

P3-2016-39

М. А. Киселев, Е. В. Земляная

ДЕГИДРАТАЦИЯ МЕЖМЕМБРАННОГО
ПРОСТРАНСТВА МНОГОСЛОЙНЫХ МЕМБРАН
ДИПАЛЬМИТОИЛФОСФАТИДИЛХОЛИНА
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА.
НЕЙТРОННЫЕ И СИНХРОТРОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Направлено в журнал «Кристаллография»

Киселев М. А., Земляная Е. В.

P3-2016-39

Дегидратация межмембранного пространства многослойных мембран дипальмитойлфосфатидилхолина под действием диметилсульфоксида. Нейтронные и синхротронные исследования

На основе метода разделенных формфакторов проведен анализ спектров малоуглового рассеяния нейтронов на полидисперсной популяции однослойных везикул дипальмитойлфосфатидилхолина (ДПФХ) в тяжелой воде с добавлением диметилсульфоксида (ДМСО). Показано, что рост мольной доли ДМСО в воде от 0 до 15 % приводит к увеличению толщины бислоя до характерных значений периода повторяемости многослойных мембран ДПФХ, что свидетельствует о дегидратации межмембранного пространства и стерическом контакте соседних бислоев ДПФХ при мольной доле ДМСО 15 %.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка и Лаборатории информационных технологий ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2016

Kiselev M. A., Zemlyanaya E. V.

P3-2016-39

Dehydration of the Intermembrane Space in the Multilamellar Membranes of Dipalmitoylphosphatidylcholine under the Influence of Dimethyl Sulfoxide. Neutron and Synchrotron Study

On the basis of the separated form factors method (SFF), the analysis of data on the small-angle neutron scattering (SANS) on polydispersed population of unilamellar vesicles of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) in heavy water with dimethyl sulfoxide (DMSO) is carried out. It is shown that the growth of DMSO molar fraction in water from 0 to 15% leads to increase of thickness of the bilayer to values of the repeat distance of multilamellar membranes of DPPC, which means a dehydration of the intermembrane space and steric contact of the neighbor bilayers of DPPC at a DMSO molar fraction of 15%.

The investigation has been performed at the Frank Laboratory of Neutron Physics and the Laboratory of Information Technologies, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2016

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивный интерес к исследованию структуры и свойств фосфолипидных мембран в виде многослойных (рис. 1) и однослойных (рис. 2) везикул в избытке воды обусловлен необходимостью понимания фундаментальных принципов организации и функционирования биологических и искусственных липидных мембран, а также перспективой практического применения этих знаний в биохимии и фармакологии.

Малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН) с длинами волн от 1 до 10 Å является базовым экспериментальным методом исследования однослойных везикулярных систем в большом избытке воды. Рентгеновская дифракция на синхротронных источниках широко применяется для исследования структуры многослойных везикул в избытке воды. Широкомасштабные исследования везикулярных систем различного химического состава ведутся в настоящее время рядом российских и зарубежных групп [1, 2].

В [3, 4] разработан метод разделенных формфакторов (РФФ), представляющий собой эффективный инструмент анализа спектров МУРН для получения информации о структуре и свойствах однослойных везикулярных систем

