



ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

14-2011-90

На правах рукописи  
УДК 538.91, 577.352.2

КИСЕЛЕВ

Михаил Алексеевич

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН —  
НЕЙТРОННЫЕ И СИНХРОТРОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Специальность: 01.04.07 — физика конденсированного  
состояния

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Дубна 2011

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

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, член-корр. РАН В.Ф. Гальченко  
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

доктор физико-математических наук, профессор В.А. Твердислов  
кафедра биофизики, физический факультет Московского государственного  
университета им. М.В. Ломоносова

доктор физико-математических наук, профессор А.В. Иродова  
отделение синхротронно-нейтронных исследований, РНЦ «Курчатовский институт»

Ведущая организация:

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

Защита состоится 2011 года в 17 часов на заседании диссертационного  
совета Д 720.001.06 при Лаборатории нейтронной физики и Лаборатории ядерных  
реакций Объединенного института ядерных исследований (141980, г. Дубна  
Московской области).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ОИЯИ

Автореферат разослан

2011 года

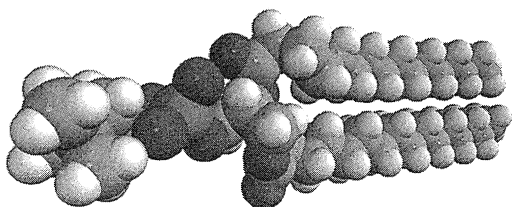
Ученый секретарь диссертационного совета



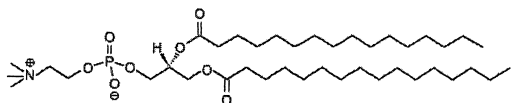
А.Г. Попеко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

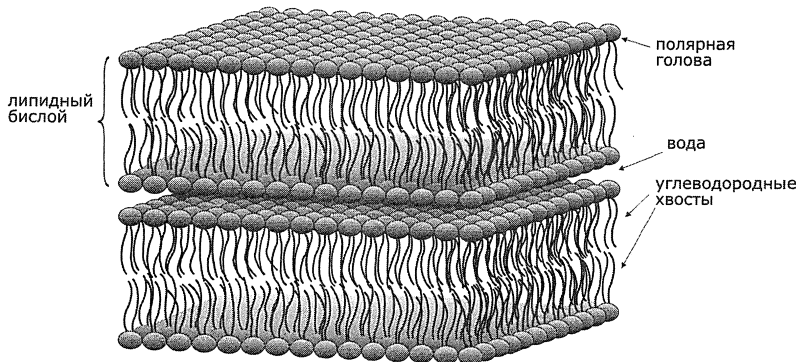
Исследования в области липидомики (науки о липидных мембранах) являются одним из направлений физики конденсированного состояния - soft matter. Диссертация посвящена модельным биологическим мембранам двух типов. Первый тип - фосфолипиды, широко используемые для изучения свойств плазматических (клеточных) мембран. На рис. 1 представлена молекула дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Второй тип - мембраны на основе керамидов, используемые для исследования структуры липидной матрицы верхнего слоя кожи млекопитающих.



**Рисунок 1.** Пространственная и химическая структура молекулы дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ).

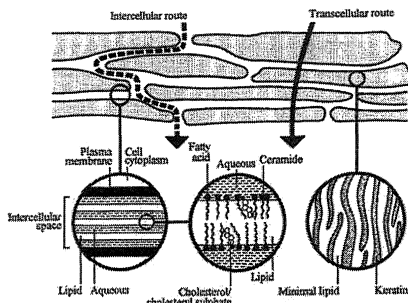
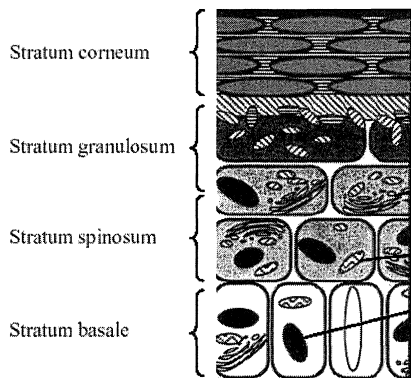


Молекулы ДПФХ при растворении в воде образуют многослойные везикулы, структура которых изображена на рис. 2.



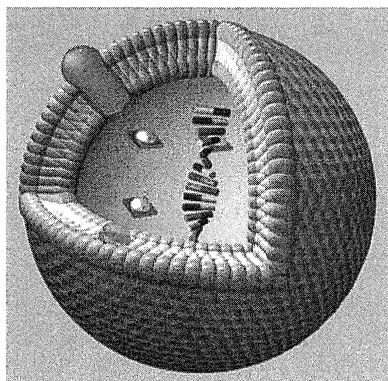
**Рисунок 2.** Многослойная структура липидных мембран в водных растворах.

На рис. 3 представлена структура эпидермиса, а на рис. 4 структура верхнего слоя кожи млекопитающих stratum corneum (SC), а также путь диффузии лекарств через липидную матрицу SC (межклеточный путь).



**Рисунок 3.** Структура эпидермиса и процесс кератинизации клеток с выделением из них липидной матрицы. **и Рисунок 4.** Направление межклеточной (пунктирная линия) и клеточной (сплошная линия) диффузии в SC. Внизу показана структура межклеточной липидной матрицы и структура корнеоцитов.

На сегодня общепризнано, что липидная матрица SC является основным диффузионным барьером для воды и малых молекул. Процесс переноса лекарств и воды через кожу человека определяется, прежде всего, структурой липидной матрицы и зависимостью этой структуры от физико-химического воздействия на кожу. Однослойные фосфолипидные везикулы размером от 500Å до 2000Å (рис. 5) используются для транспортировки лекарств через кожу.



**Рисунок 5.** Однослойная липидная везикула со встроенными молекулами лекарств. Молекулы водорастворимых лекарств находятся внутри везикулы, а молекулы водонерастворимых лекарств встроены в липидный бислой.

## Актуальность

Биологические мембраны играют ключевую роль как в структурной организации, так и в функционировании всех клеток – прокариотических и эукариотических, растительных и животных. Мембраны формируют внутриклеточные компартменты (отсеки), а плазматическая мембрана образует границу клетки. Структура биологических мембран по причине их многообразия, сложности и многокомпонентности остается до конца неопределенной. Мембранные липиды представляют огромное разнообразие. Причины этого разнообразия пока не ясны, но становится всё более очевидным, что это связано с разнообразием функций, которые липиды выполняют в мембранах. Фосфатидилхолин является основной компонентой мембран клеток животных. Исследования структуры и свойств фосфолипидов велись в прошлом и продолжаются в настоящее время методом дифракции нейтронов и рентгеновских лучей на многослойных ориентированных мембранах и многослойных везикулах (липосомах).

Актуальной задачей криобиологии является поиск криопротекторных растворов, позволяющих охлаждать, хранить и затем восстанавливать биологический объект с минимальными потерями. Одним из эффективных методов исследования структуры многослойных фосфолипидных везикул в избытке воды является одновременное применение малоугловой и широкоугловой дифракции рентгеновских лучей, позволяющей определять ламеллярную и латеральную структуру мембраны. Измерения на синхротронных источниках можно проводить в режиме реального времени, что позволяет исследовать процессы охлаждения мембран до низких (азотных) температур. Исследования важны для криобиологии, так как позволяют проследить изменения структуры мембраны в процессе охлаждения и последующего нагрева как в воде, так и в водных растворах криопротекторов.

Создание трансдермальных везикулярных переносчиков лекарств является одним из амбициозных проектов 21 века. Главным требованием к такому переносчику являются его высокие деформационные свойства. Определение изменения формы везикулы с размером от 500 Å до 1000 Å является нетривиальной задачей, также как и выбор силы, приводящей к деформации формы сферической везикулы. Малоугловое рассеяние нейтронов с применением сильных магнитных полей (выше 2Т) является перспективным методом диагностики везикулярных транспортных систем.

Проницаемость липидного бислоя для этанола является важной медицинской проблемой, которой уделялось и уделяется большое внимание в современных исследованиях проблем алкоголизма.

Плазматическая мембрана существует в однослойном состоянии. Наиболее адекватным объектом для исследования структуры плазматической мембраны является липидный бислой однослойных везикул. Малоугловое рассеяние нейтронов позволяет исследовать структуру однослойных везикул. Появление новых высокопоточных нейтронных и синхротронных источников и развитие детекторов дает возможность измерять спектры малоуглового рассеяния в широком диапазоне векторов рассеяния. Извлечение из таких спектров информации о внутренней структуре бислоя является сложной задачей. Весьма актуальной является разработка новых методов извлечения структурной информации из спектров малоуглового рассеяния однослойных везикул, измеренных на лучших мировых источниках.

Везикулярные переносчики лекарств всё шире применяются для адресной доставки лекарств в пораженные органы и увеличения терапевтического эффекта. Основой поверхности переносчика является липидный бислой. Создание метода анализа структуры везикулярных переносчиков лекарств до уровня структуры их бислоя является актуальной задачей бионанотехнологии.

Липидная матрица верхнего слоя кожи млекопитающих *stratum corneum* является главным барьером, поддерживающим водный баланс организма. Она определяет проницаемость лекарств через кожу. В отличие от плазматической мембраны, липидная матрица SC является многослойной мембраной. Многочисленные рентгеновские дифракционные эксперименты по определению внутренней структуры липидного бислоя SC ограничивались определением периода повторяемости как нативной липидной матрицы SC, так и модельных мембран SC. Актуальными задачами современных исследований SC являются: создание модельных мембран с компонентным составом липидов типичным для SC млекопитающих, поиск наиболее адекватных методов исследования их структуры, определение роли каждого церамида в структурной организации матрицы SC и её диффузионных свойств.

## **Постановка задачи**

Целью диссертации является исследование методами рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей структуры двух типов модельных биологических мембран (жидких кристаллов): фосфолипидов и модельных мембран верхнего слоя кожи млекопитающих.

Для тройной системы фосфолипид/ криопротектор / вода была поставлена задача - исследовать на примере двух криопротекторов (диметилсульфоксид и глицерин) процессы охлаждения многослойных везикул методами дифракции рентгеновского синхротронного излучения в реальном времени.

Для однослойных и многослойных везикул ДМФХ, а также для смешанных систем ДМФХ/детергент с ионным и неионным детергентом была поставлена задача - применить сильные магнитные поля для исследования их деформационных свойств на нейтронных источниках.

Для двойной системы ДПФХ/этанол была поставлена задача - определить влияние этанола на толщину липидного бислоя однослойных везикул.

Для однослойных фосфолипидных везикул была поставлена задача - разработать метод анализа малоугловых спектров, полностью и корректно использующей возможности современных малоугловых установок и, на его основе, получить достоверную и непротиворечивую информацию о структуре однослойных везикул ДМФХ.

В исследованиях модельных мембран, построенных на основе церамидов, была поставлена задача – определить наиболее эффективный метод исследования их структуры на нейтронных и синхротронных источниках и, на его основе, получить детальную информацию о структуре липидного бислоя.

Эксперименты проводились в различных нейтронных и синхротронных центрах России, Франции, Германии, Венгрии и Швейцарии. Для решения поставленных научных задач одновременно потребовалось развитие новых методов нейтронных и синхротронных исследований. Описание разработанных методов в нейтронных и синхротронных исследованиях является второй целью диссертации.

## Научная новизна

Многослойные везикулы фосфолипидов представляют достаточно хорошую модель для исследования криопротекторов, так как, находясь в избытке свободной воды, они содержат внутри себя как свободную, так и связанную воду.

Фазовая диаграмма двойной системы ДМСО /вода хорошо известна [1S]. Влияние ДМСО на свойства фосфолипидных мембран исследовалось методами дифракции рентгеновских лучей и калориметрии в нескольких работах [2S-5S]. В этих работах было установлено, что в области малых концентраций влияние ДМСО на структуру мембраны выражается в изменении толщины растворителя в межмембранном пространстве. Было высказано предположение, что уменьшение толщины растворителя может быть связано с дегидратацией межмембранного пространства. Несмотря на значительные усилия по исследованию тройной системы фосфолипид/ ДМСО/ вода оставались неясными четыре важных вопроса:

1. Как меняется структура и свойства мембраны под влиянием ДМСО? На чем основан механизм проникновения молекул ДМСО через мембрану?
2. В какой части мембраны локализованы молекулы ДМСО?
3. Существует ли равенство концентрации молекул ДМСО в межмембранном пространстве и в объемном растворе? Какова структура водного раствора ДМСО в межмембранном пространстве?
4. Молекулярный механизм криопротекторных свойств ДМСО? В чем отличие ДМСО от других криопротекторов?

В работах диссертанта выполненных за период с 1999 по 2007 годы [1, 2, 4, 14, 16, 24] был дан ответ на эти вопросы за счет применения комбинации различных методов исследования. Влияние ДМСО на структуру бислоя мембраны ДПФХ, а также монослоя ДПФХ на поверхности водных растворов ДМСО исследовалось методами дифракции рентгеновских лучей и нейтронов [1, 4, 16], малоуглового рассеяния нейтронов [24], дифференциальной сканирующей калориметрии [1], инфракрасной спектроскопии [2] и рентгеновской рефлектометрии [14]. В результате проведенных автором работ установлено явление дегидратации межмембранного пространства фосфолипидных мембран молекулами диметилсульфоксида. Было доказано, что диметилсульфоксид вызывает удаление свободной воды из межмембранного пространства фосфолипидных липосом. При мольной фракции диметилсульфоксида 0.14, только связанная вода существует в межмембранном пространстве, что приводит к уменьшению толщины межмембранного пространства и увеличению температуры



фазового перехода мембраны. Также сформулированы принципы увеличения проницаемости липидных мембран под действием диметилсульфоксида. Было показано, что диметилсульфоксид развивают доменную структуру фосфолипидных мембран, увеличивая дефекты в латеральной структуре мембраны. Тем самым, создаются условия для формирования липофильной диффузии.

