

ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На правах рукописи
УДК 538.91, 577.352.2

РЯБОВА
Наталья Юрьевна

СТРУКТУРА И ГИДРАТАЦИЯ
МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН НА ОСНОВЕ ЦЕРАМИДА-6.
ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ДИФРАКЦИИ НЕЙТРОНОВ В РЕАЛЬНОМ
ВРЕМЕНИ

01.04.07 – физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Дубна – 2010

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка
Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна, Московская обл.,
Россия).

Научные руководители доктор физико-математических наук, профессор
Анатолий Михайлович Балагуров

кандидат физико-математических наук
Михаил Алексеевич Киселев

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Лев Сергеевич Ягужинский

доктор физико-математических наук, профессор
Виталий Андреевич Трунов

Ведущая организация: РНЦ «Курчатовский институт», Институт
сверхпроводимости и физики твердого тела

Защита состоится “___” _____ 2010 г. в ___ часов на заседании
диссертационного совета Д 720.001.06 при Лаборатории нейтронной физики и
Лаборатории ядерных реакций Объединенного института ядерных
исследований (141980, г. Дубна Московской области).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Объединенного института
ядерных исследований.

Автореферат разослан “___” _____ 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат физико-математических наук

А. Г. Попеко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Интерес к изучению липидных систем на основе церамидов продиктован, прежде всего, тем, что церамиды являются основным компонентом липидной матрицы верхнего слоя кожи *stratum corneum* (SC), а также входят в состав липидных рафтов – участков биологической мембраны, с которыми сопряжены многие функции: клеточное деление, клеточная дифференцировка, апоптоз (смерть клетки), белковый транспорт и др. Особый интерес представляет изучение процессов гидратации липидной составляющей SC, поскольку сегодня общепризнано, что диффузия воды через SC осуществляется через его липидную матрицу, состав и организация которой определяют барьерные функции кожи. Исследования процессов диффузии воды и происходящих в этих процессах структурных изменений липидного бислоя являются основой для изучения механизма проникновения воды через кожу человека, имеющего большое значение в поиске новых переносчиков лекарств через кожу и разработке косметической продукции. Изучение модельных липидных систем с известным составом делает возможным охарактеризовать роль отдельных липидов в структурной организации и свойствах липидных бислоев SC. Исследования модельных систем SC на основе индивидуальных типов церамидов методом нейтронной дифракции были начаты с исследования структуры четырехкомпонентной мембраны церамид-6/пальмитиновая кислота/холестерин/сульфат холестерина в [1] и в настоящее время ведутся научной группой в ЛНФ ОИЯИ и в Институте Мартина-Лютера (Галле, Германия).

Информацию о процессах диффузии в модельных мембранах – изменение структурных параметров в ходе кинетического процесса и характерные времена самого процесса можно получить при исследовании этих процессов в реальном времени. В первых дифракционных экспериментах по исследованию гидратации липидных мембран, выполнявшихся на импульсном источнике нейтронов ИБР-2 еще в 1980х гг., прослеживалась эволюция только одного, наиболее интенсивного дифракционного пика [2, 3]. В таком эксперименте удавалось получить информацию о временной зависимости только периода повторяемости многослойной мембраны. Однако уже тогда было показано, что на дифрактометре по времени пролета на высокопоточном импульсном источнике нейтронов есть возможность одновременной регистрации нескольких порядков отражения от ламеллярной структуры ориентированных фосфолипидных мембран на подложке за сравнительно короткое время [4]. Развитие этой возможности, а именно, многократное и быстрое измерение полного дифракционного спектра непосредственно в ходе переходного

процесса, открывает перспективу изучения изменения структуры мембраны в реальном времени в кинетических процессах.

Основные цели и задачи работы. Целью работы является изучение структурных изменений в модельных липидных мембранах на основе церамида-6 в процессах гидратации методом дифракции в реальном времени.

Для достижения указанных целей были поставлены задачи:

1. Развить и отработать метод дифракции нейтронов в реальном времени для изучения структурных изменений липидного бислоя в ходе кинетических процессов на примере исследования гидратации и дегидратации мембран, приготовленных из дипальмитоилфосфотидилхолина (ДПФХ) и смеси ДПФХ/холестерин.
2. Применить метод дифракции нейтронов в реальном времени для изучения процесса гидратации в парах воды модельных мембран, приготовленных из смеси ДПФХ с церамидом-6, и модельных мембран *stratum corneum* на основе церамида-6.
3. Определить влияние смеси шести свободных жирных кислот, наиболее распространенных в природной липидной матрице *stratum corneum*, на структуру и гидратацию модельных мембран *stratum corneum* на основе церамида-6.

Научная новизна. В работе прослежена эволюция структурных параметров модельных мембран из ДПФХ и мембраны двойной системы ДПФХ/холестерин в процессах гидратации и дегидратации и мембраны двойной системы ДПФХ/церамид-6 в процессе гидратации парами воды. Определены временные константы структурных изменений в этих процессах.

Впервые методом дифракции нейтронов исследовано влияние смеси шести наиболее распространенных в природной липидной матрице *stratum corneum* жирных кислот на структуру и гидратацию модельных мембран *stratum corneum* на основе церамида-6. Установлена, что структура этих мембран является стабильной относительно замены пальмитиновой кислоты на композицию жирных кислот. Получены характерные времена гидратации мембран *stratum corneum* со смесью шести жирных кислот. Установлено, что композиция жирных кислот сокращает характерное время гидратации мембраны с 94 до 61 минуты. Впервые охарактеризована гидратация модельной мембраны *stratum corneum* на основе церамида-6 парами воды.

Научная и практическая значимость работы. На примере процессов гидратации в парах воды и дегидратации модельных мембран на основе фосфолипида показана возможность изучения методом дифракции нейтронов

структурных изменений липидных мембран в переходных процессах, характерное время которых составляет несколько минут и больше. Развитая методика дифракции нейтронов в реальном времени для изучения кинетических процессов в липидных системах может быть эффективно применена в исследованиях процессов диффузии воды и растворов других веществ через модельные мембраны *stratum corneum*, характерные времена которых составляют десятки минут. Подобные исследования являются важными для изучения физических принципов механизма проникновения лекарственных и косметических препаратов через кожу человека.

Личный вклад автора. Автор участвовал во всех работах, результаты которых вошли в диссертацию: при изготовлении образцов, проведении экспериментов, обработке экспериментальных данных и интерпретации результатов, их представлении и опубликовании.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: IV и V Рабочие совещания по исследованиям на реакторе ИБР-2 (Дубна, 2005, 2006), V Национальная конференция по применению рентгеновского, синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования наноматериалов и наносистем (Москва, 2005), Специальное совещание FEBS “New concepts in lipidology: from lipidomics to disease” (Нордвийкерхаут, Нидерланды, 2006), XIX Совещание по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния (Обнинск, 2006), европейская школа “4th Central European Training School on Neutron Scattering” (Будапешт, Венгрия, 2007), BENSC user's meeting (Берлин, Германия, 2007), интернациональный симпозиум “International Symposium on Time-Resolved Processes in Condensed Matter” (Геттинген, Германия, 2007), международная школа-семинар “The 2nd Joint Seminar-School JINR-ROMANIA on Neutron Physics for Investigations of Nuclei, Condensed Matter and Life Sciences” (Байя-Маре, Румыния, 2007), 6th Euro Fed Lipid Congress (Афины, Греция, 2008), XX Совещание по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния (Гатчина, 2008), Advanced Workshop on “Neutron probing for compositional and structural characterisation of materials and biological samples” (Дельфт, Нидерланды, 2009), а также на семинарах НЭОНИКС ЛНФ ОИЯИ (2007, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ в реферируемых журналах [A1-A5].