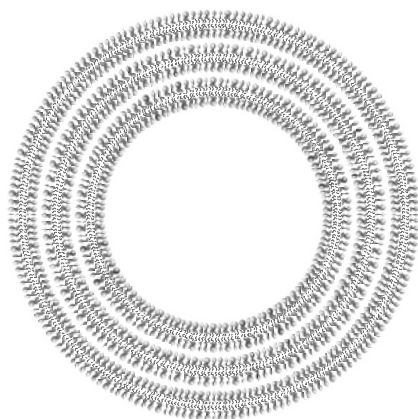


Рис. 1. Многослойная липидная везикула в избытке воды

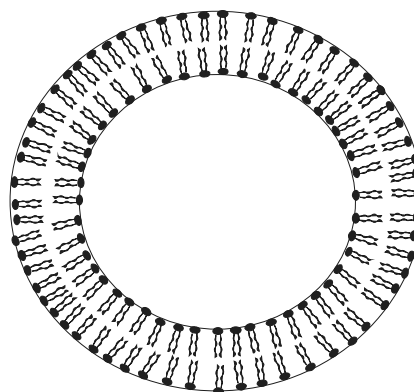


Рис. 2. Однослойная липидная везикула в избытке воды

в большом избытке воды. Метод РФФ успешно применен для анализа структуры однослойных везикул димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) в различных фазовых состояниях липидного бислоя [4], в различных концентрациях водного раствора сахарозы [5], а также для исследования многокомпонентных везикулярных систем на основе церамида-6, моделирующих верхний слой кожи млекопитающих (*Stratum Corneum*) [6–8]. В работе [5] метод РФФ адаптирован для анализа данных малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР).

В настоящей работе методом МУРН проведено исследование структуры однослойных везикул дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) в тяжелой воде (D_2O) в присутствии дейтерированного диметилсульфоксида (ДМСО).

Водный раствор ДМСО (10–50%) широко используется в медицине как местное противовоспалительное и обезболивающее средство. Для увеличения трансдермального переноса лекарственных веществ ДМСО включают в состав мазей. Время проникновения ДМСО через кожу составляет несколько секунд. Актуальным является также применение ДМСО в качестве криопротектора. ДМСО добавляется в клеточную среду для предотвращения повреждения клеток при их заморозке. Примерно 10%-й водный раствор ДМСО может быть использован для безопасного охлаждения клеток, а также для хранения их при температуре жидкого азота.

В работе [9] было показано, что с ростом концентрации ДМСО происходит уменьшение количества свободной воды в межмембранном пространстве многослойных везикул ДПФХ (рис. 3). Одним из открытых вопросов этой работы являлось влияние ДМСО на толщину липидного бислоя ДПФХ d_b . Расчеты толщины липидного бислоя ДПФХ в экспериментах методом МУРН в [9] делались на основе приближения Гинье. В [4] было показано, что приближение Гинье дает заниженное значение толщины липидного бислоя в малоугловом эксперименте.

Данная работа посвящена более детальному исследованию явления дегидратации межмембранного пространства ДПФХ под действием ДМСО на основе применения метода РФФ для анализа спектров МУРН.

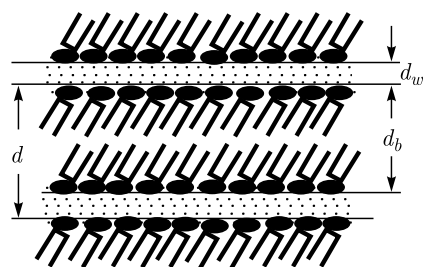


Рис. 3. Схематичное представление гелевой фазы многослойной мембраны ДПФХ. Многослойная структура состоит из бислоя молекул ДПФХ с толщиной мембраны d_b и прослойки растворителя (воды) толщиной d_w . Период повторяемости мембраны ДПФХ $d = d_b + d_w$. В гелевой фазе углеводородные хвосты наклонены под углом 28° к поверхности мембраны

В представленной работе проведен совместный анализ результатов нейтронного малоуглового эксперимента на однослойных везикулах ДПФХ и дифракционного синхротронного эксперимента на многослойных везикулах ДПФХ в водных растворах ДМСО.

ЭКСПЕРИМЕНТ, ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Измерения спектров МУРН от однослойных везикул ДПФХ проводились на малоугловом спектрометре ЮМО импульсного реактора ИБР-2 (ЛНФ ОИЯИ, Дубна) при двух положениях детектора, соответствующих расстоянию образец–детектор: 13,17 и 4,38 м. Спектры измерялись при температуре образца 20 °С, что соответствует гелевой фазе ДПФХ.