Мембраны ДМФХ ориентируются в сильных магнитных полях ( $> 1T$ ) [6S, 7S]. В экспериментах методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) было показано, что многослойные везикулы из чистого ДМФХ частично деформируются в сильных магнитных полях [7S]. Ориентация смешанных ДМФХ/ CHAPSO агрегатов в сильных магнитных полях исследовалась методом ЯМР [8S]. Для исследования ориентации липидных мембран в сильных магнитных полях использовался ЯМР и рассеяние рентгеновских лучей [7S, 9S]. Рассеяние нейтронов имеет преимущество перед рассеянием рентгеновских лучей – можно увеличивать контраст при замене  $H_2O$  на  $D_2O$ . Авторам впервые были проведены эксперименты методами рассеяния нейтронов с применением сильных магнитных полей для исследования свойств липидных мембран. Эксперименты были выполнены в Лаборатории Леона Бриллюэна (Сакле, Франция) и Институте Хана и Майтнер (Берлин, Германия).

Самосборка липидного бислоя в смешанных липид/ детергентных системах широко исследуется различными методами, в том числе, и методами малоуглового рассеяния [10S-14S]. Автором была уточнена последовательность морфологических преобразований в процессе самосборки липидного бислоя в смешанных липид/ детергентных системах. Образование больших агрегатов перед самосборкой липидного бислоя в системах ДМФХ/холат натрия было продемонстрировано уменьшением прозрачности раствора 15S. Наши исследования методом малоуглового рассеяния нейтронов дают более детальную информацию – перед самосборкой липидного бислоя происходит образование больших гауссовых клубков в системах с ионным и неионным детергентом [5, 28]. Применение сильного магнитного поля позволило доказать, что этот гауссов клубок состоит из стержнеобразных мицелл [10]. В синхротронных экспериментах было показано, что быстрый нагрев ( $100^{\circ}C/мин$ ) смешанной системы ДМФХ/ холат натрия с соотношением компонент  $15mM/8mM$  приводит к созданию однослойных монодисперсных везикул с радиусом  $225\text{\AA}$  [3]. Тем самым, разработан новый метод создания однослойных монодисперсных везикул за счет температурного

скачка в системе ДМФХ/ холат натрия (T-jump protocol), вошедший в число других методов восстановления везикул из смешанных липид/ детергентных мицелл [16S].

Важным параметром в тройной системе фосфолипид /вода /этанол является критическая концентрация этанола  $C_c$ , при которой образуется  $L_{\beta I}$  – фаза (фаза с взаимным проникновением углеводородных хвостов). Для случая ДПФХ это приводит к уменьшению толщины мембраны в гель фазе от значения 49 Å до значения примерно 30 Å. Величины  $C_c$  имеет физиологическое значение, так как индуцированная этанолом взаимопроникновение углеводородных цепей липидов может играть этиологическую роль в разрушение стенок желудка под влиянием алкоголя [17S]

Измеренная методом денситометрии, фазовая диаграмма системы ДПФХ / вода / этанол дает значение  $C_c = 0.93$  М при  $T=25^\circ\text{C}$  [18S]. Результаты, полученные методом рентгеновской дифракции, дают для гелевой фазы мембраны ДПФХ значение  $C_c = 0.4$  М. В области концентраций этанола 0.4 - 1.2 М мембрана состоит из двух фаз: *interdigitated* и *гель*. Выше концентрации этанола 1.2 М бислоем состоит из чистой  $L_{\beta I}$  – фазы [19S]. Представленные величины  $C_c$  находятся в противоречии с исследованием проницаемости мембраны ДПФХ методом флюоресценции. Эти результаты демонстрируют увеличение проницаемости мембраны при концентрации этанола 1.2 М [17S]. Несмотря на большое количество публикаций по исследованию влияния этанола на модельные биологические мембраны, прямых измерений толщины мембраны для системы фосфолипид /вода /этанол сделано не было [20S]. Основная информация о зависимости толщины мембран фосфолипидов от концентрации этанола была получена в дифракционных экспериментах на многослойных мембранах. Плазматическая мембрана клетки является однослойной. Более логично исследовать влияние этанола на структуру бислоя однослойных везикул. Новизна нашего подхода заключается в том, что мы применили метод малоуглового рассеяния нейтронов для измерения влияния этанола на структуру бислоя однослойных везикул.

Автором разработан метод разделенных формфакторов (РФФ), который лишен недостатков модели вложенных сфер, так как может описывать форму везикулы более сложную чем сфера и применять для моделирования плотности длины рассеяния нейтрона  $\rho(x)$  любую функцию [9]. РФФ метод был развит в последующих работах [13, 15, 17, 22, 21S]. На основании этого метода удалось впервые рассчитать функцию распределения воды в бислое однослойных везикул [15]. РФФ метод был применен для

исследования структуры однослойных везикул ДМФХ в трех фазовых состояниях [22]. Впервые установлено, что форма везикулы не является идеально сферической. Она близка к сферической в  $L_{\alpha}$  фазе (отношение полуосей эллипсоида вращения  $\varepsilon = 1.1$ ) и является эллиптической в  $L_{\beta'}$  и  $P_{\beta'}$  фазах с  $\varepsilon = 1.6$ . Новым и чрезвычайно важным фактом явилось доказательство того, что структура изогнутого бислоя с малым радиусом кривизны отличается от структуры плоского бислоя. Доказательство этого факта не является тривиальным. Потребовалось 20 лет, чтобы доказать наблюдаемую разницу в температурах предперехода для однослойных и многослойных везикул дипальмитоиллецитина [22S]. Установленная нами зависимость параметров бислоя от его радиуса кривизны была подтверждена одновременными и независимыми исследованиями везикул пальмитоилолеоилфосфатидилхолина [23S]. Однако, в отличие от работы [23S], где определялись только параметры бислоя, РФФ метод позволяет определять и форму везикул. На сегодня РФФ метод является наиболее мощным методом анализа структуры липидных везикулярных систем в нейтронографии [22, 21S] и является перспективным для применения в фармакологии для диагностики везикулярных переносчиков лекарств.

Многочисленные попытки получить детальную информацию о структуре нативной матрицы SC или модельных мембран SC, предпринятые методом рентгеновской дифракции на липосомах в избытке воды, не увенчались успехом [24S] и ограничивались получением информации о периоде повторяемости мембраны или фурье анализом низкого разрешения [25S]. Автором было впервые предложено применить дифракцию нейтронов от ориентированных и частично гидратированных модельных мембран SC для решения задачи об их структуре [18]. В отличие от предыдущих работ, новый подход дал возможность увеличить количество измеряемых порядков отражения от 1-3 до 5, решить фазовую проблему за счет вариации контраста  $H_2O-D_2O$  и сделать фурье анализ с разрешением  $5.5 \text{ \AA}$ . В результате, впервые была определена структура модельной мембраны SC, состоящей из смеси четырех липидов церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина – базовая мембрана SC [18]. Важным и неожиданным результатом явилась чрезвычайная малость межмембранного пространства ( $1 \text{ \AA}$ ) в мембранах на основе церамида 6, возникающая как следствие сверхсильного межмембранного взаимодействия. Для объяснения структуры базовой мембраны, была предложена модель арматурного укрепления липидной матрицы SC молекулами церамида 6 [18, 25]. Правильность модели

арматурного укрепления была доказана серией нейтронных дифракционных экспериментов, выполненных на мембранах с длинноцепочечными жирными кислотами и длинноцепочечным керамидом 1 [31-33, 35, 36, 39, 40]. Молекулы керамида 6 вызывают сверхсильное межмембранное взаимодействие, которое объясняет практически нулевое расстояние между липидными бислоями в модельных мембранах кожи. Введение в систему длинноцепочечных керамидов и жирных кислот не может разрушить этого взаимодействия.

Представленные на защиту результаты являются оригинальными и были опубликованы в реферируемых научных журналах как оригинальные исследовательские работы. Научные публикации соискателя за период с 2004-2011 года цитировались в 211 статьях, а работы, где он является первым автором, цитировались в 108 статьях, индекс Хирша публикаций равен 15 (<http://expertcorps.ru/science/whoiswho>). Цикл работ, состоящий из 21<sup>ой</sup> статьи автора, «Решение научных проблем, связанных с созданием трансдермальных везикулярных переносчиков лекарств, методами нейтронографии и рентгенографии» был отмечен II премией Объединенного института ядерных исследований за 2010 год по разделу научно-исследовательских экспериментальных работ.

### **Научная и практическая ценность работы**

Большинство биологических объектов содержат свободную и связанную воду. ДМСО индуцированная дегидратация является основой криопротекторных свойств ДМСО и представляет интерес для криобиологии и криомедицины. Исследования процессов охлаждения мембран методом дифракции в реальном времени могут применяться для выбора наиболее подходящих криопротекторных смесей.

Применение сильных магнитных полей в нейтронных экспериментах в области soft-matter позволяет получать информацию об упругих свойствах липидных агрегатов. Одним из перспективных направлений может быть исследование упругих свойств трансдермальных везикулярных переносчиков лекарств. В диссертации поставлен вопрос о зависимости процесса образования везикулярной популяции от кинетики процесса в смешанных системах ДМФХ/холат натрия. Решение этой проблемы является задачей будущего.

Метод разделенных формфакторов для исследования везикулярных систем применяется исследователями в США, Канаде и Германии для исследования

однослойных липидных и липид/пептидных везикул, а также может применяться для исследования везикулярных переносчиков лекарств [21S, 23S].

Метод увеличения контраста рентгеновского излучения водными растворами дисахаридов позволяет на синхротронных источниках выполнять диагностику морфологии наночастиц-лекарств, разрабатываемых на основе фосфолипидов и выпускаемых в лиофилизированном виде в мальтозной матрице.

Разработанные методики и полученная информация о структуре модельных мембран верхнего слоя кожи млекопитающих *stratum corneum* применяются другими исследователями для работ по определению структуры модельных мембран SC с более реалистичным составом [26S].

Низкая гидратация и малое межмембранное пространство (1 Å) мембран на основе керамида 6 делает гидрофильную диффузию лекарств через липидную матрицу SC затруднительной. Более предпочтительным является липофильное направление диффузии. Для усиления липофильной диффузии следует применять вещества увеличивающие дефекты в мембранной поверхности.

Созданные модельные мембраны SC позволяют исследовать диффузионные процессы в них на реакторе ИБР-2 методом времени пролета. Представленные в диссертации результаты являются научной основой для начатых на реакторе ИБР-2 ЛНФ ОИЯИ исследований кинетических процессов в модельных мембранах верхнего слоя кожи на дифрактометре ДН-2 методом дифракции в реальном времени [27S-29S].

### **Апробация работы.**

**Результаты, представленные в диссертации, докладывались в виде 36 устных докладов на международных и российских конференциях и совещаниях:** Совещание по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния (Заречный 1997, Гатчина 2002, Обнинск 1999, 2006, Гатчина 2008, Москва 2010); Национальная конференция «Рентгеновское, Синхротронное излучения, Нейтроны и Электроны для исследования наносистем и материалов.» (Дубна 1997, Москва 1999, Москва 2009); International Workshop “Instrumentation and methods of synchrotron radiation investigations in condensed matter” (Republic of Belarus, 1997); I, II, III German-Russian User Meeting on Condensed Matter Physics with Neutron at IBR-2 (Dubna 1998, 2001, 2004); Workshop on Deuteration of Biological Molecules for Structural and Dynamical Studies. Applications to Neutron Scattering and NMR (Dubna 1998); 4th and 5<sup>th</sup> International School and Symposium on

Synchrotron Radiation in Natural Science (Poland 1998, 2000); 1 and 2 International Workshop JINR synchrotron radiation source-prospects of research (Dubna 1999, 2001); II, III, IV Сисакьяновские чтения «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии» (Дубна 2001, Дубна 2007, Алушта 2010); Совещание по исследованиям на ИБР-2 (Дубна 2002, Дубна 2005, Дубна 2006); Российская конференция по использованию синхротронного излучения (Новосибирск 2002, Новосибирск 2010); XII international conference on the selected problems of modern physics (Dubna 2003); Programm Advisory Committee for Condensed Matter Physics (Dubna 2005, 2008); Первое российское рабочее совещание «Ядерная наука конденсированных сред, наноструктур и технологий» (Дубна 2007); BENSC user meeting (Berlin 2007); Modern spectroscopy methods in studying structure and function of biopolymers in biology and medicine (Dubna 2007); Gordon Research Conference «Barrier function of mammalian skin» (USA 2007); Конференция по физике конденсированного состояния, сверхпроводимости и материаловедению (Москва РНЦ «Курчатовский институт» 2007); Conference on Theoretical Physics (Dubna 2010); 4th Japan – Russia International workshop MSSMBS'10 “Molecular Simulation Studies in Material and Biological Sciences” (Dubna 2010).