Структура диссертации. Диссертация состоит из списка сокращений и обозначений, введения, пяти глав, заключения, списка цитируемой литературы

и приложения. Диссертация содержит 130 страниц машинописного текста, включая 46 рисунков, 9 таблиц, 1 приложение и 125 библиографических ссылок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дано обоснование актуальности работы, сформулированы цели и задачи, результаты, выносимые на защиту. Дается характеристика научной новизны и практической ценности полученных результатов. Кратко изложена структура и содержание диссертации.

Первая глава посвящена обзору литературных источников по теме диссертации. Кратко изложена вводная информация о липидном составе биологических мембран, видах липидных структур и их свойствах, методах исследования липидных мембран. Охарактеризованы модельные фосфолипидные системы с холестерином и церамидами, являющиеся основными компонентами мембранных липидных рафтов. Представлены результаты многолетних исследований организации и свойств натурального слоя *stratum corneum* и липидных систем, моделирующих липидную составляющую SC, описаны эксперименты по гидратации нативного SC, изложены имеющиеся на сегодня теоретические модели строения липидной матрицы SC.

Во второй главе описаны материалы и методы, используемые в работе. Изложена методика приготовления образцов – модельных липидных мембран, ориентированных на кварцевой подложке. На рис. 1 представлены структурные формулы липидов, используемых для приготовления образцов.

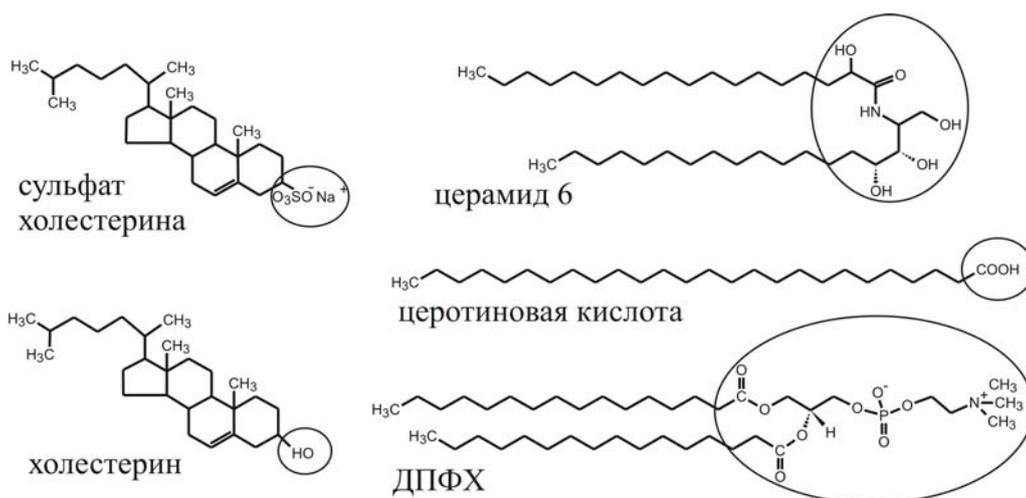


Рис. 1. Схематическое изображение молекул используемых в работе липидов, состоящих из полярной головы (выделена круговой линией) и неполярных углеводородных цепей.

Рассмотрены основы метода нейтронной дифракции на длиннопериодических одномерно упорядоченных структурах. Задачей структурного анализа липидных мембран является определение параметров липидного бислоя при анализе рассеивающей плотности нейтронов $\rho_{\text{exp}}(x)$ (фурье-профиля). Построение распределения $\rho_{\text{exp}}(x)$ вдоль перпендикулярного плоскости мембраны направления выполняется с помощью обратного фурье-преобразования экспериментальных структурных факторов F_{h00} :

$$F(h00) = \iiint \rho(x, y, z) e^{2\pi i h x} dx dy dz = \int e^{2\pi i h x} dx \iint \rho(x, y, z) dy dz = \int e^{2\pi i h x} \langle \rho(x) \rangle dx, \quad (1)$$

$$\rho_{\text{exp}}(x) = \langle \rho(x) \rangle = a + b \sum_{h=1}^{h_{\text{max}}} F_h \cos\left(\frac{2\pi h x}{d} + \varphi_h\right)$$

Здесь $\langle \rho(x) \rangle$ – проекция $\rho(x, y, z)$ на направление x , h – порядок отражения, d – период повторяемости мембраны, $F_h = F_{h00}$ – структурный фактор h -го пика, φ_h — знак структурного фактора (+ или -), константы a и b определяются из нормировки $\rho_{\text{exp}}(x)$.

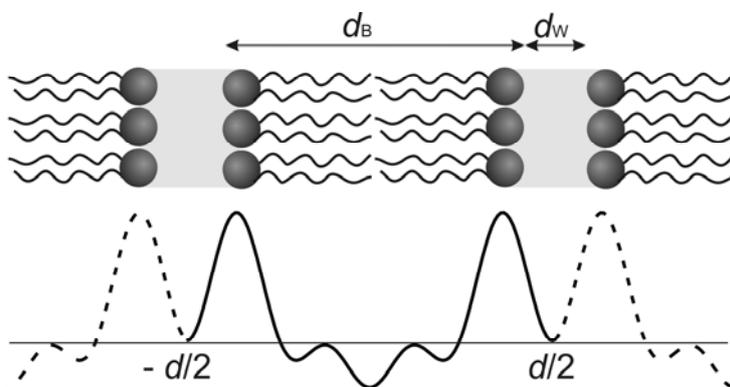


Рис. 2. Схематическое изображение соответствия нейтронного фурье-профиля мембраны (сплошная линия) внутренней структуре липидного бислоя. Два симметричных максимума профиля соответствуют области полярных голов, профиль в положениях $\pm d/2$ – центру межмембранного пространства (здесь $\rho(\pm d/2)=0$ при содержании в воде 8% D_2O). Пунктирной линией изображено продолжение фурье-профилей соседних бислоев.

На рис. 2 показано соответствие нейтронного фурье-профиля мембраны ее внутренней структуре. Основные структурные характеристики липидных мембран: период повторяемости ламеллярной структуры, толщина липидного бислоя, толщина области полярных голов, толщина слоя воды в

межмембранном пространстве – рассчитываются при симуляции профиля рассеивающей плотности модельной функцией, являющейся суммой функций Гаусса, соответствующих отдельным молекулярным группам.

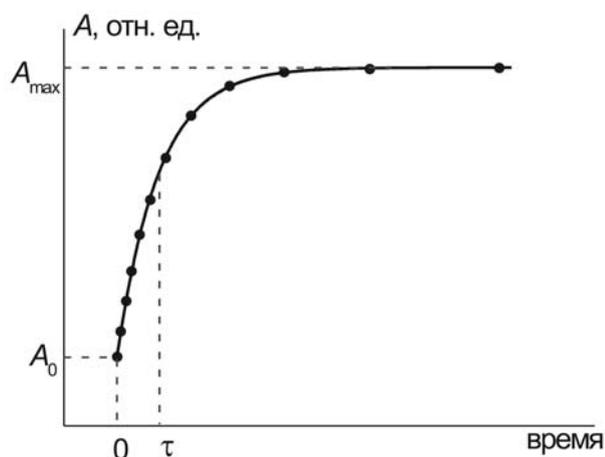


Рис. 3. Схематическое изображение экспоненциального изменения величины A во времени от значения A_0 до значения A_{\max} в переходном процессе, а именно $A = A_0 + (A_{\max} - A_0)(1 - e^{-t/\tau})$. Время $t = \tau$ – характерное время процесса, точки соответствуют зарегистрированным в разные моменты времени состояниям системы.

Представлены схемы и параметры экспериментальных установок, на которых были выполнены эксперименты, изложена методика эксперимента на стационарном и импульсном источниках нейтронов. Изложен метод дифракции нейтронов в реальном времени для изучения переходных процессов. Метод основан на возможности одновременной регистрации нескольких порядков отражения от ламеллярной структуры. Условием реализации этого метода является достаточно большая скорость накопления экспериментальных данных, при которой за время, равное характерному времени процесса τ , можно зарегистрировать несколько значений меняющегося параметра (рис. 3). Для этого выбираемое время измерения дифракционного спектра должно быть достаточным для набора спектра с необходимой для дальнейшего анализа статистикой, но заметно меньше τ .

