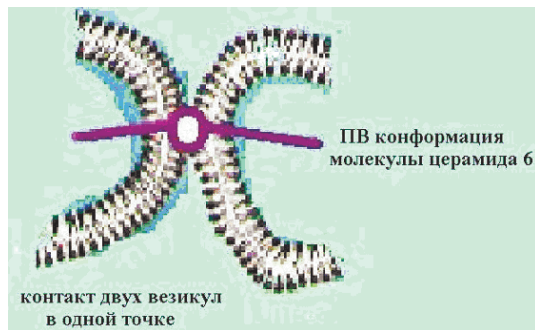
Известно два вида агрегации, основанной на короткодействующих взаимодействиях. *Первый* вид – это слияние однослойных везикул в многослойные с существенно большим размером. Такая поверхностная агрегация (слияние везикул) возникает за счет короткодействующих гидратационных сил притяжения. Однако в данном случае возникновение многослойных везикул не подтверждается видом экспериментального спектра. Действительно, в спектре отсутствует характерный для многослойных везикул дифракционный пик в области формфактора липидного бислоя  $q \approx 0.1 - 0.15 \text{ \AA}^{-1}$ .

В работах [2],[3] была высказана гипотеза о *втором* типе агрегации, возникающей при укреплении структуры плоских многослойных модельных мембран липидной матрицы SC за счет плотностью вытянутой (ПВ) конформации молекул

Таблица 1. Параметры 1% (w/w) полидисперсной везикулярной системы на основе церамида 6 в зависимости от температуры, полученные подгонкой в диапазоне  $q \geq 0.02 \text{ \AA}^{-1}$

T, °C	$\langle R \rangle, \text{ \AA}$	m	$\sigma, \%$	d, \AA	D, \AA
32	$256 \pm 1$	$18 \pm 0.5$	23	$49 \pm 2$	$27.0 \pm 2$
60	$291 \pm 1$	$31 \pm 0.5$	18	$45 \pm 2$	$25.5 \pm 3$

церамида 6 (арматурное укрепление многослойной структуры). В однослойной изолированной везикуле все молекулы церамида 6 находятся в односторонней (ОС) конформации. При стерическом контакте двух сферических везикул, возможен переход молекулы церамида 6 из ОС конформации в ПВ конформацию за счет chain flip перехода [3].



(а)



(б)

Рис. 2. (а) Пример контакта двух однослойных везикул в одной точке за счет перехода молекулы церамида 6 в ПВ конформацию. (б) Агрегация однослойных многокомпонентных везикул на основе церамида 6 в кластерную структуру типа “бус”.

При этом возникает контакт двух сфер в одной точке (рис.2а). Взаимодействие между везикулами является короткодействующим и не приводит к возникновению структурного фактора. Однако в результате такого взаимодействия возможно образование везикулярных агрегатов типа “бус” (рис. 2б).

Поскольку эффект взаимодействия везикул должен существенно влиять на поведение кривой спектра МУРН с области малых  $q$ , была выполнена подгонка параметров по данным МУРН в диапазоне  $q > 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ , где влияние взаимодействия везикул на спектр МУРН незначительно.

Соответствующие значения параметров, указанные в табл. 1, не противоречат данным для аналогичных многокомпонентных систем, полученным в [2] на основе нейтронной дифракции и в [11] на основе МУРН.

На рис. 3,4 в сравнении с экспериментальными данными представлены расчетные кривые, построенные для полного диапазона значений  $q$  ( $0.0033 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.56 \text{ \AA}^{-1}$ ) с использованием указанных в табл. 1 параметров. Видно, что такая подгонка обеспечивает лучшее согласие с данными МУРН для больших значений  $q$ , в то время как для малых значений  $q$ , естественно, наблюдается существенное расхождение с экспериментом.

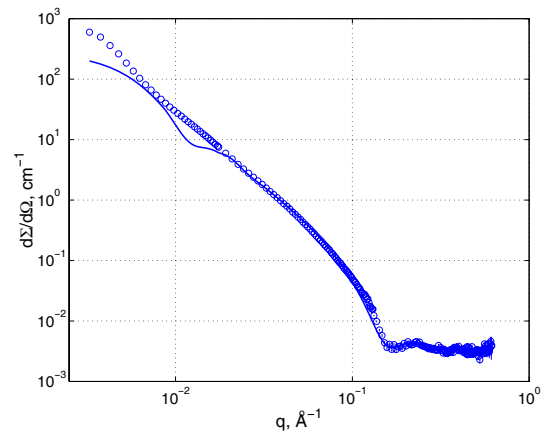


Рис. 3. Результаты фитирования в рамках SFF-НН модели спектров МУРН, измеренных на полидисперсной популяции однослойных везикул церамид 6 / холестерин / пальмитиновая кислота / сульфат холестерина при температуре  $32^\circ\text{C}$ . Подгонка выполнена в диапазоне  $q \geq 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ . Параметры подгонки указаны в табл. 1