**Результаты, представленные в диссертации, докладывались на 22 семинарах проведенных в нейтронных, биофизических и фармацевтических центрах:** НЭОНИКС ЛНФ ОИЯИ (1998, 2001, 2005, 2006); кафедра нейтронографии, физический факультет МГУ (1998, 2008, 2009); Институт физико-химической медицины РАМН, Москва (1998); Pharmaceutical Department, Martin Luther University, Halle, Germany (июнь 1999, июль 1999, 2003); Experimental Physics Institute, Physical Department, Leipzig University, Germany (1999, 2002); BENSC, HMI, Berlin, Germany (1999); Pharmaceutical Faculty, Comenius University, Bratislava, SR (1999, 2000); Interdisciplinary Institute of Material Science, Martin Luther University, Halle, Germany (Part 1 – June 28, part 2 – July 6, 2000); Physical Department, Martin Luther University, Halle, Germany (2004); GKSS Research Center, Geesthacht, Germany (2004); Stranski Laboratory of Physical and Theoretical Chemistry, Technical University, Berlin, Germany (2005); ПИЯФ, Гатчина (2007).

**Личный вклад автора** заключается в постановке задач, формулировке предложений экспериментов и их практической подготовке, приготовлении образцов, проведении экспериментов, расчете спектров, проведении расчетов, написании и публикации статей. Образцы для исследований системы ДМФХ/ холат натрия были изготовлены в институте биоорганической химии Т.Н. Симоновой и канд. хим. наук Л.И. Барсуковым.

Моделирование рефлектометрических кривых было выполнено в Институте экспериментальной физики I университета Лейпцига. Программное обеспечение для расчетов по РФФ модели на базе пакета DFUMIL было развито докт. физ.-мат. наук Е.В. Земляной. Расчеты пространственного разрешения в одномерном дифракционном эксперименте были выполнены совместно с проф. А.М. Балагуровым. Образцы модельных мембран липидной матрицы верхнего слоя кожи были созданы в ЛНФ ОИЯИ и в Университете Мартина Лютера. Дейтерированные липиды синтезировались в группе проф. Б. Добне (Университет Мартина Лютера, Германия)

**Публикации.** По теме диссертации опубликована 40 статей в отечественных и зарубежных реферируемых журналах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из списка используемых обозначений, введения, шести глав, основных результатов и выводов, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации 263 страницы. Общее количество цитируемой литературы 229. Количество публикаций по теме диссертации 40.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность проф. П. Лёзи (Университет Нанси, фармацевтический факультет, Франция), др. М. Оливо (фармацевтический факультет, University Paris-Sud, France), др. Д. Ломбардо (университет Миссины, Италия), др. Ж. Пеппи (LLB, Saclay, France), проф. М. Лёше (NIST, USA), др. Ш. Борбели (BSNC, Budapest), др. А. Хоелл, др. Т. Хаус, др. С. Данте (BENSNC, HMI, Berlin). др. В. Асваль (SSPD, BARC, Trombay, India), др. Т. Гутберлет (PSI, Villigen, Switzerland), проф. П. Балгави, др. М. Дубничка, др. М. Кусерка (фармацевтический факультет, университет Каменского, Братислава), проф. Г. Клозе, проф. Х. Шмиделу, др. П. Крюгер (Университет Лейпцига, Германия), др. М. Яних, проф. Р. Нойберт, проф. З. Вотевиг, проф. Б. Добне, др. Я. Сбитовска, др. А. Рутингер, др. Д. Кеснер, Д. Матвееву (фармацевтический факультет Университета Мартина Лютера, Халле, Германия), А.В. Забелину, А.Ю. Грузинову (РНИИ Курчатовский институт, Москва), канд. хим. наук Л.И. Барсукову (Институт биоорганической химии), канд. физ.-мат. наук В.И. Горделию, канд. физ.-мат. наук Н.Ю. Рябовой, канд. техн. наук Е.В. Ермаковой, проф. А.М. Балагурову, проф. В.Л. Аксенову (Лаборатория нейтронной физики, ОИЯИ, Дубна) за совместную работу на различных этапах исследований. Автор признателен коллегам из ЛНФ ОИЯИ за помощь и сотрудничество.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении сформулирована постановка задачи, актуальность, научная новизна, а также указана научная и практическая ценность работы. В первой главе описаны технологии приготовления липидных мембран для нейтронных и синхротронных исследований.

### Глава 2. Тройная система фосфолипид/ криопротектор/ вода

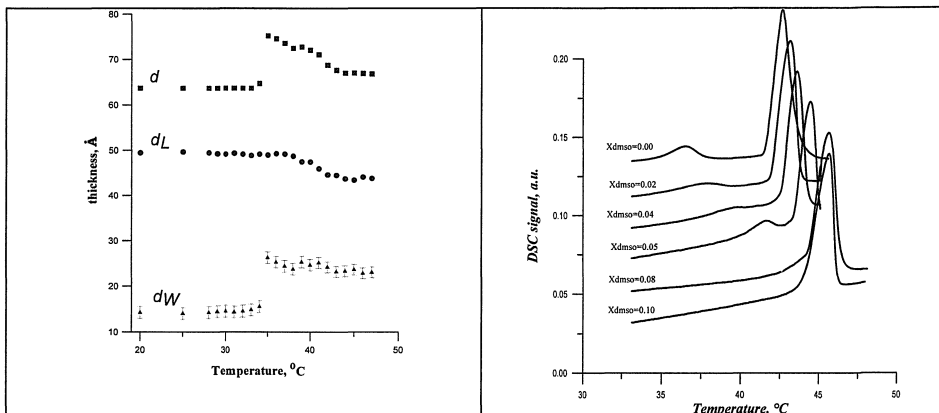
Глава 2 посвящена описанию результатов исследования тройной системы фосфолипид/ криопротектор/ вода. Представлены результаты по влиянию диметилсульфоксида на свойства фазовых переходов при положительных температурах, результаты влияния ДМСО на структуру бислоя ДПФХ в гель фазе, а также результаты влияния ДМСО и глицерина на процессы образования льда при охлаждении тройной системы фосфолипид/ криопротектор/ вода. Описаны новые фазовые переходы, возникающие в системе фосфолипид/ ДМСО/ вода при температурах ниже температуры образования льда. Установлено явление ДМСО индуцированной дегидратации межмембранного пространства фосфолипидов. Сформулированы принципы увеличения проницаемости липидных мембран под действием диметилсульфоксида. В § 2.1 описано состояние проблемы по исследованию влияние ДМСО на мембраны фосфолипидов, в § 2.2 – приготовление образцов и в § 2.3 – эксперимент.

#### *§ 2.4. Влияние ДМСО на свойства фазовых переходов фосфолипидов (ДПФХ, ДМФХ) при положительных температурах.*

Влияния ДМСО на свойства фазовых переходов ДПФХ при положительных температурах исследовалось методами рентгеновской малоугловой и широкоугловой дифракции в реальном времени, дифференциальной сканирующей калориметрии и малоуглового рассеяния нейтронов. На рис. 6 представлена зависимость структурных параметров мембраны ДПФХ от температуры. Изменения фазовых переходов при добавлении ДМСО демонстрируют калориметрические кривые на рис. 7. Установлено, что под влиянием ДМСО происходят существенные изменения в свойствах фазовых переходов: температурная область существования  $P_{\beta'}$  фазы уменьшается и ондуляции мембраны исчезают при  $X_{DMSO} = 0.10$ . Отсюда следует, что ДМСО делает мембрану более жесткой, стабилизируя её поверхность. Кроме изменения в структуре фазовых



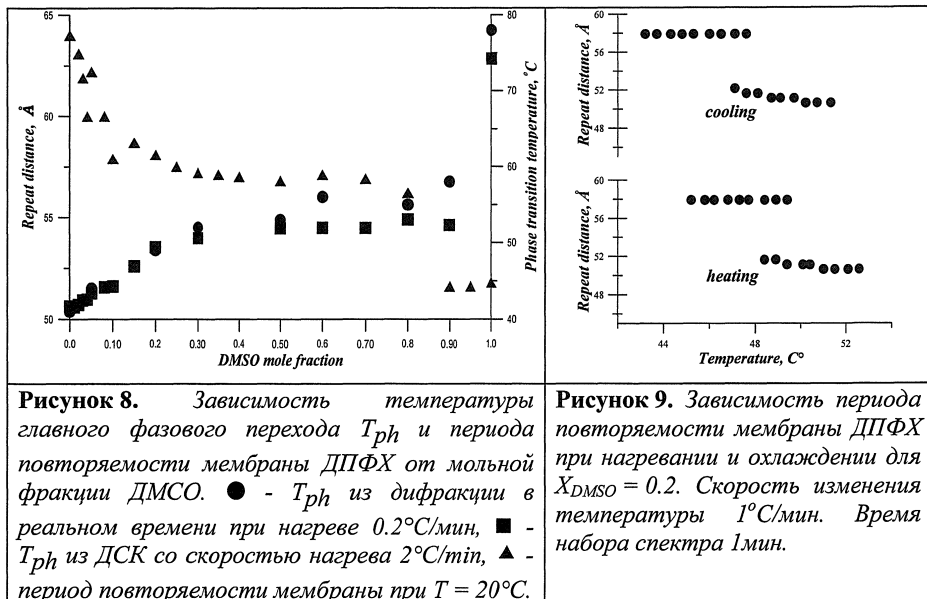
переходов происходит увеличение температуры главного фазового перехода при увеличении мольной фракции ДМСО [1, 2, 24, 40].



**Рисунок 6.** Зависимость периода повторяемости мембраны  $d$ , толщины мембраны  $d_L$  и толщины водной прослойки  $d_W$  от температуры для двойной системы ДПФХ/вода. Экспериментальные ошибки приведены только для  $d_W$ .

**Рисунок 7.** Калориметрические кривые тройной системе ДПФХ /ДМСО /вода: а) главный фазовый переход из  $P_{\beta'}$  в  $L_{\alpha}$  фазу (большой резкий пик) для системы с  $X_{DMSO} = 0.0, 0.02, 0.04, 0.05, 0.08, 0.1$ ; б) предпереход из  $L_{\beta'}$  в  $P_{\beta'}$  фазу (широкий пик в левой части кривой) для системы с  $X_{DMSO} = 0.0, 0.02, 0.04, 0.05$ . Предпереход исчезает при  $X_{DMSO} = 0.08$ .

На рис. 8 представлены результаты калориметрических и дифракционных исследований фазовых переходов: зависимость температуры главного фазового перехода  $T_{ph}$  от концентрации ДМСО и зависимость периода повторяемости мембраны от концентрации ДМСО при  $T = 20^\circ\text{C}$  [1, 2, 24]. Результаты синхротронных экспериментов говорят о том, что, начиная с  $X_{DMSO} = 0.1$ , взаимодействие ДМСО и мембраны меняется. При  $X_{DMSO} \geq 0.1$  наступает область концентраций, где мембрана ДПФХ не имеет предперехода и существует прямой фазовый переход из гель-фазы в жидкокристаллическую фазу за счет плавления углеводородных хвостов [1, 24, 2S]. При этом фазовый переход из гель в жидкокристаллическую фазу имеет область сосуществования двух фаз и гистерезис. На рис. 9 показана зависимость периода повторяемости мембраны от температуры для  $X_{DMSO} = 0.2$  при нагревании и охлаждении.



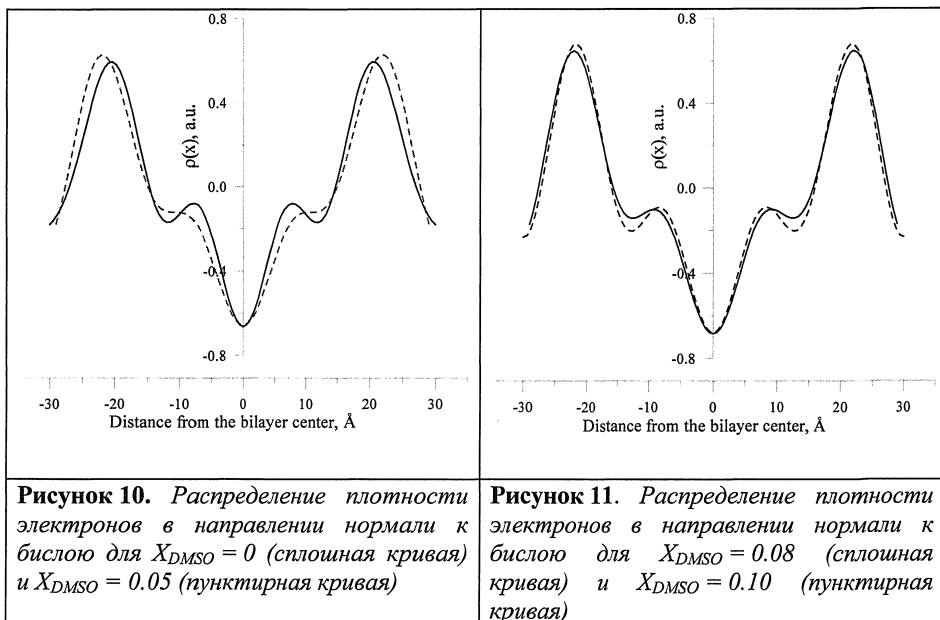
§ 2.5. Влияние ДМСО на структуру липидного бислоя в гель фазе и положение молекулы ДМСО в мембране.