В третьей главе представлены результаты экспериментов по гидратации и дегидратации мембран ДПФХ и ДПФХ/холестерин. Измерение дифракционных спектров от мембраны в реальном времени позволило проследить изменение ее структуры, происходящие в ходе переходных процессов.

На рис. 4 представлена последовательность нейтронных дифракционных спектров от мембраны ДПФХ, измеренная в процессе ее гидратации при

переходе из состояния с низкой влажностью к состоянию с высокой относительной влажностью (RH) паров воды и при последующей дегидратации при переходе к низкой относительной влажности. Относительная влажность 98% задавалась помещением в измерительную камеру насыщенного раствора соли K_2SO_4 . Нейтронограммы регистрировались в течение 457 минут с постепенно увеличивающимся от 3 до 60 мин временем набора одного спектра. После достижения образцом равновесного состояния, определяемым по выходу значения периода повторяемости на постоянное значение, раствор соли K_2SO_4 заменялся на насыщенный раствор $NaBr$, задающий 58% RH, и процесс дегидратации мембраны регистрировался в течение последующих 420 мин.

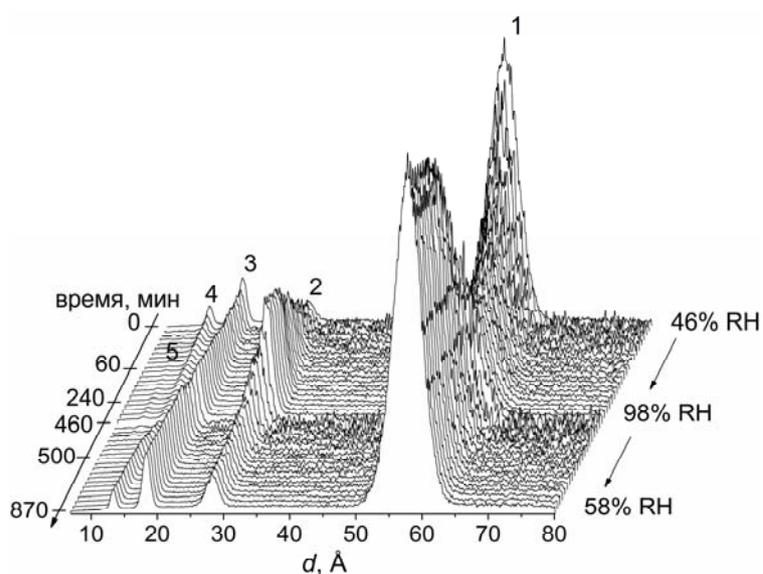


Рис. 4. Последовательность нейтронных дифракционных спектров от мембраны ДПФХ, измеренных в реальном времени в процессе гидратации и последующей дегидратации мембраны. Стрелки показывают направление процессов. Указаны номера порядков отражения показывают направление процессов.

Анализируя рассчитанные из дифракционных спектров распределения плотности рассеяния нейтронов мембраной, удалось пронаблюдать эволюцию основных параметров мембраны в кинетическом процессе в реальном времени (рис. 5). Изменение структурных параметров в процессе гидратации описывается экспоненциальным законом с характерным временем τ (табл. 1):

$$d(t) = d_{\infty} - \Delta d \cdot \exp(-t / \tau), \quad (2)$$

где d_{∞} – равновесное значение параметра мембраны после завершения кинетического процесса. Начальный этап дегидратации мембраны происходит намного быстрее, а изменение параметров мембраны во времени в ходе всего

процесса состоит из быстрой начальной и последующей очень медленной стадии и хорошо описывается двумя экспоненциальными зависимостями:

$$d(t) = d_{\infty} - \Delta d_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) - \Delta d_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) \quad (3)$$

с постоянными времени τ_1 и τ_2 . Наличие двух стадий в сужении водной прослойки между липидными бислоями при дегидратации можно объяснить быстрым начальным выходом "свободной" воды из межмембранного пространства и более медленным последующим этапом обмена "связанной" гидратной воды с парами воды. Также двухстадийное изменение толщины липидного бислоя и толщины области углеводородных цепочек в процессе дегидратации отражает отклик внутренней структуры мембраны на изменение степени ее гидратации.

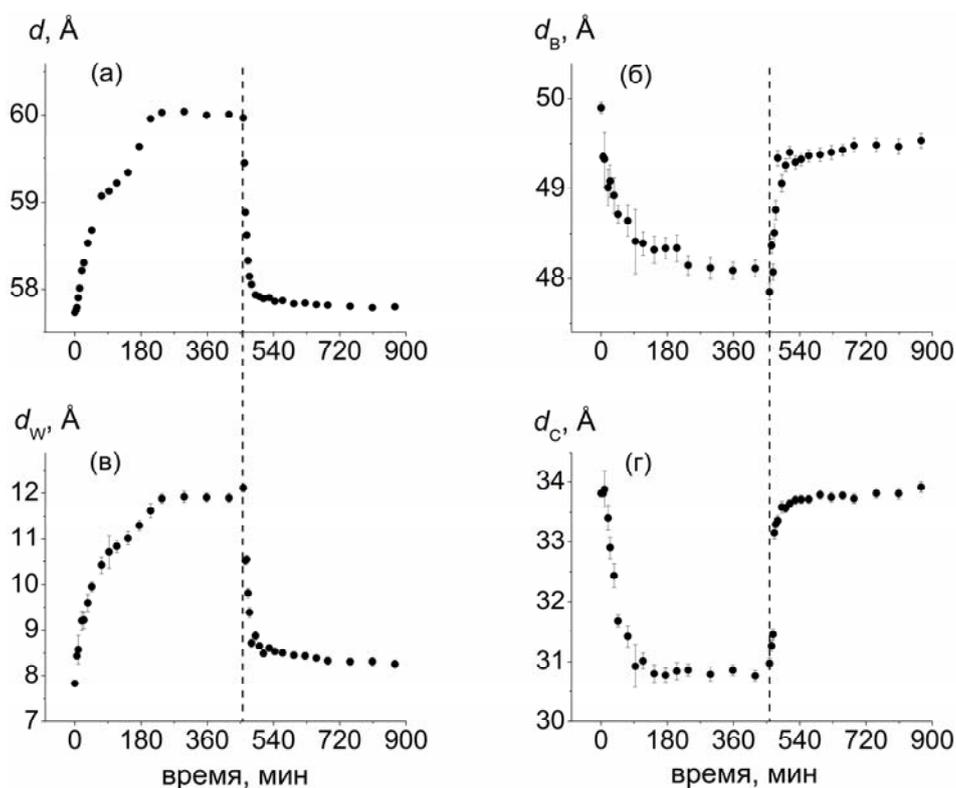


Рис. 5. Изменения (а) периода повторяемости d мембраны ДПФХ, (б) толщины липидного бислоя d_B , (в) слоя воды d_W и (г) толщины области углеводородных цепочек липидов d_C во времени в процессе гидратации и последующей дегидратации мембраны. Вертикальной линией отмечено начало процесса дегидратации.

Аналогично исследовалась кинетика водного обмена в мембране ДПФХ/холестерин с мольной долей холестерина $X_{\text{хол}} = 0,2$ при 24°C при начальной комнатной влажности 70% RH. На рис. 6 представлены временные

зависимости параметров ДПФХ/холестерин в процессах гидратации и дегидратации.