Многослойные везикулы ДПФХ приготавливались путем растворения 1 масс. % ДПФХ в водном (D₂O) растворе дейтерированного ДМСО. Мольная доля ДМСО в смеси ДМСО и D₂O составляла 0, 5, 10, 15 %. Однослойные везикулы ДПФХ изготавливались путем многократной экструзии раствора многослойных везикул через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 500 Å на приборе «LiposoFast Basic extruder» компании «Avestin» (Оттава, Канада) [10].

МОДЕЛЬ РАЗДЕЛЕННЫХ ФОРМФАКТОРОВ

Как уже сказано выше, для анализа структуры везикулярной системы использовался метод РФФ, разработанный для анализа данных МУРН на однослойных везикулах [3, 4]. По сравнению с другими известными подходами (например, оболочечная модель [11], приближение Гинье [12]), метод РФФ позволяет использовать любую подходящую функцию для описания распределения плотности $\rho(x)$ длины рассеяния нейтрона в направлении нормали к мембране, что расширяет возможности моделирования структуры бислоя.

Подробное изложение метода РФФ дано в работах [3–5]. Этот подход основан на факторизации выражения для амплитуды рассеяния, в результате чего макроскопическое сечение монодисперсной популяции везикул принимает вид

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

где F_s и F_b — соответственно формфактор бесконечно тонкой сферической оболочки радиуса R и формфактор липидного бислоя:

$$F_s(q, R) = \left(4\pi \frac{R^2}{qR} \sin(qR) \right)^2, \quad F_b(q, \rho) = \left(\int_{-d_b/2}^{d_b/2} \Delta\rho(x) \cos(qx) dx \right)^2. \quad (2)$$

Здесь n — число везикул на единицу объема, d_b — толщина липидного бислоя, $\Delta\rho(x) = \rho(x) - \rho_{D_2O}$ — разность плотности длины рассеяния нейтрона липидным бислоем $\rho(x)$ и тяжелой водой ρ_{D_2O} (контраст) и $S(q, R)$ — структурный фактор в форме Дебая [13]:

$$S(q, R) = 1 - \frac{8V_\nu}{\nu} \left(\frac{\sin(2qR)}{2qR} \right), \quad (3)$$

где V_ν — объем везикулы, $\nu = 1/n$.

С учетом полидисперсности везикулярной системы, описываемой распределением Шульца

$$G(R, \langle R \rangle) = \frac{R^m}{m!} \left(\frac{m+1}{\langle R \rangle} \right)^{m+1} \exp \left[-\frac{(m+1)R}{\langle R \rangle} \right], \quad (4)$$

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

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = n \cdot \frac{\int_{R_{\min}}^{R_{\max}} \frac{d\Sigma}{d\Omega}_{\text{mon}}(q, R, \langle R \rangle) G(R, \langle R \rangle) dR}{\int_{R_{\min}}^{R_{\max}} G(R, \langle R \rangle) dR}, \quad (5)$$

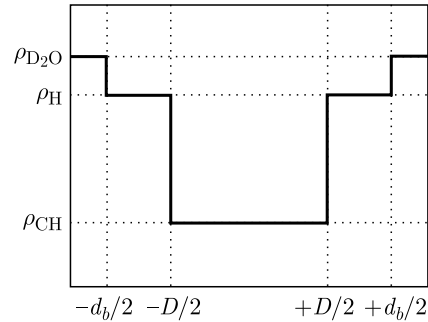
где пределы интегрирования R_{\min} и R_{\max} соответственно полагались равными 100 и 1000 Å. С учетом некогерентного фона I_B и разрешения спектрометра [14] макроскопическое сечение окончательно принимает вид

$$I(q) = \frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) + \frac{1}{2} \Delta^2 \frac{d^2}{dq^2} \left[\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) \right] + I_B. \quad (6)$$

Здесь Δ — второй момент функции разрешения спектрометра, рассчитанный согласно [15].