Период повторяемости  $d$  мембраны ДПФХ связан с толщиной мембраны  $d_L$  и с толщиной прослойки растворителя в межмембранном пространстве  $d_w$  соотношением

$$d = d_L + d_w \quad (1)$$

Уменьшение периода повторяемости  $d$  при  $T = 20^\circ\text{C}$ , представленное на рис. 8, может происходить как результат изменения слагаемых  $d_L$  и (или)  $d_w$ . Поэтому исследование влияния ДМСО на толщину мембраны ДПФХ является необходимым. Определенные в работе [5S] плотности распределения электронов в мембране говорят о том, что толщина мембраны не меняется. Плотности распределения электронов рассчитанные в [2S], указывают на увеличение толщины мембраны ДПФХ на  $2.2 \text{ \AA}$  при  $X_{\text{DMSO}} = 0.1$ . Для устранения противоречия в экспериментальных результатах и уточнения информации были проведены независимые рентгеновские дифракционные эксперименты на установке D24 синхротронного источника DCI, LURE, France [24, 40]. На рис. 10 и 11 представлены профили распределения плотности электронов в мембране ДПФХ (фурье профили) для  $X_{\text{DMSO}} = 0; 0.05; 0.08; 0.10$ . Максимумы в районе  $20 \text{ \AA}$  соответствуют положению фосфора в полярной голове молекулы ДПФХ.

Расстояние между этими максимумами  $d_{pp}$  характеризует толщину мембраны с точностью до константы. Измеренные по фурье профилям значения  $d_{pp}$  представлены в табл. 1. Наши результаты по вычислению фурье профилей хорошо совпадают с результатами, опубликованными в [2S]



**Рисунок 10.** Распределение плотности электронов в направлении нормали к бислою для  $X_{DMSO} = 0$  (сплошная кривая) и  $X_{DMSO} = 0.05$  (пунктирная кривая)

**Рисунок 11.** Распределение плотности электронов в направлении нормали к бислою для  $X_{DMSO} = 0.08$  (сплошная кривая) и  $X_{DMSO} = 0.10$  (пунктирная кривая)

**Таблица 1.** Зависимость расстояния между максимумами  $d_{pp}$  плотности распределения электронов мембраны ДПФХ при  $T=20^\circ\text{C}$  от мольной фракции ДМСО в растворе,  $X_{DMSO}$

$X_{DMSO}$	0.00	0.05	0.08	0.10
$d_{pp}$ , Å	$41.2 \pm 0.4$	$44.0 \pm 0.4$	$44.8 \pm 0.4$	$43.6 \pm 0.4$

Малоугловое рассеяние нейтронов на однослойных везикулах являлось вторым методом, используемым нами при исследовании вопроса о влиянии ДМСО на толщину мембраны в области малых концентраций. Этим наши исследования отличались от работ, основанных на дифракции рентгеновских лучей [2S-5S]. Целью нейтронных малоугловых экспериментов являлось проведение независимых измерений зависимости толщины бислоя от концентрации ДМСО. Эксперимент был проведен на везикулах приготовленных экструзией через поры диаметром 500 Å и 2000 Å. Анализ экспериментальных данных был выполнен в приближении Гинье и по модели поллой сферы [30S]

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega_{\text{мон}}} (q, R_1, R_2) = n \cdot (\Delta\rho)^2 \cdot \left(\frac{4\pi}{q^3}\right)^2 \cdot (A_2 - A_1)^2, \quad (2)$$

где  $A_i = \sin(qR_i) - (qR_i) \cdot \cos(qR_i)$ . Результаты вычислений толщины мембраны представлены в табл. 2. Оба метода вычисления толщины мембраны демонстрируют увеличение её толщины при увеличении концентрации ДМСО. Толщина мембраны не изменяется при увеличении концентрации ДМСО до  $X_{\text{ДМСО}} = 0.05$ . Соответствующая величина  $d_{pp}$  увеличивается на  $2.8 \pm 0.8 \text{ \AA}$  (см. табл. 1). Увеличение  $d_{pp}$  происходит за счет локализации атомов серы рядом с поверхностью мембраны без проникновения молекул ДМСО внутрь мембраны. При увеличении концентрации ДМСО до  $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$  толщина мембраны увеличивается на величину  $2.3 \pm 1.9 \text{ \AA}$ . При этом величина  $d_{pp}$  увеличивается на  $2.4 \pm 0.8 \text{ \AA}$ . Следовательно, при  $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$  эффект увеличения толщины мембраны подтверждается двумя независимыми экспериментами. Здесь причиной увеличения толщины мембраны является проникновение молекул ДМСО в липидный бислой.

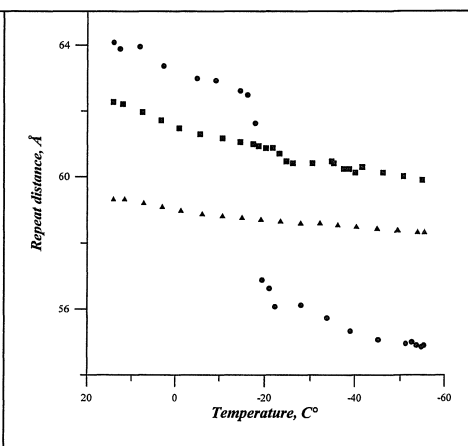
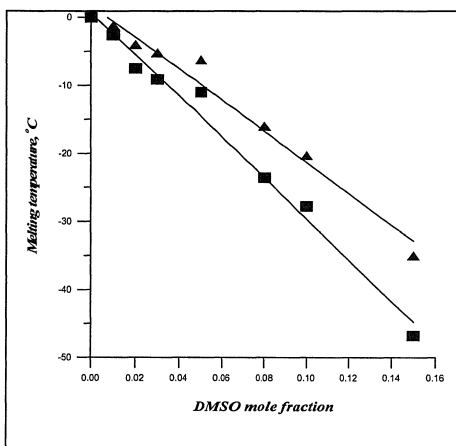
**Таблица 2.** Зависимость параметров однослойной везикулы ДПФХ от концентрации ДМСО при  $T=20^\circ\text{C}$ .  $R_{\text{av}}$  – средний радиус везикулы,  $P$  – полидисперсность,  $d_L$  – толщина бислоя мембраны.

$X_{\text{ДМСО}}$	0.0	0.05	0.10	0.15
$R_{\text{av}}, \text{ \AA}$	$263 \pm 3$	$250 \pm 3$	$258 \pm 3$	$264 \pm 3$
$P, \%$	32	33	32	30
$d_L, \text{ \AA}$ по модели поллой сферы	$44.5 \pm 0.5$	$45.0 \pm 0.5$	$45.5 \pm 0.5$	$46.0 \pm 0.5$
$d_L, \text{ \AA}$ в гинье приближении	$48.1 \pm 0.9$	$49.5 \pm 1.0$	$50.4 \pm 1.0$	$50.3 \pm 1.0$

В настоящее время наилучшее пространственное разрешение получено в рефлектометрических экспериментах на липидных монослоях с применением синхротронных источников [31S]. Нами были проведены рентгеновские рефлектометрические измерения структуры монослоя ДПФХ на поверхности водных растворов ДМСО для концентраций  $X_{\text{ДМСО}} = 0.0 - 0.1$  и исследованы  $\pi$ -A изотермы. Результаты показали, что при  $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$  молекулы ДМСО локализованы выше полярных голов, в области полярных голов и ниже [14]. Проведенный анализ изменения  $\pi$ -A изотерм монослоя молекул ДПФХ под действием ДМСО подтверждает сделанный в § 2.4 вывод о том, что ДМСО увеличивает наличие дефектов в мембранной структуре за счет образования доменов (кластеров).

§ 2.6. ДМСО индуцированная дегидратация межмембранного пространства.

Исследования влияния ДМСО на структуру мембраны демонстрируют уменьшение толщины водного межмембранного пространства, которое вместе с исчезновением предперехода наталкивает на мысль о возможном уменьшении количества свободной воды в межмембранном пространстве. Калориметрия при низких температурах является методом определения количества свободной и связанной воды [32S]. Исследуемые образцы были приготовлены таким образом, что общее количество воды, количество воды в межмембранном пространстве и количество свободной воды являлись соизмеримыми величинами.



**Рисунок 12.** Зависимость температуры плавления льда от мольной фракции ДМСО для тройной системы ДПФХ/ДМСО/вода (квадраты) и для двойной системы ДМСО/вода (треугольники).

**Рисунок 13.** Зависимость периода повторяемости мембраны от температуры при охлаждении для двойной системы ДПФХ/ вода (кружки), тройной системы ДПФХ/ ДМСО/ вода с  $X_{DMSO} = 0.05$  - основная фаза (квадраты), и тройной системы ДПФХ/ ДМСО/ вода с  $X_{DMSO} = 0.05$  без избытка воды (треугольники).

На рис. 12 представлены зависимости температуры плавления льда от мольной фракции ДМСО для двойной (ДМСО / вода) и тройной системы (ДПФХ/ ДМСО/ вода). При любом ненулевом значении  $X_{DMSO}$  температура плавления льда в системе ДПФХ/ДМСО/вода меньше температуры плавления льда в двойной системе ДМСО/вода. Эта разница температур плавления является доказательством того, что концентрация ДМСО в объемном растворителе отличается от концентрации ДМСО в растворителе, используемом при приготовлении образцов. Изменение концентрации

связано с тем, что часть молекул воды в тройной системе ДПФХ / ДМСО / вода связана водородными связями с полярными головками молекул и не смешивается с ДМСО. Реальная концентрация ДМСО в объемном растворителе  $X'_{DMSO}$  тройной системы выше концентрации ДМСО  $X_{DMSO}$  в двойной системе

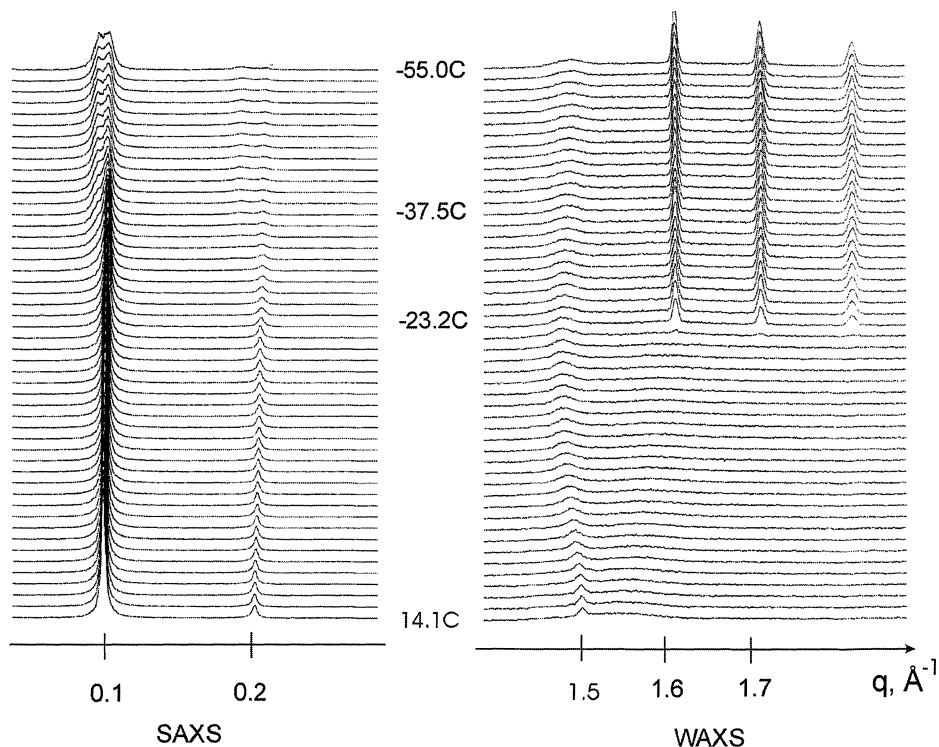
$$X'_{DMSO} = 1.32 X_{DMSO} \quad (3)$$

Количество молекул «несмешиваемой» воды на одну молекулу ДПФХ равно  $10 \pm 2.6$ . Полученная величина совпадает со значением количества молекул воды, связанных с полярной головкой одной молекулы ДПФХ [32S]. Молекулы связанной воды не смешиваются с молекулами ДМСО. Область малых концентраций ДМСО соответствует уменьшению количества свободной воды в межмембранном пространстве с 6.4 при  $X_{DMSO} = 0.0$  до 0 при  $X_{DMSO} = 0.14$ . Уменьшение свободной воды в исследуемой системе получило название ДМСО индуцированная дегидратация межмембранного пространства [1].