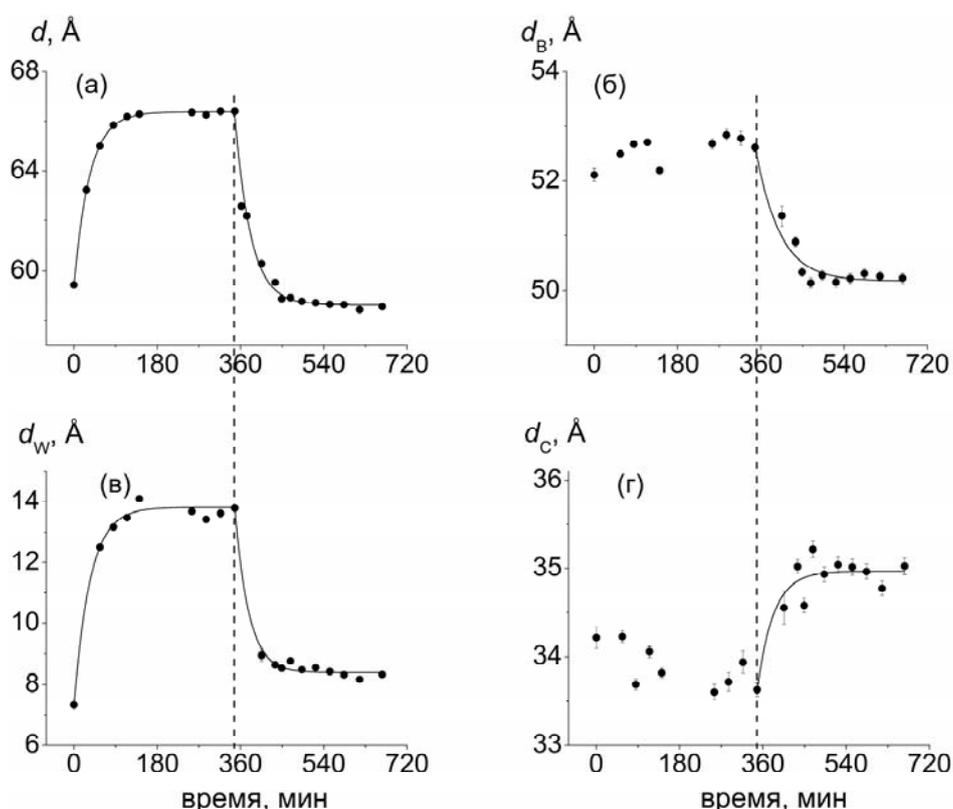


Рис. 6. Изменение (а) периода повторяемости d мембраны ДПФХ/холестерин с $X_{\text{хол}} = 0,2$, (б) толщины липидного бислоя d_B , (в) слоя воды d_W и (г) толщины области углеводородных цепочек липидов d_C во времени в процессе гидратации парами воды и последующей дегидратации мембраны при 24°C . Кривые соответствуют описанию временных зависимостей параметров функцией (2). Вертикальной линией отмечено время начала процесса дегидратации.

Изменение периода повторяемости мембраны ДПФХ/холестерин в процессе гидратации и дегидратации описывается экспоненциальным законом с характерным временем, равным для обоих процессов $\tau \approx 34$ мин. При переходе системы из комнатных условий с относительной влажностью 70% к влажности 98% толщина бислоя d_B и толщина углеводородной области d_C изменяются нерегулярным образом. Изменение параметров d_B и d_C в процессе дегидратации и слоя воды d_W в обоих кинетических процессах описываются уравнением (2). Характерные времена изменения параметров бислоев ДПФХ и ДПФХ/холестерин в кинетических процессах даны в табл. 1. Холестерин замедляет изменение внутренней структуры бислоя при дегидратации: по сравнению с мембраной ДПФХ, изменение структурных параметров которой

при дегидратации происходит в две стадии, перестройка внутренней структуры бислоя системы ДПФХ/холестерин в ходе дегидратации описывается одной экспоненциальной зависимостью с характерным временем, равным нескольким десяткам минут. Добавление холестерина изменяет состояние липидного бислоя фосфолипида, придавая ему свойства, промежуточные между свойствами бислоя в гелевой и жидкокристаллической фазах [5]. Эти изменения могут влиять и на степень связанности воды с полярными головами липидов, что и объясняет разное поведение параметров мембраны ДПФХ и мембраны ДПФХ с холестерином в процессе гидратации.

Таблица 1. Характерные времена (в минутах) процессов гидратации и дегидратации мембран ДПФХ при 20°C и ДПФХ/холестерин с $X_{\text{хол}} = 0,2$ при 24°C

процесс		d	d_B	d_C	d_W
ДПФХ					
гидратация (0-72 мин) [46% RH → 98% RH]	τ	81 ± 1	50 ± 6	52 ± 4	63 ± 4
дегидратация [98% RH → 58% RH]	τ_1	$9,6 \pm 0,2$	27 ± 4	18 ± 1	15 ± 1
	τ_2	109 ± 18	424 ± 234	238 ± 113	127 ± 57
ДПФХ/холестерин					
гидратация [70% RH → 98% RH]	τ	34 ± 1	–	–	35 ± 1
дегидратация [98% RH → 58% RH]	τ	$34,5 \pm 0,4$	52 ± 5	35 ± 9	30 ± 3

Четвертая глава содержит изложение результатов исследования влияния церамида-6 на структуру и гидратацию мембраны ДПФХ. Главным влиянием церамида-6 на структуру и свойства мембраны ДПФХ является уменьшение степени гидратации фосфолипидной мембраны, сужение водной прослойки и уменьшение проникновения воды в липидный бислой, увеличение толщины гидрофобной части бислоя (табл. 2). В тройной системе ДПФХ/церамид-6/холестерин с мольной долей холестерина и церамида-6 соответственно 0,4 и 0,3 последний вытесняет холестерин в кристаллическую фазу.

Процесс гидратации мембраны ДПФХ/церамид-6 с $X_{\text{цер}} = 0,4$ парами воды исследован при 18°C при ее переходе от 37% RH к 98% RH. Эволюцию внутренней структуры бислоя в ходе гидратации удалось проследить через час после начала кинетического процесса, когда на нейтронограмме становятся

видны высшие порядки отражения, необходимые для расчета фурье-профиля мембраны. Из рис. 7 видно, что экспоненциальное увеличение периода повторяемости мембраны за 3 часа гидратации происходит с $53,3 \pm 0,5 \text{ \AA}$ до $62,1 \pm 0,5 \text{ \AA}$. Увеличение толщины бислоя d_B и сужение углеводородной области d_C в ходе гидратации происходят в первый час гидратации. В течение последующих двух часов процесса d_B и d_C практически не изменяются, а рост периода повторяемости мембраны происходит за счет продолжающегося увеличиваться слоя воды. Скорость изменения внутренней структуры бислоя в процессе гидратации, оценена по временной зависимости изменения первого структурного фактора и совпадает со скоростью набухания мембраны ($\tau \sim 28$ мин).