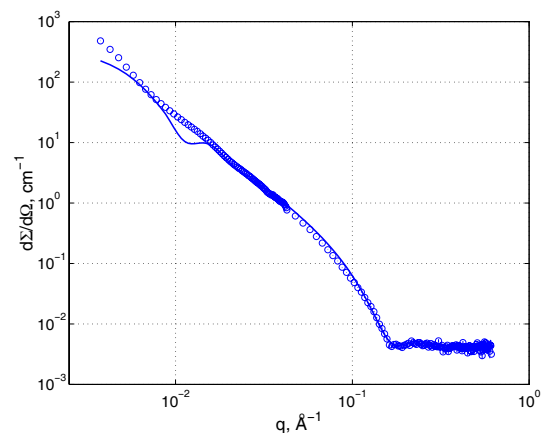


Рис. 4. То же, что и на рис. 3, но для температуры  $60^\circ\text{C}$

Полученное значение толщины изогнутого липидного бислоя мембраны составляет  $49.0 \pm 2 \text{ \AA}$

при 32°C, что больше толщины бислоя этой же мембраны в плоском состоянии  $46.45 \pm 0.03 \text{ \AA}$  [2]. Это подтверждает сделанный в [5] относительно фосфолипидов вывод о зависимости толщины липидного бислоя от его кривизны. Большая толщина изогнутого бислоя является следствием менее плотной упаковки углеводородных цепочек в нем.

Таким образом, по части спектра  $q > 0.02 \text{ \AA}^{-1}$  удастся восстановить параметры, определяющие внутреннюю структуру бислоя и величину некогерентного фона. В то же время для обоснованного определения параметров среднего радиуса и полидисперсности необходимо учитывать наличие в везикулярной системе уже упомянутых выше кластерных структур, что требует дальнейшего развития модели.

Расчеты на основе метода разделенных формфакторов показали, что наноструктура бислоя однослойных везикул в избытке воды отличается от наноструктуры частичного гидратированного плоского бислоя. В области малых углов рассеяния наблюдается расхождение расчетной кривой с экспериментальным спектром, которое указывает на сильное короткодействующее взаимодействие везикул между собой и образование кластерных структур, что подтверждает явление chain-flip переходов.

Полученный результат имеет существенное значение для понимания диффузии воды через SC человека, а также открывает направление поиска веществ, увеличивающих проницаемость кожи для лекарств. Известно, что нативная (биологическая) липидная матрица кожи млекопитающих является плохоупорядоченным двухфазным жидким кристаллом. В дифракционных экспериментах на нативных мембранах SC удастся измерять, как правило, только первый и второй дифракционные пики. Таким образом, в такой мембране возможны участки большой кривизны. Менее плотная упаковка молекул изогнутого бислоя облегчает диффузию воды в ламеллярном направлении перпендикулярно бислою (липофильная диффузия). Отсюда следует, что поиск веществ, увеличивающих проницаемость кожи человека для лекарств, следует вести

среди веществ, увеличивающих дефекты (развивающих доменную структуру) липидной матрицы SC.

## Список литературы

- [1] *Е.В. Земляная, М.А. Киселев, Р. Нойберт, И. Кольбрехер, В.Л. Аксенов* // Поверхность: рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, №11, 2008, с.14-19
- [2] *М.А. Kiselev, N.Yu. Ryabova, A.M. Balagurov, S. Dante, T. Hauss, J. Zbytovska, S. Wartewig, R.H.H. Neubert.* // European Biophys. J. 2005. V. 34. P. 1030.
- [3] *М.А. Киселев.* // Кристаллография. 2007. V. 52. P. 572.
- [4] *Schmiedel H., Joerchel P., Kiselev M., Klose G.* // J. Phys. Chem. B. 2001. V. 105. P. 111.
- [5] *М.А.Киселев, Е.В.Земляная, В.К.Асвал, Р.Н.Н.Неуберт.* // European Biophys. J. 2006. V. 35. N. 6. P. 477.
- [6] *Kiselev M.A., Lesieur P., Kisselev A.M., Lombardo D., Aksenov V.L.* // J. Appl. Phys. A. 2002. V. 74. P. S1654.
- [7] *Земляная Е.В., Киселев М.А.* Определение структуры однослойных везикул DMPC по данным малоуглового рассеяния нейтронов в рамках модели разделенных формфакторов. Сообщение РЗ-2002-163. Дубна: ОИЯИ. 2002. 10с.
- [8] *М.А.Киселев, Д.Ломбардо, А.М.Киселев, П.Лези, В.Л.Аксенов* // Поверхность. 2003. No. 11. С.20.
- [9] *Свергун Д.И., Фейгин Л.А.* Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986. 276с.
- [10] *W. Knoll, J. Haas, H. Stuhrmann, H.H. Fuldner, H. Vogel, E. Sackmann* // J. Appl. Cryst. 1981. V.14. P.191.
- [11] *E.V.Zemlyanaya, M.A.Kiselev, J.Zbytovska, L.Almasy, V.K.Asval, P.Strunz, S.Wartevig, R.H.H.Neubert.* // Crystallography reports. 2006. V.51 Suppl. 1. P. S22.
- [12] *М.А.Киселев, Е.В.Земляная, В.Асвал.* // Crystallography Rep. 2004. V.1. P.S131.
- [13] *Ostanevich Y.M.* // Makromol. Chem., Macromol. Symp. 1988. V. 15. P. 91.
- [14] *Pedersen J.S., Posselt D., Mortensen K.* // J. Appl. Cryst. 1990. V. 23. P. 321.
- [15] *Dymov S.N., Kurbatov V.S., Silin I.N., Yaschenko S.V.* // Nucl. Instum. Methods in Phys. Res. A. 2000. V. 440. P. 431.