### § 2.7. Исследования фазовых переходов при низких температурах.

Зависимости периодов повторяемости мембран ДПФХ от температуры при охлаждении представлены на рис. 13 для двойной системы ДПФХ/ вода, для тройной системы ДПФХ/ ДМСО/ вода с  $X_{DMSO} = 0.05$  (основная фаза) и для этой же тройной системы без избытка растворителя. Резкое уменьшение величины  $d$  на  $\Delta d = -5.9 \pm 0.6 \text{ \AA}$  при  $T = -19.4^\circ\text{C}$  для двойной системы ДПФХ/ вода является результатом дегидратации межмембранного пространства, вызванного образованием льда в объемном растворителе. Уменьшение величины  $d$  в момент образования льда исчезает при увеличении концентрации ДМСО как показано в табл. 3 и отсутствует полностью в образцах без избытка воды. На рис. 14 представлены SAXS и WAXS дифракционные спектры, записанные в реальном времени при охлаждении многослойных везикул тройной системы ДПФХ/ ДМСО/ вода с  $X_{DMSO} = 0.05$ . При температуре  $-23.2^\circ\text{C}$  происходит образование льда без изменения величины периода повторяемости. При температуре  $-37.5^\circ\text{C}$  возникает новая мультислойная  $L_{sr}$  фаза, которая сосуществует с основной  $L_c$  фазой при дальнейшем охлаждении [16].  $L_{sr}$  фазы образуется в тройных системах с ДПФХ (16 атомов углерода в цепочке) и ДСФХ (18 атомов углерода в цепочке), но не образуется в тройных системах на основе ДМФХ (14

атомов углерода в цепочке). Также  $L_{sr}$  фаза не образуется при замене ДМСО глицерином.



**Рисунок 14.** Последовательность SAXS и WAXS дифракционных спектров записанных в реальном времени при охлаждении многослойных везикул тройной системы ДПФХ/ ДМСО/ вода с  $X_{DMSO}=0.05$ . SAXS спектры соответствуют дифракции от многослойной 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  $T_{ice} = -23.2^\circ\text{C}$ ). Скорость охлаждения  $1.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ . Время набора одного спектра  $1^\circ\text{мин}$ .

**Таблица 3.** Тройная система ДПФХ/ ДМСО/ вода. Зависимость величины дегидратации мембраны  $\Delta d$  и температуры образования льда  $T_{ice}$  от мольной фракции ДМСО в растворе  $X_{DMSO}$ .

$X_{DMSO}$	0.00	0.01	0.02	0.05
$T_{ice}, ^\circ\text{C}$	-19.4	-19.7	-22.1	-23.2
$\Delta d, \text{Å}$	$-5.9 \pm 0.6$	$-3.6 \pm 0.6$	$-1.9 \pm 0.6$	$-0.5 \pm 0.6$

Анализ экспериментальных данных показал, что образование  $L_{sr}$  фазы в системах фосфолипид/ ДМСО/ вода при низких температурах основано, с одной стороны, на фазовом расслоении системы на фазу, обогащенную водным раствором ДМСО, и на фазу, с малым содержанием водного раствора ДМСО. С другой стороны – со спецификой взаимодействия молекул ДМСО с углеводородными цепочками.

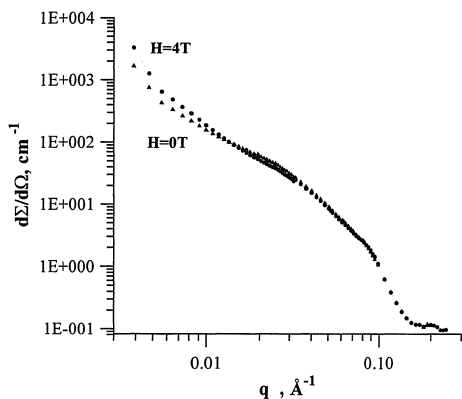
### Глава 3. Применение ориентации фосфолипидных мембран в сильных магнитных полях для исследования их свойств и структуры.

Работа по применению сильных магнитных полей для исследования липидных мембран в нейтронных экспериментах началась с экспериментов по ориентации многослойных везикул ДМФХ в  $L_{\beta'}$  и  $L_{\alpha}$  фазе [10]. Зависимость параметра ориентации везикулы в  $L_{\beta'}$  фазе от величины магнитного поля представлена в табл. 4.

**Таблица 4.** Зависимость параметра ориентации  $\beta$  от величины индукции магнитного поля  $B$ . Концентрация ДМФХ 90 мМ,  $T = 10^{\circ}\text{C}$ . Средняя ошибка определения величины  $\beta$  составляет 0.03.

$B, \text{Тл}$	1	2	3	3.5	4
$\beta$	0.42	0.46	0.47	0.47	0.49

Следующим шагом было исследование структуры агрегатов, предшествующих образованию бислоя в смешанных липид/ детергентных системах – гауссова клубка. Чтобы получить больше информации о структуре стержнеобразных мицелл, образующих гауссов клубок, были проведены малоугловые измерения в сильных магнитных полях на малоугловом спектрометре V4 (НМИ, Berlin), оснащенный сверхпроводящим магнитом.

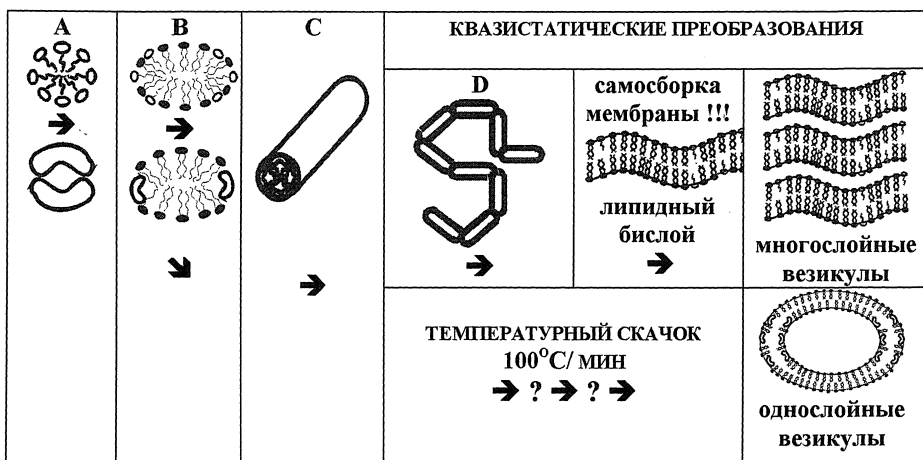


**Рисунок 15.** Спектры малоуглового рассеяния от гауссова клубка стержнеобразных мицелл 45 мМ ДМФХ /12 мМ  $C_{12}E_8$  в магнитном поле 4 Тл и без него. Температура образца  $10^{\circ}\text{C}$ .



Спектры МУРН, представленные на рис. 15, демонстрируют ориентацию гауссова клубка в магнитном поле. Из этих спектров была определена длина персистентности клубка и показано, что эта длина не зависит от величины магнитного поля.

Проведенные нейтронные и рентгеновские исследования методом малоуглового рассеяния позволили уточнить последовательность процесса самосборки липидного бислоя в двух смешанных липид/ детергентных системах (ДМФХ/ холат натрия и ДМФХ/  $C_{12}E_8$ ) как показано на рис. 16 [3, 10, 28, 40].



**Рисунок 16.** Последовательность морфологических преобразований при температурно-индуцированной самосборке мембраны в смешанных липид/ детергентных системах. А – сферические мицеллы, В – эллиптические мицеллы, С – стержнеобразные мицеллы, D – полимероподобные мицеллы. Обозначения молекул: - неионный детергент  $C_{12}E_8$ , - ионный детергент NaC, - ДМФХ.

Первый шаг (А) это мицеллы с малым процентным содержанием ДМФХ, структура которых близка к сферической. Мицеллы, содержание детергента в которых достаточно для самосборки мембраны, имеют эллиптическую форму (В). Дальнейшее уменьшение содержания детергента в системе или увеличение температуры приводит к образованию стержнеобразных мицелл, торцевые стороны которых обогащены детергентом (D). При медленном квазистатическом нагревании образца стержнеобразные мицеллы соединяются торцами, образуя гауссов клубок. Такую структуру мы назвали полимероподобной. Незначительное нагревание системы приводит к самосборке липидного бислоя, который при дальнейшем нагревании преобразуется в многослойные везикулы.

Быстрый нагрев системы на основе ионного детергента NaC из состояния эллиптических мицелл (В) приводит к образованию однослойных везикул низкой полидисперсности и малого радиуса (225 Å). Быстрый нагрев системы на основе неионного детергента C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> из состояния (В) образует везикулы с большой полидисперсностью и большим радиусом. В процессе изучения самосборки мембраны был разработан новый метод создания везикул низкой полидисперсности в системе ДМФХ/ холат натрия [3]. Также впервые для исследования процесса самосборки мембраны применялись исследования в сильных магнитных полях [10].

#### Глава 4. Проникновение этанола через мембрану.

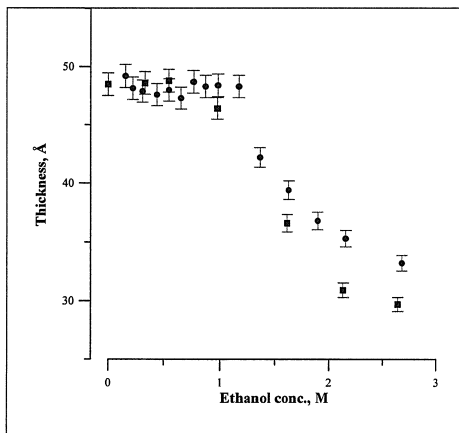
В исследованиях влияния этанола на структуру однослойных везикул ДПФХ для определения толщины мембраны использовалось приближение Гинье. Спектр малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) от везикул фитировался уравнением с двумя свободными параметрами  $a$  и  $R_t$  [5]

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = \frac{d\Sigma}{d\Omega}(0) \cdot q^a \exp[-q \cdot R_t^2] \quad (4)$$

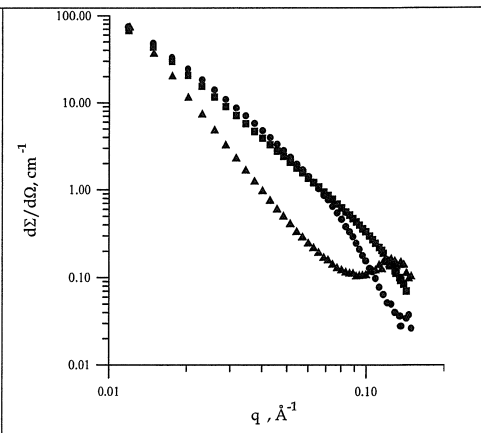
Здесь значения параметра  $a$  определяет морфологию (тип) частиц. Для больших однослойных везикул  $a = -2$ . Отклонение от величины  $a = -2$  даёт информацию об изменении морфологии частиц. Толщина мембраны определяется как  $d_G = R_t \sqrt{12}$ . Зависимость толщины мембраны ДПФХ от концентрации этанола представлена на рис. 17 [21]. Резкое уменьшение толщины мембраны при концентрации этанола выше 1.2 М соответствует формированию *interdigitated L<sub>β</sub>* фазы. Наши результаты находятся в хорошем соответствии с исследованием проницаемости везикул методом флюоресценции, которое показывает существенное монотонное увеличение проницаемости в области концентраций этанола от 1.2 М до 1.8 М [33Л].

На рис. 18 представлены спектры МУРН от экструдированных везикул ДПФХ с концентрацией этанола от 0.0 до 6.2 М,  $T = 25^\circ\text{C}$ . Для нулевой концентрации этанола  $a = -2$ , что соответствует однослойным везикулам с толщиной бислоя  $d_G = 48.5 \text{ \AA}$ . В области концентраций этанола от 0 до 2.7 М  $a = -2$  и условия применимости уравнений (4) выполняются. При концентрациях выше 2.7 М эти условия нарушаются, так как  $a < -2$ . Представленный на рисунке 10 спектр МУРН для  $C_{et} = 3.2 \text{ М}$  имеет  $a = -2.35 \pm 0.1$ , что делает вычисление толщины мембраны невозможным. При  $C_{et} = 6.2 \text{ М}$   $a = -3.69 \pm 0.02$ , при этом появляется дифракционный пик при  $q = 0.128 \text{ \AA}^{-1}$

от многослойной структуры везикулы с периодом повторяемости  $d = 49.1 \pm 2 \text{ \AA}$ . Формирование многослойных везикул из однослойных при концентрациях этанола больше чем 2.7 М происходит в результате слияния однослойных везикул, что говорит об увеличении сил межмембранного взаимодействия по сравнению с чистой водой.



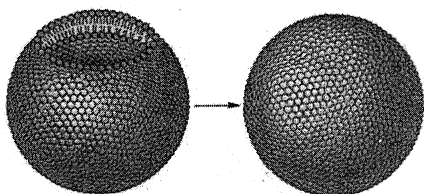
**Рисунок 17.** Зависимость толщины мембраны ДПФХ от концентрации дейтерированного (кружки) и протонированного (квадраты) этанола при  $T=25^\circ\text{C}$ .



**Рисунок 18.** Спектры МУРН от везикул ДПФХ при  $T=25^\circ\text{C}$ : в тяжелой воде (кружки), в смеси  $\text{D}_2\text{O}/\text{EtOD}$  с  $C_{\text{Et}} = 3.2 \text{ M}$  (квадраты), и в  $\text{D}_2\text{O}/\text{EtOD}$  с  $C_{\text{Et}} = 6.2 \text{ M}$  (треугольники).

## Глава 5. Метод разделенных форм факторов. Структура однослойных везикул ДМФХ.

Глава 5 посвящена созданию метода разделенных форм факторов (РФФ) для исследования однослойных везикул (ОСВ) методом малоуглового рассеяния, а также применению РФФ метода для исследования структуры и свойств везикул димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) размером от  $500 \text{ \AA}$  до  $1000 \text{ \AA}$ .