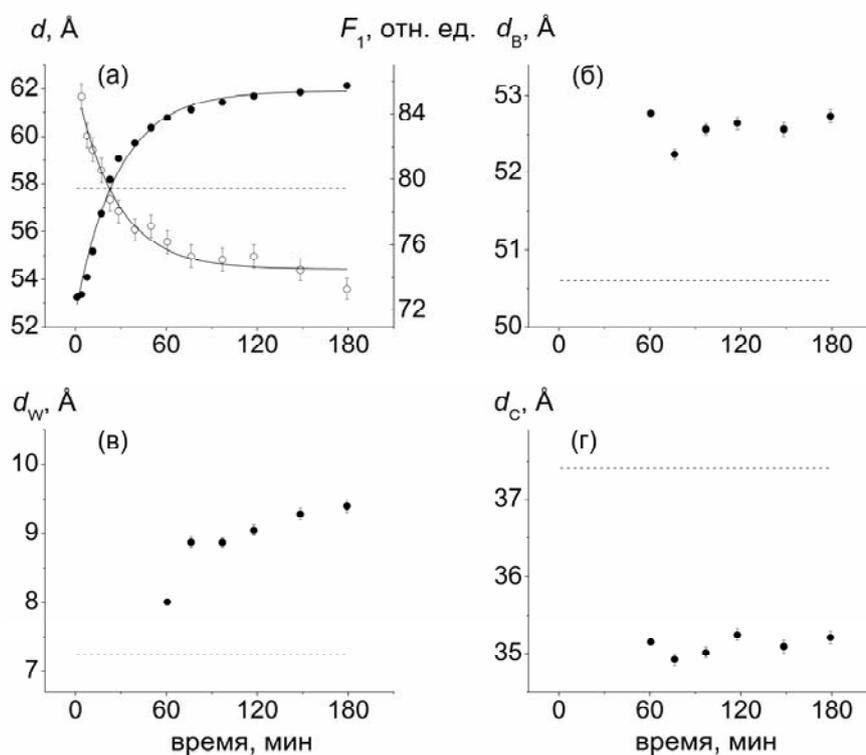


Рис. 7. Изменения (а) периода повторяемости d (●) и первого структурного фактора F_1 (○, правая шкала) мембраны ДПФХ/церамид-6 с $X_{\text{цер}}=0,4$, (б) толщины липидного бислоя d_B , (в) слоя воды d_W и (г) толщины области углеводородных цепочек липидов d_C во времени в процессе гидратации парами воды при 18°C . Кривые соответствуют описанию временных зависимостей $d(t)$ и $F_1(t)$ функцией (2) с характерными временами соответственно $28 \pm 0,2$ и 27 ± 4 мин. Пунктирными линиями обозначены значения параметров мембраны при 58% RH, 20°C .

Таблица 2. Структурные параметры мембран ДПФХ/церамид-6 с мольной долей церамида-6 $X_{\text{цер}}$ при 20°C, 58% RH и при 98% RH для $X_{\text{цер}} = 0$ и 0,4, а также параметры мембраны тройной системы ДПФХ/церамид-6/холестерин с $X_{\text{цер}} = 0,3$ и $X_{\text{хол}} = 0,4$ при 20°C, 58% RH

$X_{\text{цер}}$	$d, \text{Å}$	$d_B, \text{Å}$	$d_C, \text{Å}$	$d_W, \text{Å}$
ДПФХ/церамид-6				
0	$57,8 \pm 0,1$	$49,2 \pm 0,1$	$33,9 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,2$
0*	$60,0 \pm 0,1$	$48,1 \pm 0,1$	$30,8 \pm 0,1$	$11,9 \pm 0,1$
0,2	$58,6 \pm 0,1$	$50,4 \pm 0,1$	$35,3 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,1$
0,32	$57,3 \pm 0,1$	$50,3 \pm 0,1$	$37,2 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,2$
0,4	$57,8 \pm 0,1$	$50,6 \pm 0,2$	$37,4 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,2$
0,4*	$62,1 \pm 0,1$	$52,7 \pm 0,1$	$35,2 \pm 0,2$	$9,4 \pm 0,1$
ДПФХ/церамид-6/холестерин				
$X_{\text{цер}}/X_{\text{хол}}$				
0,3/0,4	$55,8 \pm 0,5$	$47,7 \pm 0,1$	$32,6 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,1$

* измерено при 98% RH

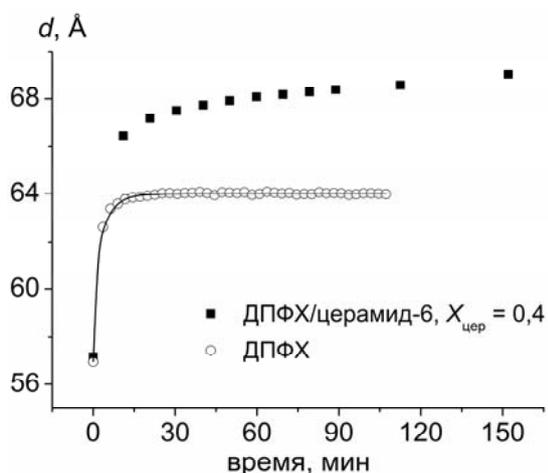


Рис. 8. Изменения периода повторяемости мембран ДПФХ и ДПФХ/церамид-6 при гидратации в избытке тяжелой воды при 20°C. Кривая соответствует описанию зависимости $d(t)$ функцией (2).

На рис. 8 представлены временные зависимости набухания мембран ДПФХ и ДПФХ/церамид-6 ($X_{\text{цер}} = 0,4$) при гидратации в избытке воды. В воде мембрана ДПФХ набухает на $\Delta d = 7,0 \pm 0,1 \text{ Å}$ до $64,0 \pm 0,1 \text{ Å}$ в полностью гидратированном состоянии. Церамид-6 значительно увеличивает набухание мембраны: $\Delta d = 11,8 \pm 0,1 \text{ Å}$, значение периода повторяемости в полностью гидратированном состоянии составляет $69,0 \pm 0,1 \text{ Å}$. Это увеличение Δd может быть результатом увеличения, как

межмембранного пространства, так и увеличения толщины бислоя. Зависимость $d(t)$ для ДПФХ описывается функцией (2) с $\tau = 2,4 \pm 0,1$ мин. Скачок периода повторяемости мембраны ДПФХ/церамид-6 на $9,3 \text{ Å}$ происходит в течение первых 10 минут, после которых мембрана продолжает медленно набухать еще

на 2,5 Å. Т.о., керамид-6 замедляет процесс набухания фосфолипидной мембраны в избытке воды, тогда как при гидратации мембраны парами воды отличие в скоростях изменения структурных параметров мембран из чистого ДПФХ и двойной системы ДПФХ/керамид-6 не наблюдается.

По сравнению с ориентированной многослойной мембраной, моделирующей липидную составляющую верхнего слоя кожи млекопитающих *stratum corneum*, толщина межмембранного пространства мембраны ДПФХ/керамид-6 с мольной долей керамид-6 0,4 при высокой влажности значительно больше (~ 9 Å по сравнению с ~ 1 Å), а гидратация в избытке воды происходит быстрее гидратации мембраны *stratum corneum* ($\tau \sim 60-90$ мин). На основании полученной информации о структуре ориентированной мембраны ДПФХ/керамид-6 и скорости процесса ее гидратации можно заключить, что полностью вытянутая (протяженная) конформация молекул керамид-6, локализованная между соседними бислоями, обуславливающая особенности многокомпонентных мембран *stratum corneum*, в смеси с ДПФХ не выявлена. Полученные результаты допускают существование полностью вытянутой конформации молекул керамид-6 в центре бислоя, согласно модели, предложенной в диссертации [6] Д. Кесснер для описания структуры бислоев системы ДПФХ/керамид-2.

В пятой главе представлены результаты исследования влияния смеси жирных кислот на структуру и процесс гидратации ориентированных многокомпонентных мембран на основе керамид-6, моделирующих верхний слой кожи млекопитающих *stratum corneum*, в широком диапазоне температур.

Исследовались мембраны с составом керамид-6/холестерин/жирные кислоты/сульфат холестерина CER6/Chol/FFA_6/ChS и CER6/Chol/LFFA/ChS. Для смесей жирных кислот были использованы наиболее распространенные в липидной матрице SC млекопитающих пальмитиновая (C16:0, PA), стеариновая (C18:0, SA), арахиновая (C20:0, AA), бегеновая (C22:0, BA), лигноцериновая (C24:0, LA) и церотиновая (C26:0, CA) кислоты в мольном соотношении: FFA_6 = PA/SA/AA/BA/LA/CA = 1,3/3,3/6,7/41,7/36/6,7 [7] и LFFA = BA/LA/CA = 8,8/7,7/1,4.