В проведенных расчетах функция плотности длины рассеяния нейтрона липидным бислоем $\rho(x)$ аппроксимировалась на основе модели, представленной на рис. 4 (ступенчатая модель), учитывающей различие в плотности длины рассеяния нейтрона в гидрофильной области ρ_H и области углеводородных цепочек бислоя ρ_{CH} . Как показано в [4], ступенчатая аппроксимация формы $\rho(x)$ является подходящим приближением для анализа везикулярных систем в гелевой фазе, позволяя при этом получить явное выражение форм-фактора F_b в формуле (2), что упрощает расчеты. В нашем конкретном

Рис. 4. Ступенчатая аппроксимация распределения плотности длины рассеяния нейтрона поперек липидного бислоя: ρ_{D_2O} — плотность длины рассеяния нейтрона в тяжелой воде; ρ_H — плотность длины рассеяния нейтрона в гидрофильной области; ρ_{CH} — плотность длины рассеяния нейтрона в области углеводородных хвостов; d_b — толщина липидного бислоя; D — толщина гидрофобной области липидного бислоя



случае мы разбиваем липидный бислой на две части: гидрофильную область, которая включает в себя область полярных голов, и гидрофобную область, которая состоит из негидратированных углеводородных цепочек. Толщина гидрофобной области D в расчетах фиксировалась и составляла 20 \AA . Результаты расчетов представлены в табл. 1.

Параметрами фитирования являются: средний радиус везикулы $\langle R \rangle$, коэффициент полидисперсности m , число везикул на единицу объема n , величина некогерентного фона I_B , а также параметры, определяющие структуру бислоя — толщина бислоя d_b , плотность длины рассеяния нейтронов в гидрофильной области полярных голов ρ_H . Плотность длины рассеяния углеводородных цепочек фиксировалась $\rho_{CH} = -0,36 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$. Плотность длины рассеяния нейтронов в водных растворах ДМСО $\rho_{D_2O} = 6,37 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$.

Таблица 1. Параметры популяции везикул ДПФХ (1 масс. %) в водных растворах ДМСО концентрации 0–15 %

Мольная доля ДМСО, %	$\langle R \rangle, \text{ \AA}$	m	$\sigma, \%$	$d_b, \text{ \AA}$	χ^2	$\rho_H, 10^{10} \text{ см}^{-2}$
0	280 ± 2	$17,5 \pm 1,3$	23,3	$52,7 \pm 0,4$	3,7	$2,8 \pm 0,5$
5	257 ± 2	$17,7 \pm 1,1$	23,2	$55,9 \pm 0,5$	3,6	$3,2 \pm 0,5$
10	257 ± 2	$18,0 \pm 1,0$	22,9	$56,9 \pm 0,6$	3,8	$3,1 \pm 0,5$
15	262 ± 2	$20,3 \pm 1,2$	21,7	$57,2 \pm 0,5$	5,5	$3,1 \pm 0,5$

Примечание. $\langle R \rangle$ — средний радиус везикулы; m — параметр полидисперсности в распределении Шульца (4); σ — полидисперсность популяции везикул; d_b — толщина липидного бислоя; χ^2 — мера отклонения расчетной кривой от экспериментальной; ρ_H — плотность длины рассеяния нейтрона в гидрофильной области липидного бислоя; $D = 20 \text{ \AA}$ — фиксированный параметр.

Среднеквадратичное отклонение радиуса везикул (полидисперсность) от среднего радиуса $\langle R \rangle$ рассчитывалось по формуле $\sigma = \sqrt{\frac{1}{(m+1)}}$.

Расчеты проводились с использованием программы DFUMIL из библиотеки JINRLIB (<http://www.jinr.ru/programs/jinrlib>), реализующей обобщенный метод наименьших квадратов. Значения χ^2 , приведенные в табл. 1, рассчитывались по формуле

$$\chi^2 = \frac{1}{N-k} \sum_{i=1}^N \left(\frac{\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q_i) - \frac{d\Sigma}{d\Omega}_{\text{exp}}(q_i)}{\delta(q_i)} \right)^2, \quad (7)$$

где $\delta(q_i)$ — ошибки экспериментальных данных, N — число экспериментальных точек, k — количество фитируемых параметров.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты подгонки расчетных спектров МУРН к экспериментальным кривым на основе РФФ-метода представлены на рис. 5. Соответствующие значения параметров указаны в табл. 1. Видно, что РФФ-модель обеспечивает неплохое согласие с экспериментальными данными.