**Рисунок 19.** Сферическая однослойная везикула. Слева показан разрез везикулы, демонстрирующий бислой образующий поверхность везикулы [37S].

Такие везикулы в большинстве предыдущих работ [12, 13, 23S, 34S] рассматривались как сферические (см. рис. 19). РФФ метод позволяет отделить формфактор формы везикулы от формфактора липидного бислоя, что увеличивает возможности более детального описания структуры везикул [8, 9, 12, 22, 23, 27]. Макроскопическое когерентное сечение рассеяния монодисперсной популяции везикул определяется выражением [30S]

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega_{mon}}(q) = n \cdot A^2(q) \cdot S(q) \quad (5)$$

где  $n$  - количество везикул в единице объема,  $A(q)$  – амплитуда рассеяния нейтрона одной везикулой,  $S(q)$  – структурный фактор популяции везикул [13]. Проблеме расчета структурного фактора ОСВ посвящен параграф 5.3, где показано, что  $S(q) \approx 1$  для концентрации липида в образце 1% по весу. В РФФ методе макроскопическое сечение рассеяния для монодисперсной популяции везикул записывается в виде.

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

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

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

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

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

Здесь  $\rho_c(x)$  – контраст, разница между плотностью длины рассеяния липидного бислоя  $\rho(x)$  и плотностью длины рассеяния воды. Разделение формфактора формы везикулы и формфактора бислоя позволяет использовать любые интегрируемые приближения для описания  $\rho_c(x)$  и описывать деформацию формы везикулы. Для эллиптической поверхности с полуосями  $(a, a, \varepsilon a)$  формфактор записывается в виде

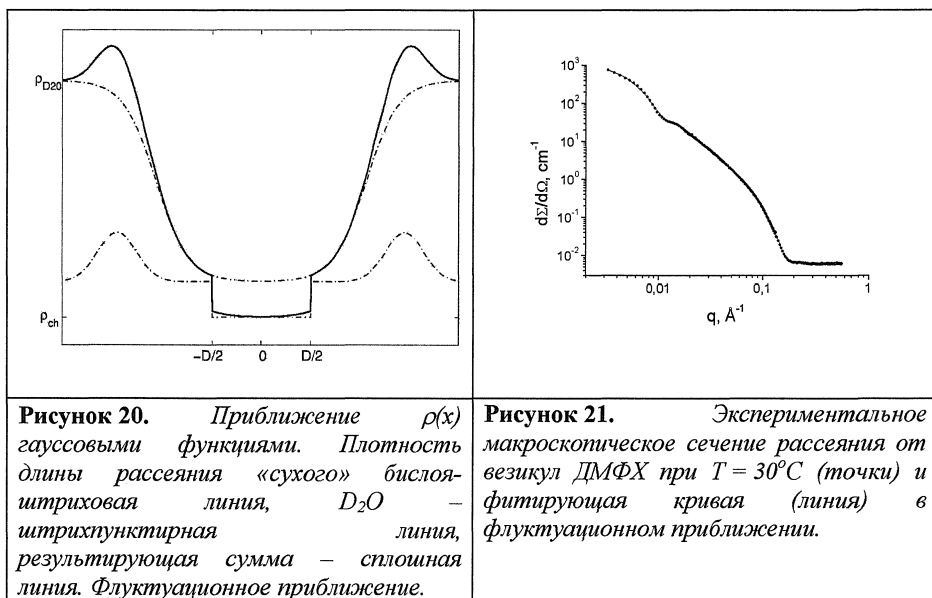
$$F_E(q, a) = \int_0^1 A_E^2 \left( q \cdot a \cdot \sqrt{1 + x^2 \cdot (\varepsilon^2 - 1)} \right) dx, \quad (9)$$

где

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

Липидная везикулярная система (популяция везикул) не является монодисперсной, а обладает полидисперсностью, описываемой распределением Шульца [6]. В расчетах учитывалась полидисперсность системы, вводились поправки на функцию разрешения спектрометра и учитывался вклад некогерентного рассеяния [22].

На основе уравнения (6) получено выражение для расчета толщины липидного бислоя в приближении Гинье  $d_G$  и проанализированы методические условия оптимальных измерений. Показана эффективность применения дисахаридов для контрастирования рентгеновского рассеяния в малоугловых экспериментах и уменьшения полидисперсности везикул. По сравнению с водой, интенсивность рассеяния рентгеновских лучей при 40% концентрации сахарозы увеличивается в 100 раз. Исследования различными методами (малоугловым рассеянием нейтронов и рентгеновских лучей, дифференциальной сканирующей калориметрией, рамановской спектроскопией и динамическим рассеянием света) показали, что влияние дисахаридов на структуру мембраны незначительно, в то время как время жизни везикул увеличивается [7, 8, 11, 12, 17, 40].



Метод разделенных формфакторов позволил впервые провести анализ структуры бислоя везикул на основе применения гауссовых функций для описания положения молекулярных групп и функции распределения воды в бислое [15]. Результаты расчетов плотности длины рассеяния нейтрона  $\rho(x)$  представлены на рис. 20, а

экспериментальный спектр и описывающая его расчетная кривая - на рис. 21. Полученные результаты демонстрируют, что вода проникает через липидный бислой.

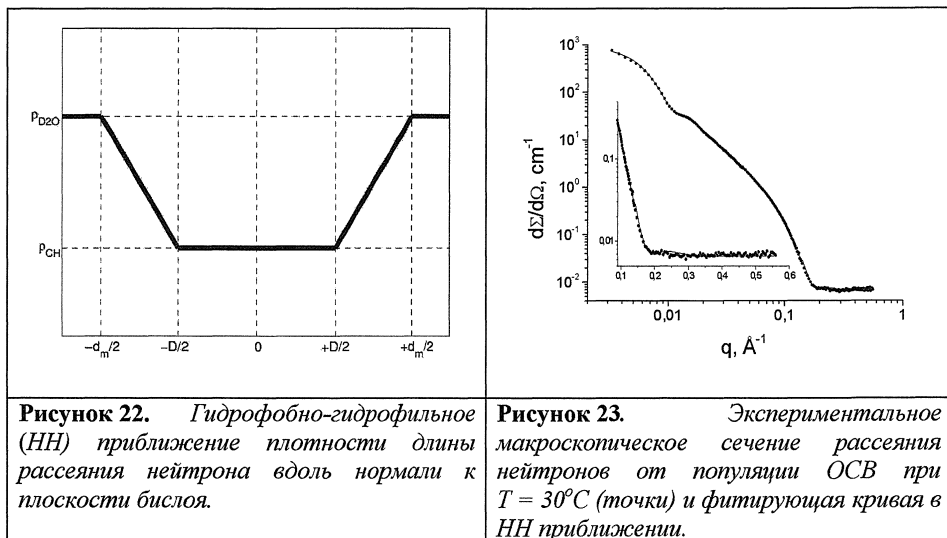


Рис. 20 демонстрирует, что плотность распределения длины рассеяния нейтрона от молекул  $\text{D}_2\text{O}$  является главной компонентой результирующей функции  $\rho(x)$ . Полученный вид функции  $\rho(x)$  является базой для формулирования гидрофобно-гидрофильного (ГГ) приближения для описания функции  $\rho(x)$ , представленного на рис. 22. Применение РФФ метода в сочетании с ГГ приближением позволило с высокой точностью описать структуру везикул ДМФХ в  $L_\alpha$  фазе [22]. Результаты представлены в табл. 5, а экспериментальный спектр и расчетная кривая представлены на рис. 23. Толщина липидного бислоя  $d_m$  зависит от его радиуса кривизны и превышает значение толщины плоского бислоя  $d_m = 44.2 \text{ \AA}$  [36S]. Количество молекул воды  $N_w$  и площадь поверхности  $A$  на молекулу ДМФХ также отличаются от их значений для плоского бислоя:  $N_w = 7.2$  и  $A = 59.6 \text{ \AA}^2$  [36S]. Нами доказано, что гидратация и толщина изогнутого липидного бислоя больше, чем гидратация и толщина плоского бислоя [22]. Исследования везикул в  $L_{\beta'}$  и  $P_{\beta'}$  фазах показали, что форма везикул изменяется при понижении температуры из приблизительно сферической в  $L_\alpha$  фазе ( $\epsilon=1.1$ ) в существенно эллиптическую в  $P_{\beta'}$  фазе ( $\epsilon=1.6$ ). При этом, в  $L_{\beta'}$  фазе значения  $d_m = 49.6 \pm 0.5 \text{ \AA}$  и  $A = 49.2 \pm 0.9 \text{ \AA}^2$  для  $1000 \text{ \AA}$  экструдированных везикул больше соответствующих значений  $d_m = 48.2 \text{ \AA}$  и  $A = 47 \text{ \AA}^2$  для плоских мембран. Усредненные

данные для  $P_{\beta}$  фазы сравнить не с чем, так как усредненная структура бислоя ДМФХ в этой фазе была определена впервые для однослойных везикул.

**Таблица 5.** Результаты расчетов для везикул ДМФХ в  $L_{\alpha}$  фазе ( $T=30^{\circ}C$ ), сделанных на основе НН приближения  $\rho(x)$ .  $D_F$  – диаметр пор используемых при экструдировании,  $\langle a \rangle$  – среднее значение малой полуоси вытянутого эллипсоида вращения,  $\varepsilon$  – отношение полуосей,  $\langle R \rangle$  – средний радиус везикул для  $\varepsilon \equiv 1$ ,  $\sigma$  – полидисперсность везикул,  $d_m$  – толщина мембраны (липидного бислоя),  $D$  – толщина гидрофобной части липидного бислоя,  $N_w$  и  $A$  – соответственно количество молекул воды и площадь мембранной поверхности на одну молекулу ДМФХ.

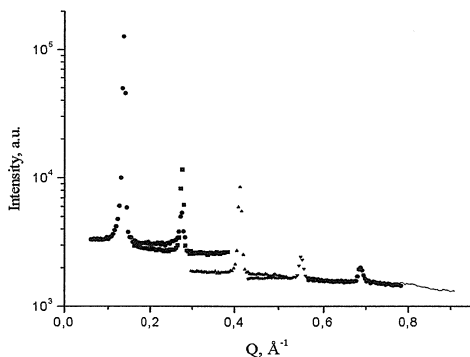
$D_F, \text{ \AA}$	$\langle R \rangle, \text{ \AA}$ или $\langle a \rangle, \text{ \AA}$	$\varepsilon$	$\sigma, \%$	$d_m, \text{ \AA}$	$D, \text{ \AA}$	$N_w$	$A, \text{ \AA}^2$
500	266±2	1.11±0.02	26	48.9±0.2	19.9±0.4	12.8±0.3	60.7±0.5
1000	450*	1	48	45.5±0.6	20.8±0.4	10.8±0.4	62.6±1.0

\* $\langle R \rangle = 450 \text{ \AA}$ ,  $\varepsilon = 1$  по данным динамического рассеивания света [35S].

## Глава 6. Структура и свойства модельных мембран липидной матрицы *stratum corneum* (SC).

Глава 6 посвящена исследованиям структуры и свойств модельных мембран липидной матрицы SC методами дифракции нейтронов и рентгеновских лучей. Наиболее важные результаты были получены в нейтронных дифракционных экспериментах на модельных мембранах SC, ориентированных на кварцевых подложках. § 6.1 посвящен описанию эксперимента, расчетам разрешения фурье синтеза плотности распределения длины рассеяния нейтрона, а также точности определения периода повторяемости модельных мембран SC.

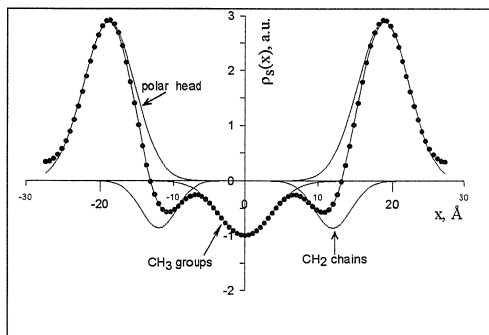
В § 6.2 изложены результаты исследований структуры модельных мембран SC. На рис. 24 представлен дифракционный спектр от мембраны с составом *церамид 6/холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина* с соотношением компонент 55/25/15/5 (базовая мембрана). Период повторяемости мембраны равен  $45.68 \pm 0.05 \text{ \AA}$  при  $RH = 60\%$ ,  $8\% D_2O$  и  $T = 32^{\circ}C$ . Вариация соотношения  $H_2O/D_2O$  в гидратирующих парах воды позволяет в нейтронном дифракционном эксперименте определить знаки структурных факторов  $F_k$  и выполнить синтез распределения плотности длины рассеяния нейтрона (в относительных единицах) по интенсивностям нескольких дифракционных пиков в соответствии с выражением [36S]



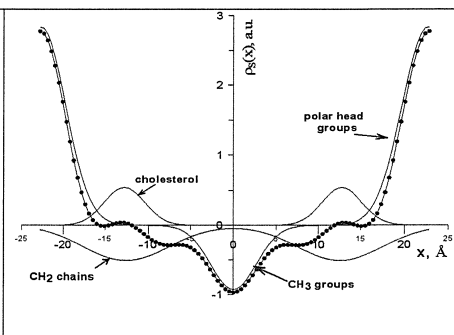
**Рисунок 24.** Кривые качания, измеренные при шести различных угловых положениях детектора (7, 11.2, 16.8, 22.4, 28, 33.6 градусов), для мембраны CER6 /Ch /PA /ChS с соотношением компонент 55/25/15/5. Влажность 60%, 8% D<sub>2</sub>O, T = 32°C

$$\rho_s(x) = \frac{2}{d} \cdot \sum_{h=1}^{h_{\max}} F_h \cdot \cos\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot h \cdot x}{d}\right) \quad (11)$$

Для базовой мембраны  $h_{\max}=5$ , что соответствует пространственному разрешению  $\Delta x=5.5 \text{ \AA}$ . Рассчитанные значения функции  $\rho_s(x)$  (фурье профили) и фитирующие модельные кривые для фосфолипидной мембраны ДМФХ представлены на рис. 25, а для базовой модельной мембраны SC на рис. 26 [18].