Сравнение фурье-профилей мембран CER6/Chol/FFA_6/ChS (рис. 9) и мембраны на основе пальмитиновой кислоты CER6/Chol/PA/ChS (рис. 10) показывает близость их внутренней структуры, главной особенностью которой является чрезвычайно малое межмембранное пространство, на что указывает характерный вид профиля и которое объяснялось стяжкой соседним бислоев до стерического контакта друг с другом полностью протяженной конформацией молекул керамид-6 [8]. Основные параметры липидного бислоя мембран

CER6/Chol/FFA_6/ChS при 20 – 32°C даны в табл. 3. Мембраны CER6/Chol/FFA_6/ChS с разным весовым соотношением компонентов имеют близкие структурные параметры. Толщина гидрофобной области мембран CER6/Ch/FFA_6/ChS несколько больше, чем мембраны CER6/Chol/PA/ChS. Подобное явление найдено в системах CER6/Chol/FA/ChS с отдельными жирными кислотами: жирные кислоты, стремясь заполнить некоторый свободный объем в бислое, созданный молекулами церамида-6, находятся в состоянии с взаимопроникающими (*interdigitated*) углеводородными цепочками [9]. Это взаимопроникновение углеводородных цепочек жирных кислот приводит к сужению области углеводородных цепочек мембран CER6/Ch/FFA_6/ChS.

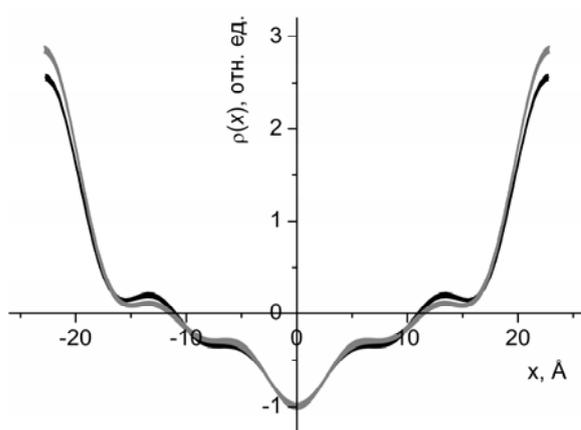


Рис. 9. Распределения рассеивающей нейтронной плотности $\rho_{\text{exp}}(x) \pm \Delta\rho_{\text{exp}}(x)$ мембраны CER6/Chol/FFA_6/ChS с соотношением компонент 55/20/15/10 (черная линия) и 66/10/18/6 (серая линия) при 58% RH, 32°C, 8% D₂O.

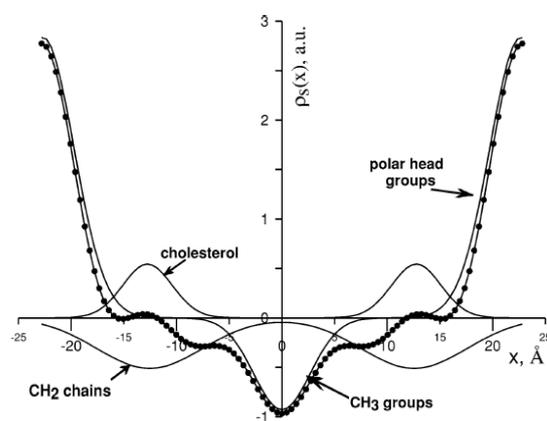


Рис. 10. Фурье-профиль мембраны CER6/Chol/PA/ChS = 55/25/15/5 при 58% RH, 32°C, 8% D₂O и фитирующая кривая (черная сплошная линия) [1].

Таблица 3. Структурные параметры частично гидратированных мембран CER6/Chol/FFA_6/ChS с соотношением компонент 55/20/15/10 при 20°C и 66/10/18/6 при 32°C в сравнении с параметрами мембраны CER6/Chol/PA/ChS = 55/25/15/5 (SC_PA) при 32°C

мембрана	$d, \text{Å}$	толщина гидрофильной области, Å	толщина гидрофобной области, Å
55/20/15/10	$45,67 \pm 0,02$	$7,8 \pm 0,2$	$30 \pm 0,2$
66/10/18/6	$45,6 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2$	$29,4 \pm 0,2$
SC_PA [1]	$45,63 \pm 0,04$	$7,2 \pm 0,2$	$31,2 \pm 0,1$

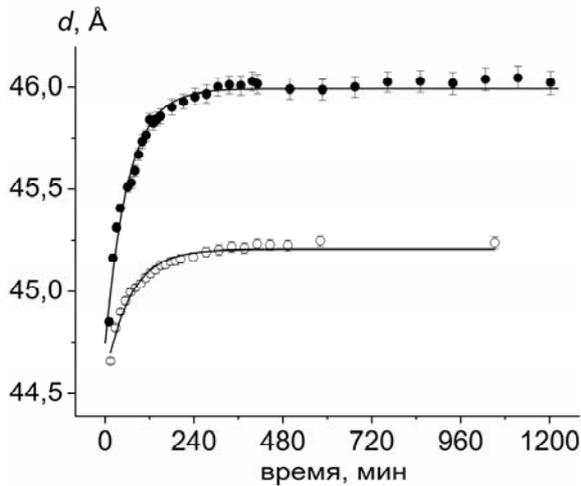


Рис. 11. Изменение во времени периода повторяемости мембран CER6/Chol/FFA_6/ChS = 55/20/15/10 (●) и 55/30/15/0 (○) при гидратации в избытке D₂O при 20°C. Кривые соответствуют описанию зависимостей $d(t)$ функцией (2).

($\tau \approx 64$ мин). Замена в составе системы CER6/Chol/FFA_6/ChS сульфата холестерина на холестерин приводит к уменьшению набухания мембраны в два раза при неизменной скорости гидратации и расслоению полностью гидратированного образца на две фазы с периодичностями 45,8 и 44,1 Å, что наряду с результатами других исследователей [10, 11] демонстрирует важную роль сульфата холестерина в стабильности липидной матрицы *stratum corneum*.

Таблица 4. Параметры процесса гидратации мембран CER6/Chol/FFA_6/ChS (SC_FFA_6) в избытке воды и мембраны CER6/Chol/LFFA/ChS (SC_LFFA) парами воды. d_{fh} – значение периода повторяемости мембраны в полностью гидратированном состоянии

мембрана	T, °C	Δd , Å	d_{fh} , Å	τ , мин	τ_{F1} , мин
SC_FFA_6 (55/20/15/10)	20	$1,24 \pm 0,02$	$45,99 \pm 0,05$	61 ± 2	23 ± 1 245 ± 6
SC_FFA_6 (55/30/15/0)	20	$0,63 \pm 0,02$	$45,79 \pm 0,07$ $44,11 \pm 0,03$	64 ± 4	–
SC_LFFA (55/20/15/10)	25	$1,04 \pm 0,14$	$46,39 \pm 0,10$	38 ± 2 879 ± 102	27 ± 2 132 ± 12
	57	$1,60 \pm 0,14$	$45,58 \pm 0,10 \rightarrow$ $45,1 \pm 0,1, 54,2 \pm 0,5$	–	$3,3 \pm 0,3$ 231 ± 4

Гидратация в избытке воды.