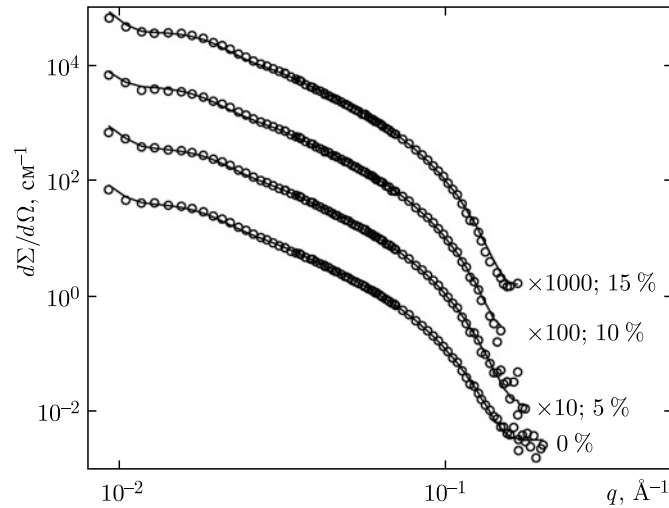


Рис. 5. Результаты фитирования в рамках РФФ-модели спектров МУРН, измеренных на установке ЮМО для полидисперсной популяции однослойных везикул ДПФХ в растворе ДМСО в D_2O с концентрацией 0–15 %. Параметры подгонки даны в табл. 1

При минимальной концентрации ДМСО в воде (5 % ДМСО) радиус везикул составляет 257 Å, что на 23 Å меньше, чем радиус везикул ДПФХ в D₂O (280 Å). При дальнейшем увеличении концентрации ДМСО радиус везикул увеличивается и составляет 262 Å при мольной фракции ДМСО 15 %, что на 18 Å меньше радиуса везикул в D₂O (280 Å). Полидисперсность размера везикул практически не меняется под влиянием ДМСО. Плотность длины рассеяния нейтрона в гидрофильной области ρ_H не меняется под влиянием ДМСО в пределах ошибок вычислений. Плотности длины рассеяния нейтрона для тяжелой воды и для дейтерированного ДМСО близки. Поэтому замещение молекул тяжелой воды в области полярных голов молекулами ДМСО не должно приводить к изменению ρ_H .

Толщина мембраны d_b при увеличении концентрации ДМСО увеличивается с $(52,7 \pm 0,4)$ Å при нулевой концентрации ДМСО до $(57,2 \pm 0,5)$ Å при мольной доле ДМСО 15 %. Зафиксированное увеличение толщины мембраны на $(4,5 \pm 0,8)$ Å под влиянием ДМСО является главным результатом, который позволяет сделать более точные количественные выводы явления дегидратации межмембранного пространства под влиянием ДМСО.

В табл. 2 приведены результаты влияния ДМСО на период повторяемости многослойных везикул ДПФХ в избытке воды. Эти данные были получены ранее на синхротронном источнике методом дифракции рентгеновского синхротронного излучения [9].

Полученные нами более точные по сравнению с [9] значения толщины липидного бислоя ДПФХ в водных растворах ДМСО позволяют рассчитать более точные значения толщины межмембранного пространства (водной прослойки) $d_w = d - d_b$. Значения d_w представлены в табл. 2 для концентраций ДМСО 0, 5, 10, 15 %.