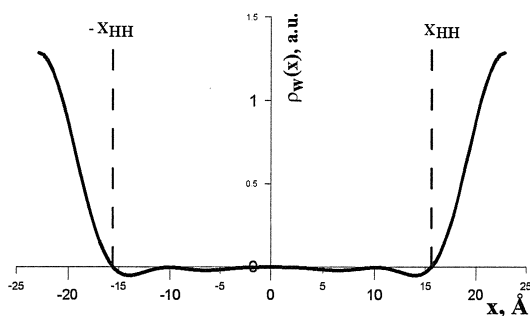
**Рисунок 25.** Распределение плотности длины рассеяния нейтрона  $\rho_s(x)$  в многослойной мембране ДМФХ при RH = 60%, T=32°C и 8% содержании D<sub>2</sub>O (точки) и расчетные кривые (сплошная линия). Стрелки показывают положение трех молекулярных групп: CH<sub>3</sub> группы, CH<sub>2</sub> цепочки и группы полярных голов.



**Рисунок 26.** Распределение плотности длины рассеяния нейтрона  $\rho_s(x)$  в многослойной мембране CER6 /Ch /PA /ChS=55/25/15/5 при RH = 60%, T=32°C и 8% D<sub>2</sub>O (точки) и расчетные кривые (сплошная линия). Стрелки показывают положение четырех молекулярных групп.



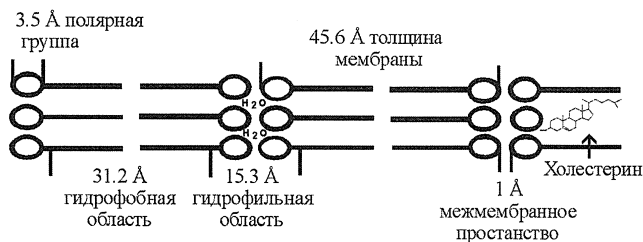
Видно, что структура базовой мембраны SC существенно отличается от фосфолипидных мембран. Главное отличие заключается в чрезвычайно малом межмембранном пространстве, то есть низкой гидратации мембраны. Применение вариации контраста (измерения с 8%, 20% и 50% D<sub>2</sub>O в парах воды) позволили восстановить из фурье профилей функцию распределения воды и определить гидрофобно-гидрофильную границу мембраны (см. рис. 27). В отличие от гидратации межмембранного пространства, внутренняя гидратация бислоя модельной мембраны SC аналогична фосфолипидам. Полученные на основе фурье анализа и экспериментов по исследованию набухания мембраны структурные данные представлены схематично на рис. 28 и в таблице 6. Структура базовой мембраны слабо зависит от вариации компонент и остается практически неизменной при замене пальмитоновой кислоты смесью жирных кислот, с составом близким к составу нативной мембраны SC [39].



**Рисунок 27.** Функция распределения  $\rho_w(x)$  воды в направлении нормали к поверхности мембраны CER6 /Ch /PA /ChS с весовым соотношением компонент 55/25/15/5 при RH = 60%, T = 32°C. Гидрофобно-гидрофильная граница обозначена пунктирной линией  $X_{HNN} = 15.6 \pm 0.1 \text{ \AA}$ .

**Таблица 6.** Структурные параметры мембраны CER6 /Ch /PA /ChS с весовым соотношением компонент 55/25/15/5 (базовая мембрана) при полной гидратации и T = 32°C. d – период повторяемости, d<sub>m</sub> – толщина мембраны, d<sub>w</sub> – толщина межмембранного пространства, d<sub>hydrophilic</sub> – толщина гидрофильного слоя, d<sub>hydrophobic</sub> – толщина гидрофобной части бислоя, d<sub>PH</sub> – толщина области полярных голов.

d, Å	d <sub>m</sub> , Å	d <sub>w</sub> , Å	d <sub>hydrophilic</sub> , Å	d <sub>hydrophobic</sub> , Å	d <sub>PH</sub> , Å
46.45±0.03	45.63±0.04	0.82±0.07	7.22±0.24	31.2±0.2	3.46±0.01



**Рисунок 28.** Структура мембраны CER6 /Ch /PA /ChS с соотношением компонент 55/25/15/5 при полной гидратации и T = 32°C.

Кинетика набухания базовой мембраны в избытке воды достаточно медленная что позволяет проводить исследования диффузии воды в реальном времени [18, 39]. Происходящее при этом увеличение периода повторяемости мембраны может быть описано выражением

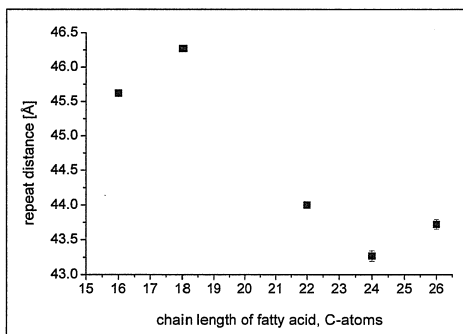
$$\Delta d = \Delta d_0 \cdot \left( 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right). \quad (12)$$

Здесь  $\Delta d_0$  – максимальное увеличение периода повторяемости, устанавливаемое по завершению набухания мембраны. Увеличение периода повторяемости мембраны (набухание) происходит за счет диффузии воды из объемного раствора в межмембранное пространство. Описание экспериментальных данных функцией (12) позволило определить характерное время процесса  $\tau=93\pm 6$  мин [12]. Замена пальмитиновой кислоты на смесь из 6 жирных кислот (FFA) ускоряет процесс диффузии. Для мембраны с составом 55% CER6 /20% Ch /15% FFA /10% ChS характерное время  $\tau=61\pm 2$  мин [39]. Отличие структуры базовой мембраны от мембраны со смесью 6 кислот заключается в наличии второй фазы. Базовая мембрана является однофазной системой. Мембраны, построенная на основе смеси шести кислот, также как и мембраны, построенные на основе свободных жирных кислот с длиной углеводородных цепочек больше 16, являются двухфазными системами [31]. Наличие дефектов на границах раздела фаз приводит к ускорению диффузии воды. Приведенные результаты демонстрируют, что даже слабое проявление второй фазы в модельной мембране SC приводит к существенному ускорению диффузии воды: характерное время гидратации  $\tau$  уменьшается от  $93\pm 6$  мин до  $61\pm 2$  мин. Отсюда следует вывод о важности многофазности липидной матрицы SC для липофильной диффузии лекарств через кожу.

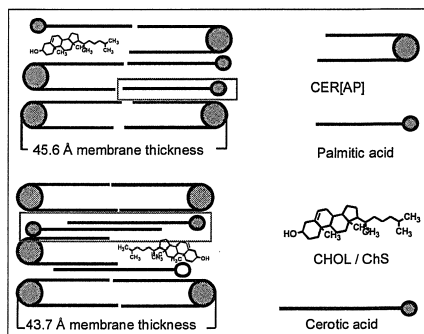
Низкая гидратация межмембранного пространства модельной мембраны липидной матрицы SC является существенным отличием этой мембраны от фосфолипидных мембран, в которых межмембранное пространство составляет от 8 до 20 Å. Толщина межмембранного пространства мембраны SC практически равна нулю при 60% влажности. Такая структура многослойной мембраны является результатом сверхсильного межмембранного взаимодействия, создаваемого молекулами церамида 6 [25]. 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 [31].

Применение длинноцепочечных жирных кислот должно было привести в увеличению периода повторяемости мембраны. Однако результаты экспериментов, представленные на рис. 29, показали, что при увеличении длины молекулы кислоты происходит уменьшение периода повторяемости и толщины мембраны. При этом, также как и в случае пальмитиновой кислоты, фурье профили плотности длины рассеяния нейтронов демонстрируют чрезвычайно малое межмембранное пространство.

Введение в состав мембраны молекул жирных кислот, с длиной углеводородной цепочки более 16, не может разрушить сверхсильное межмембранное взаимодействие создаваемое керамидом 6 и поэтому длинные углеводородные цепочки жирных кислот начинают проникать в углеводородное пространство соседнего монослоя как изображено на рис. 30 для случая цертовой 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. Окончательное доказательство проникновения длинных жирных кислот в соседний монослой было выполнено с применением дейтерированных жирных кислот [35, 36].



**Рисунок 29.** Зависимость периода повторяемости модельной мембраны SC от длины углеводородной цепочки жирной кислоты, выраженной количеством атомов углерода в ней, C. Для пальмитиновой кислоты C=16 (базовая мембрана).



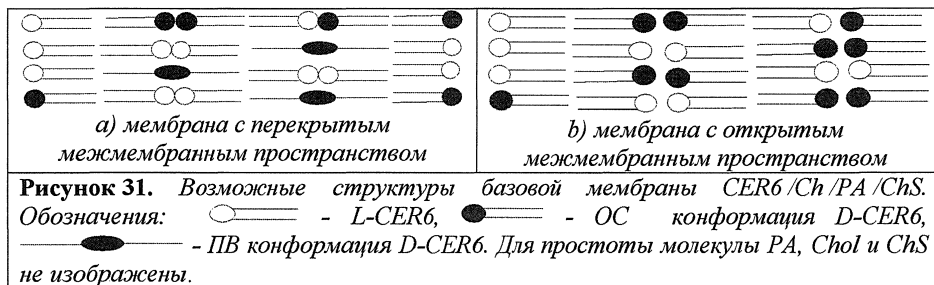
**Рисунок 30.** Структура модельной мембраны SC с пальмитиновой и цертовой кислотами. Углеводородные цепочки молекул цертовой кислоты проникают в соседний монослой мембраны. CER6 обозначен как CER[AP].

Следующим шагом в экспериментальном доказательстве явления сверхсильного межмембранного взаимодействия, создаваемого керамидом 6 в липидной матрице, было исследование структуры мембран, построенных с введением в их состав длинноцепочечного керамида 1. Была изготовлена многослойная мембрана с составом

церамид 1/церамид 6/холестерин/бегеновая кислота с весовым соотношением компонент 23/ 10/ 33/ 33. Исследования её структуры методом дифракции нейтронов показали, что толщина липидного бислоя такой мембраны 47.5 Å близка к толщине базовой мембраны - 45.6Å [33, 35]. Длина жирнокислотного остатка молекулы CER1 превышает на 30 атомов углерода длину жирнокислотного остатка молекулы CER6, что соответствует примерно 37 Å. Основным выводом проведенных исследований является то, что молекулы длинноцепочечного церамида не могут разрушить сверхсильное взаимодействие, создаваемое молекулами церамида 6, и создать длиннопериодную фазу с периодом повторяемости 130Å.

Совокупность результатов структурных исследований модельных мембран SC, позволяет сформулировать модель арматурного укрепления мембраны SC молекулами церамида 6, которая заключается в следующем:

- Молекулы церамида 6 вызывают сверхсильное межмембранное взаимодействие, которое объясняет практически нулевое расстояние между липидными бислоями в модельных мембранах кожи. Введение в систему длинноцепочечных церамидов и жирных кислот не может разрушить этого взаимодействия.
- Мембраны на основе церамида 6 в избытке воды при низких значениях pH=6-7, находятся в кристаллической  $L_c$  фазе.



Важным является вопрос об экспериментальном доказательстве расположения молекулы церамида 6 в полностью вытянутой (ПВ) конформации, как изображено на рис. 31а. Представленные нейтронные дифракционные эксперименты не могут ответить на вопрос о конформации молекул церамида 6 в липидной мембране. Мембрана с открытым межмембранным пространством и мембрана с перекрытым межмембранным пространством удовлетворяют экспериментально измеренным профилям распределения плотности длины рассеяния нейтрона. Эксперименты,

выполненные группой J.A. Bouwstra в 2011 году с применением дейтерированного керамида 2 также не смогли отличить две возможные организации модельной мембраны SC, представленные на рис. 31 [38S]. Таким образом, вопрос об экспериментальном доказательстве роли ПВ конформации молекул керамидов в формировании сверхсильного межмембранного взаимодействия остается открытым.

### **Основные результаты и выводы:**

**1. Установлено явление дегидратации межмембранного пространства фосфолипидных мембран молекулами диметилсульфоксида.** Диметилсульфоксид вызывает удаление свободной воды из межмембранного пространства фосфолипидных липосом. При мольной фракции диметилсульфоксида 0.14, только связанная вода существует в межмембранном пространстве, что приводит к уменьшению толщины межмембранного пространства и увеличению температуры фазового перехода мембраны.