Характерное время τ процесса гидратации мембраны SC на основе пальмитиновой кислоты в избытке воды (рис. 11) составляло ~ 90 мин, что намного больше по сравнению с фосфолипидными мембранами (\sim минуты) [1]. Ответственной за столь низкую скорость диффузии воды в мембране являлась полностью вытянутая конфигурация молекул церамида-6. При одинаково низком уровне набухания мембран, содержащих только пальмитиновую кислоту и смесь жирных кислот ($\Delta d \approx 1,2$ Å), композиция жирных кислот ускоряет процесс гидратации

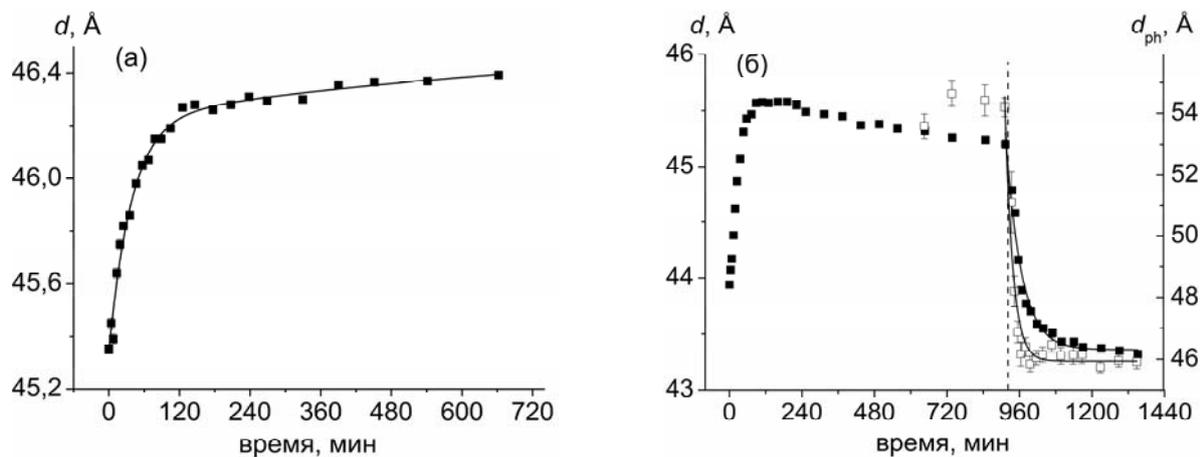


Рис. 12. Изменение во времени (а) периода повторяемости мембраны CER6/Chol/LFFA/ChS в процессе гидратации при 25°C и (б) периода повторяемости основной фазы d (■), второй фазы d_{ph} (□) в процессах гидратации и дегидратации при 57°C. Кривые соответствуют описанию зависимостей $d(t)$ и $d_{ph}(t)$ функцией (3). Вертикальной линией отмечено время начала процесса дегидратации.

Гидратация мембраны CER6/Chol/LFFA/ChS (55/20/15/10) парами воды при 25°C также характеризуется очень малым изменением периода мембраны $\Delta d = 1,0 \text{ \AA}$ (рис. 12), сравнимым с величиной набухания мембран SC в избытке воды. Кинетика изменения периода повторяемости и структурных факторов в процессе гидратации описывается двумя экспоненциальными зависимостями с характерными временами, лежащими в диапазоне от нескольких десятков минут до нескольких сотен минут (табл. 4). Для гидратации при 57°C характерна значительно более быстрая начальная стадия процесса с характерным временем на уровне нескольких мин. Из рис. 12 видно, что мембрана набухает на 1,6 Å до значения 45,6 Å, после чего происходит расслоение образца на две структурные фазы. Уменьшение периода повторяемости основной фазы (в целом на 0,4 Å) с начала расслоения образца вероятно связано с перераспределением захваченной при гидратации воды между двумя фазами – “перекачкой” воды из межмембранного пространства доменов основной фазы в более гидратируемую вторую фазу с периодом повторяемости 54,2 Å, образованную преимущественно длинноцепочечными жирными кислотами. Дегидратация образца сопровождается уменьшением периода повторяемости второй фазы на $\Delta d_{ph} = 8,3 \pm 0,4 \text{ \AA}$, что намного больше изменения периода повторяемости основной фазы $\Delta d = 1,9 \pm 0,1 \text{ \AA}$. Изменение обеих зависимостей $d(t)$ и $d_{ph}(t)$ в ходе дегидратации описывается уравнением (2) с характерным временем соответственно $\tau = 52 \pm 5$ мин и $\tau_{ph} = 26 \pm 3$ мин. После завершения процесса дегидратации мембрана находится в квазиоднородном состоянии (присутствуют структурные фазы с

периодами повторяемости $d = 43,3 \pm 0,1 \text{ \AA}$ и $d_{ph} = 45,9 \pm 0,2 \text{ \AA}$), отличном от исходного состояния ($d = 43,94 \text{ \AA}$) до начала процесса высокотемпературной гидратации. Охлаждение образца при низкой относительной влажности 58% не возвращает систему в исходное состояние.

Температурная зависимость структуры мембран SC. При нагревании мембраны CER6/Chol/FFA_6/ChS период повторяемости системы с соотношением компонент 55/20/15/10 постепенно уменьшается с $45,55 \pm 0,25 \text{ \AA}$ при $\approx 20^\circ\text{C}$ до $42,39 \pm 0,04 \text{ \AA}$ при 80°C и для системы 66/10/18/6 с $45,9 \pm 0,4 \text{ \AA}$ при $\approx 20^\circ\text{C}$ до $43,2 \pm 0,2 \text{ \AA}$ при 72°C . В температурных зависимостях структурных факторов наблюдается минимум при 56°C и 67°C соответственно для систем 55/20/15/10 и 66/10/18/6 (рис. 13). При этих температурах мембрана находится в расслоенном состоянии с периодичностями структурных фаз $46,7 \pm 0,1$ и $42,7 \pm 0,1 \text{ \AA}$ (система 55/20/15/10) и $46,4 \pm 0,3$ и $42,9 \pm 0,3 \text{ \AA}$ (система 66/10/18/6). Расслоение образца при повышении температуры может быть следствием “плавления” углеводородных цепочек лишь части липидов. Следует отметить, что охлаждение, мембраны находящейся в расслоенном состоянии, до 20°C при низкой влажности не возвращает систему в исходное однофазное состояние. В однофазное состояние образец переходит только при повышении относительной влажности до 98%, когда подвижность молекул увеличивается и возрастает перемешиваемость липидов. При 67°C структурные факторы мембраны CER6/Chol/FFA_6/ChS = 55/20/15/10 резко возрастают, тогда как для системы 66/10/18/6 при 72°C наблюдается лишь незначительное увеличение их величин. Подобное поведение структурных факторов системы с композицией 55/20/15/10 наблюдается при 63°C , в точке температурного сканирования непосредственно перед фазовым переходом. Отличия в фурье-профилях мембран при этих температурах (рис. 14) и температурные зависимости структурных факторов указывают на то, что система 55/20/15/10 при 67°C претерпела структурный переход. В системе с композицией 66/10/18/6 фазовый переход не наблюдается вплоть до температуры 72°C .

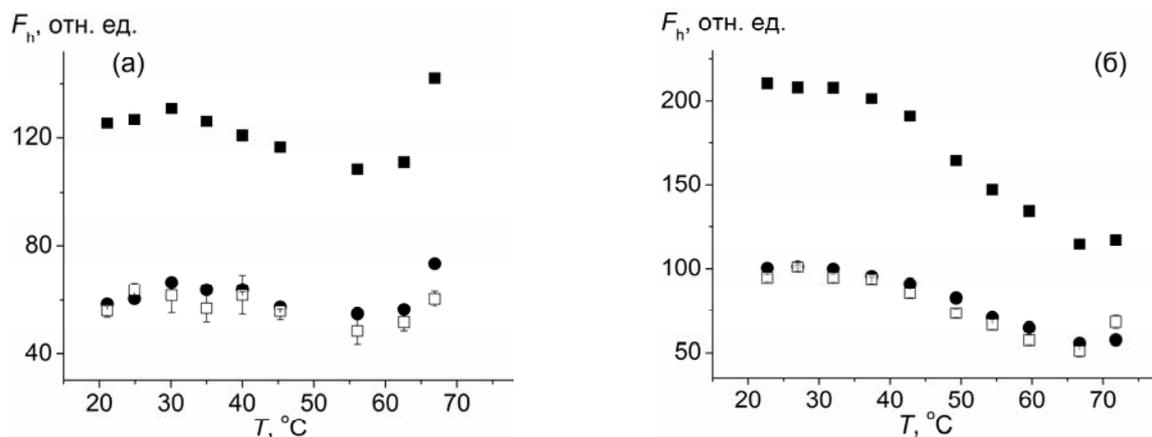


Рис. 13. Температурные зависимости структурных факторов F_1 (■), F_2 (●), F_3 (□) мембраны с соотношением компонент (а) 55/20/15/10 и (б) 66/10/18/6, при 50-58% RH.