В чистой воде толщина межмембранного пространства $d_w = d - d_b = (11,3 \pm 1,2)$ Å. При увеличении концентрации ДМСО значения d_w уменьшаются. В [9] на основе приближения Гинье для расчета толщины липидного бислоя было получено $d_w = (7,8 \pm 1,8)$ Å для мольной доли ДМСО 10 %. Расчет толщины липидного бислоя на основе модели ступенчатой функции (рис. 4) дает $d_w = (1,8 \pm 1,4)$ Å при мольной доле ДМСО 10 % и $d_w = (0,9 \pm 1,3)$ Å при мольной доле ДМСО 15 %. Таким образом, при мольной доле ДМСО 15 % исчезает межмембранное пространство и происходит стерический контакт

Таблица 2. Зависимость периода повторяемости мембраны ДПФХ d [9] и толщины водной прослойки d_w от мольной доли ДМСО в воде

Параметр	Мольная доля ДМСО, %			
	0	5	10	15
d , Å	$64 \pm 0,8$	$60 \pm 0,8$	$58,7 \pm 0,8$	$58,1 \pm 0,8$
d_w , Å	$11,3 \pm 1,2$	$4,1 \pm 1,3$	$1,8 \pm 1,4$	$0,9 \pm 1,3$

соседних бислоев. Это согласуется с результатами дифференциальной сканирующей калориметрии [9], которые демонстрируют ДМСО-индуцированную дегидратацию межмембранного пространства. Количество молекул свободной воды, приходящееся на одну молекулу ДПФХ, уменьшается с 4 в чистой воде до $1,1 \pm 0,4$ при мольной доле ДМСО 15 % [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе совокупного анализа данных малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновской дифракции показано, что при увеличении концентрации ДМСО в тройной системе ДПФХ/вода/ДМСО происходит уменьшение межмембранного пространства многослойных везикул ДПФХ от $(11,3 \pm 1,2)$ Å при нулевой концентрации ДМСО до $(0,9 \pm 1,3)$ Å при мольной доле ДМСО 15 %. В случае мольной доли ДМСО 15 % соседние бислои находятся в состоянии стерического контакта, что согласуется с явлением ДМСО-индуцированной дегидратации межмембранного пространства [9].

Авторы выражают благодарность О. С. Васильевой за помощь в проведении расчетов на начальном этапе исследования. Исследование выполнено при поддержке РФФИ (гранты № 14-04-91333 и 14-02-00688).

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев М. // ЭЧАЯ. 2011. Т. 42, вып. 2. С. 579–635.
2. Nagle J. F., Tristram-Nagle S. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1469. P. 159.
3. Kiselev M. A. et al. // J. Appl. Phys. A. 2002. V. 74. P. S1654.
4. Kiselev M. A. et al. // Eur. Biophys. J. 2006. V. 35, No. 6. P. 477.
5. Киселев М. А. и др. // Кристаллография. 2015. Т. 60, № 1. С. 140.
6. Zemlyanaya E. V. et al. // Crystallogr. Rep. 2006. V. 51, suppl. 1. P. S22.
7. Земляная Е. В. и др. // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные, нейтронные исследования. 2008. № 11. С. 14.
8. Kiselev M. A. et al. // Appl. Phys. A. 2014. V. 116. P. 319.
9. Pedersen J. S., Posselt D., Mortensen K. // J. Appl. Cryst. 1990. V. 23. P. 321.
10. MacDonald R. C. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1061. P. 297.
11. Schmiedel H. et al. // J. Phys. Chem. B. 2001. V. 105. P. 111.
12. Свергун Д. И., Фейгин Л. А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986. 276 с.
13. Киселев М. А. и др. // Поверхность. 2003. № 11. С. 20.
14. Ostanovich Yu. M. // Macromol. Chem., Macromol. Symp. 1988. V. 15. P. 91.
15. Kiselev M. A. et al. // J. Alloys Compounds. 1999. V. 286. P. 195.

Получено 2 июня 2016 г.

Редактор *А. И. Петровская*

Подписано в печать 22.07.2016.

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

Усл. печ. л. 0,69. Уч.-изд. л. 0,85. Тираж 210 экз. Заказ № 58866.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/