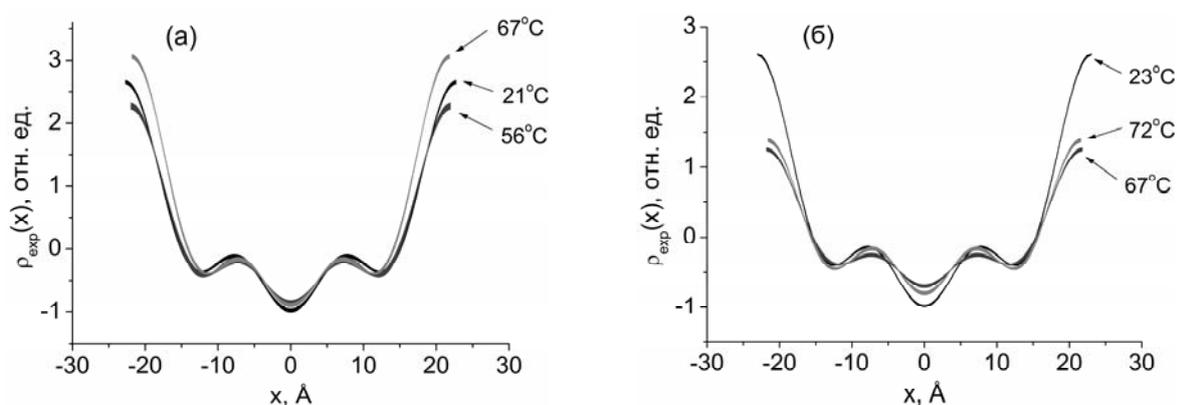


Рис. 14. Распределения рассеивающей плотности $\rho_{\text{exp}}(x) \pm \Delta\rho_{\text{exp}}(x)$ мембраны CER6/Ch/FFA_6/ChS (а) – с соотношением компонент 55/20/15/10 при 21°C, 56°C, 67°C и (б) – с соотношением компонент 66/10/18/6 при 23°C, 67°C, 72°C.

В заключении сформулированы основные результаты работы.

Основные результаты:

1. Впервые методом дифракции нейтронов в реальном времени была прослежена эволюция внутренней структуры ориентированных модельных липидных мембран в процессах гидратации и дегидратации.
2. Определено влияние церамида-6 на структурные параметры и гидратацию мембраны дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Установлено, что церамид-6 сужает водную прослойку, уменьшает проникновение воды в

липидный бислой и увеличивает толщину гидрофобной области бислоя частично гидратированной фосфолипидной мембраны; церамид-6 замедляет процесс набухания фосфолипидной мембраны в избытке воды.

3. Определена наноструктура модельной многокомпонентной липидной мембраны на основе церамида-6 со смесью шести свободных жирных кислот.

Установлено, что:

а) многослойные мембраны на основе церамида-6 со смесью шести свободных жирных кислот имеют структуру, схожую со структурой четырехкомпонентной мембраны на основе церамида-6 с пальмитиновой кислотой;

б) вариация процентного содержания главных компонент мембраны в диапазоне температур 20 – 32°C существенно не изменяет ее структурные параметры;

в) мембрана с 55 масс. % церамида-6 испытывает структурный фазовый переход в диапазоне температур 63 – 67°C. Увеличение содержания церамида-6 в составе мембраны сдвигает фазовый переход в сторону больших значений температуры.

4. Определено влияние свободных жирных кислот на процесс гидратации модельных многокомпонентных липидных мембран на основе церамида-6 в избытке воды. Смесью шести жирных кислот, композиция жирных кислот ускоряет гидратацию мембраны, сокращая характерное время процесса с 94 минут (для мембраны с одной пальмитиновой кислотой) до 61 минуты.

5. Определены характерные времена гидратации парами воды модельной многокомпонентной липидной мембраны на основе церамида-6 с тремя жирными кислотами. При 25°C процесс гидратации состоит из более быстрой начальной и последующей медленной стадии с характерными временами, лежащими в диапазоне от нескольких десятков минут до нескольких сотен минут; гидратация мембраны при 57°C характеризуется более быстрой начальной стадией с характерным временем на уровне нескольких минут и необратимым при низкой влажности расслоением системы на несколько структурных фаз.

6. Полученные результаты демонстрируют эффективность методики нейтронной дифракции в реальном времени на импульсном источнике нейтронов для изучения структурных изменений липидных систем в кинетических и переходных процессах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНО В
СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:

A1. М.А. Киселев, Н.Ю. Рябова, А.М. Балагуров, Д. Отто, С. Данте, Т. Хаусс, С. Вартевиц, Р. Нойберт. Влияние церамида 6 на структуру и гидратацию мембраны дипальмитоилфосфатидилхолина. // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2006. №. 6. С. 30-37.

A2. Н.Ю. Рябова, М.А. Киселёв, А.М. Балагуров. Переходные процессы в модельных липидных мембранах *Stratum corneum* со смесью жирных кислот. // Биофизика. 2009. Т. 54. № 5. С. 852-862.

A3. Н.Ю. Рябова, М.А. Киселев, А.И. Бескровный, А.М. Балагуров. Исследование структуры многослойных липидных мембран методом дифракции нейтронов в реальном времени. // Физика твердого тела. 2010. Т. 52. № 5. С. 984-991.

A4. Н.Ю. Рябова, М.А. Киселёв, А.М. Балагуров. Влияние холестерина и церамида-VI на структуру многослойных липидных мембран при водном обмене. // Кристаллография. 2010. Т. 55. № 3. С. 516-525.

A5. N.Y. Ryabova, M.A. Kiselev, S. Dante, T. Hauss, A.M. Balagurov. 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.

Список цитируемой литературы

1. Kiselev M.A., Ryabova N.Y., Balagurov A.M., Dante S., Hauss T., Zbytovská J., Wartewig S., Neubert R.H. New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. // European Biophysics J. 2005. V. 34. P. 1030-1040.

2. 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.

3. Балагуров А.М., Миронова Г.М. Нейтронографические исследования в реальном масштабе времени. // Кристаллография. 1991. Т. 36, С. 314–325.

4. Балагуров А.М., Горделий В.И. Краткие сообщения ОИЯИ. Дубна, 1984. С. 23.

5. Ipsen J.H., Karlstrom G., Mouritsen O.G., Wennerstrom H., Zuckermann M.J. Phase equilibria in the phosphatidyl-choline-cholesterol system. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 905. P. 162–172.
6. Doreen Kessner. Neutron scattering on biological subjects – Neue Einblicke in die Struktur der Lipidmatrix des *Stratum corneum*, basierend auf Modellmembranen: Dissertation. 2008. Halle (Saale).
7. Bouwstra J.A., Gooris G.S., Dubbelaar F.E.R., Weerheim A.M., Ijzerman A.P., Ponc M. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. // J. Lipid Res. 1998. V. 39. P. 186–196.
8. Киселев М.А. Конформация молекул церамида 6 и chain-flip переходы в липидной матрице верхнего слоя кожи – Stratum Corneum. // Кристаллография. 2007. Т. 52. № 3. С. 549–553.
9. Ruettinger A., Kiselev M.A., Hauss Th., Dante S., Balagurov A. M., Neubert R.H.H. Fatty acid interdigitation in stratum corneum model membranes: a neutron diffraction study. // Eur. Biophysics J. 2008. V. 37. P. 759–771.
10. Elias P.M., Williams M.L., Maloney M.E., Bonifas J.A., Brown B.E., Grayson S., Epstein E.H. Stratum corneum lipids in disorders of cornification. Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. // J. Clin. Invest. 1984. V. 74. P. 1414–1421.
11. Bouwstra J.A., Gooris G.S., Dubbelaar F.E.R., Ponc M. Cholesterol sulfate and calcium affect stratum corneum lipid organization over a wide temperature range. // J. Lipid Res. 1999. V. 40. P. 2303–2312.