**2. Сформулированы принципы увеличения проницаемости липидных мембран под действием диметилсульфоксида.** Диметилсульфоксид развивают доменную структуру фосфолипидных мембран, увеличивая дефекты в латеральной структуре мембраны. Создаются условия для формирования липофильной диффузии.

**3. Уточнена последовательность морфологических преобразований в процессе самосборки липидного бислоя в смешанных липид/детергентных системах:**

- С применением сильных магнитных полей доказано, что последней структурой перед самосборкой липидного бислоя в смешанных системах фосфолипид/детергент является гауссов клубок стержнеобразных мицелл.
- Показано, что быстрый нагрев ( $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) смешанной системы ДМФХ/холат натрия с соотношением компонент 15мМ/8мМ приводит к созданию однослойных монодисперсных везикул с радиусом 225Å.

**4. Установлено однозначное соответствие между образованием  $L_{\beta}$  фазы и увеличением проницаемости мембраны при концентрации этанола 1.2 М для однослойных везикул ДПФХ.**

**5. Создан метод разделенных формфакторов для определения структуры однослойных липидных везикул – переносчиков лекарств в малоугловых нейтронных и синхротронных экспериментах.**

## 6. Методом разделенных формфакторов в МУРН экспериментах на однослойных везикулах ДМФХ впервые определены:

- **Функция распределения воды в изогнутом бислое.** Функция распределения воды демонстрирует проницаемость бислоя для воды в  $L_\alpha$  фазе.
- **Структура липидного бислоя однослойной везикулы в трех фазовых состояниях:  $L_\beta$ ,  $P_\beta$ ,  $L_\alpha$ .** Для везикул, приготовленных экструзией через поры диаметром  $500 \text{ \AA}$ , определены: форма везикулы; средний размер и полидисперсность размера; толщина бислоя; толщина гидрофобной части бислоя; количество молекул воды, проникающих в гидрофильную область и в область полярных групп; площадь мембраны, приходящаяся на одну молекулу ДМФХ.
- **Зависимость структуры липидного бислоя в  $L_\alpha$  фазе от его кривизны.** Показано, что толщина липидного бислоя  $d_m$  и его гидратация  $N_w$  уменьшаются с увеличением радиуса везикулы  $R$ :  $d_m=48.9\pm 0.9 \text{ \AA}$  и  $N_w = 12.8\pm 0.3$  для  $R\approx 250 \text{ \AA}$ ;  $d_m=45.5\pm 0.6 \text{ \AA}$  и  $N_w = 10.8\pm 0.4$  для  $R\approx 500 \text{ \AA}$ ;  $d_m=44.2 \text{ \AA}$ ,  $N_w = 7.2$  для  $R=\infty$ .

7. Впервые дифракция нейтронов с пространственным разрешением  $5.5 \text{ \AA}$  была применена для исследования структуры и свойств модельных липидных мембран верхнего слоя кожи *stratum corneum* (SC). Применение дифракции нейтронов позволило решить фазовую проблему и достоверно рассчитывать распределение плотности длины рассеяния нейтрона в модельной липидной мембране. Для модельных мембран SC различного состава определены: толщина липидного бислоя, толщина гидрофобной части бислоя, толщина области полярных голов, функция распределения воды, положение молекул холестерина, положение дейтерированных меток в липидных молекулах.

## 8. Разработана модель арматурного укрепления липидной матрицы SC молекулами церамида 6.

Молекулы церамида 6 вызывают сверхсильное межмембранное взаимодействие, которое объясняет практически нулевое расстояние между липидными бислоями в модельных мембранах кожи. Введение в систему длинноцепочечных церамидов и жирных кислот не может разрушить этого взаимодействия.

**9. Гидрофильная диффузия лекарств через липидную матрицу SC неперспективна. Наиболее перспективным увеличением проницаемости кожи является поиск веществ, усиливающих липофильную диффузию лекарств.**

Низкая гидратация и малое межмембранное пространство (1 Å) мембран на основе церамида 6 делает гидрофильную диффузию лекарств через липидную матрицу SC затруднительной. Для усиления липофильной диффузии следует применять вещества увеличивающие дефекты в мембранной поверхности. Одним из путей увеличения дефектов является образование мембран с развитой доменной структурой. Таким свойством обладает ДМСО – жидкость, нанесение которой на кожу увеличивает её проницаемость.

**Публикации по теме диссертации:**

1. M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, C. Grabiell-Madelmond, M. Ollivon. DMSO-induced dehydration of DPPC membranes studied by X-ray diffraction, small-angle neutron scattering and calorimetry. *J. Alloys and Compounds* 286 (1999) 195-202.
2. S. N. Shashkov, M. A. Kiselev, S. N. Tioutiounnikov, A. M. Kisselev, P. Lesieur. The study of DMSO/water and DPPC/DMSO/water system by means of the X-Ray, neutron small-angle scattering, calorimetry and IR spectroscopy. *Physica B* 271 (1999) 184-191.
3. P. Lesieur, M.A. Kiselev, L.I. Barsukov, D. Lombardo. Temperature induced micelle to vesicle transition: kinetic effects in the DMPC / NaC system. *J. Appl. Cryst.* 33 (2000) 623-627.
4. M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, M. Olivon. Ice Formation in Model Biological Membranes in the Presence of Cryoprotectors. *Nucl. Inst&Method. A* 448 (2000a) 255-260.
5. T. Gutberlet, M. Kiselev, H. Heerklotz, G. Klose. SANS Study of Mixed POPC/C<sub>12</sub>E<sub>n</sub> Aggregates. *Physica B: Condensed Matter* 276-278 (2000) 381-383.
6. H. Schmiedel, P. Joerchel, M.Kiselev, G. Klose. Determination of Structural Parameters and Hydration of Unilamellar POPC/C<sub>12</sub>E<sub>4</sub>-Vesicles at high Water Excess from Neutron Scattering Curves Using a Novel Method of Evaluation. *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 111-117.
7. M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, D. Lombardo, M. Killany, S. Lesieur, M. Ollivon. A sucrose solutions application to the study of model biological membranes. *Nucl. Inst&Method A* 470 (2001) 409-416.

8. M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, D. Lombardo, M. Killany, S. Lesieur. Sucrose solutions as prospective medium to study the vesicle structure: SAXS and SANS study. *J. Alloys and Compounds* 328 (2001) 71-76.
9. M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, D. Lombardo, V.L. Aksenov. Model of separated form factors for unilamellar vesicles. *Applied Physics A* 74 Suppl. (2002) S1654-S1656.
10. M.A. Kiselev, M. Janich, P. Lesieur, A. Hoell, J. Oberdisse, J. Pepy, A.M. Kisselev, I.V. Gapienko, T. Gutberlet, V.L. Aksenov. DMPC vesicles and mixed DMPC/C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> micelles orientation in strong magnetic fields. *Applied Physics A* 74 (2002) S1239-S1241.
11. М.А. Киселёв, П. Лёзи, А.М. Киселёв, Д. Ломбардо, М. Оливо. Влияние сахарозы на структуру и свойства мембран димиристоилфосфатидилхолина. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования* 7 (2002) 63-66.
12. M.A. Kiselev, S. Wartewig, M. Janich, P. Lesieur, A.M. Kiselev, M. Ollivon, R. Neubert. Does sucrose influence the properties of DMPC vesicles? *Chemistry and Physics of Lipids* 123 (2003) 31-44.
13. М.А. Киселёв, Д. Ломбардо, А.М. Киселёв, П. Лёзи, В.Л. Аксёнов. Исследования структурного фактора однослойных везикул димиристоилфосфатидилхолина методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования* 11 (2003) 20-24.
14. M. Dyck, P. Kruger, A. Bettio, A.G. Beck-Sickinger, M. A. Kiselev, M. Losche. Adsorption of small molecules on lipid surface monolayers. In: *Lecture Notes in Physics: Molecules in interaction with surfaces and interfaces.*, Vol. 634, Eds.: R. Haberlandt, D. Michel, A. Pöpl, and R. Stannarius, Springer, New York (2004), 429-437.
15. M.A. Kiselev, E.V. Zemlyanaya, V.K. Aswal. SANS study of unilamellar DMPC vesicles: Fluctuation model of a lipid bilayer. *Crystallography Reports* 49 Suppl 1 (2004) s136-s141.
16. M.A. Kiselev, T. Gutberlet, P. Lesieur, T. Hauss, M. Ollivon, R.H.H. Neubert. Properties of ternary phospholipid / dimethyl sulfoxide / water systems at low temperatures. *Chemistry and Physics of Lipids* 133(2005) 181-193.
17. M.A. Kiselev, J. Zbytovska, D. Matveev, S. Wartewig, I. V. Gapienko, J. Perez, P. Lesieur, A. Hoell, R. Neubert. Influence of trehalose on the structure of unilamellar DMPC vesicles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 256 (2005) 1-7.



18. M. A. Kiselev, N. Yu. Ryabova, A. M. Balagurov, S. Dante, T. Hauss, J. Zbytovska, S. Wartewig, R. H. H. Neubert. New insights into structure and hydration of stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. *European Biophys. J.* 34 (2005) 1030–1040.
19. Zbytovska J., M.A. Kiselev, S. S. Funari, V. Garamus, S. Wartewig, R. Neubert. Influence of phytosphingosine-type ceramides on the DMPC membrane structure. *Chemistry and Physics of Lipids* 138 (2005) 69-80.
20. М.А. Киселев, Н.Ю. Рябова, А.М. Балагуров, Д. Отто, С. Данте, Т. Хаусс, З. Вартевиц, Р. Нойберт. Влияние церамида 6 на структуру и гидратацию мембраны дипальмитоилфосфатидилхолина. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 6* (2006) 30-37.
21. М.А. Киселев, А.М. Киселев, Ш. Борбели, П. Лёзи. Исследования проникновения этанола через модельную биологическую мембрану методом малоуглового рассеяния нейтронов. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 6* (2006) 67-73.
22. M.A. Kiselev, E.V. Zemlyanaya, V.K. Aswal, R.H.H. Neubert. What can we learn about the lipid vesicle structure from the small angle neutron scattering experiment? *European Biophys. J.* 35 (2006) 477-493.
23. E.V. Zemlyanaya, M.A. Kiselev, J. Zbytovska, L. Almasy, V.K. Aswal, P. Strunz, S. Wartewig, R.H.H. Neubert. Numerical analysis of the unilamellar vesicle structure based on the SANS data. *Crystallography Reports* 51 Suppl.1 (2006) s22-s26.
24. М.А. Киселев. Комбинированное применение нейтронного и синхротронного излучения для исследования влияния диметилсульфоксида на структуру и свойства везикул из дипальмитоилфосфатидилхолина. *Кристаллография* 52 (2007) 554-559.
25. М.А. Киселев. Конформация молекул церамида 6 и chain-flip переходы в липидной матрице верхнего слоя кожи - Stratum Corneum. *Кристаллография* 52 (2007) 549-553.
26. D. Kessner, A.Ruettinger, M.A. Kiselev, S.Wartewig, R.H.H.Neubert. Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure. A review, Part II: Stratum corneum lipid mixtures. *Skin Pharmacology and Physiology* 21 (2008) 58-74.
27. M.A. Kiselev, E. V. Zemlyanaya, N.Y. Ryabova, T. Hauss, S. Dante, D. Lombardo. Water distribution function across the curved lipid bilayer: SANS study. *Chemical Physics* 345 (2008) 185-190.

28. M.A. Kiselev, D. Lombardo, P. Lesieur, A.M. Kiselev, S. Borbely, T. N. Simonova, L.I. Barsukov. Membrane Self Assembly in Mixed DMPC/NaC Systems by SANS. *Chemical Physics* 345 (2008) 173-180.
29. M.A. Kiselev, T. Gutberlet, A. Hoell, V.L. Aksenov, D. Lombardo. Orientation of the DMPC unilamellar vesicle system in the magnetic field: SANS study. *Chemical Physics* 345 (2008) 181-184.
30. J. Zbytovska, M.A. Kiselev, S.S. Funari, V.M. Garamus, S. Wartewig, K. Palat, R. Neubert. Influence of cholesterol on the structure of stratum corneum lipid model membrane. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 328 (2008) 90-99.
31. A. Ruettinger, M.A. Kiselev, Th. Hauss, S. Dante, A. Balagurov, R.H.H. Neubert. Fatty acid interdigitation in the stratum corneum model membranes: A neutron diffraction study. *European Biophys. J.* 37 (2008) 759-771.
32. D. Kessner, M. A. Kiselev, Th. Hauss, S. Dante, S. Wartewig, R.H.H. Neubert. Localisation of partially deuterated cholesterol in quaternary SC lipid model membranes. A neutron diffraction study. *European Biophys. J.* 37 (2008) 1051-1057.
33. D. Kessner, M.A. Kiselev, S. Dante, T. Hauss, P. Lersch, S. Wartewig, R.H.H. Neubert. Arrangement of ceramide[EOS] in a stratum corneum lipid model matrix –new aspects revealed by neutron diffraction studies. *European Biophys. J.* 37 (2008) 989-999.
34. Е.В.Земляная, М.А.Киселев, Р. Нойберт, И. Кольбрехер, В.Л. Аксенов. Исследования структуры и свойств модельных мембран верхнего слоя кожи методом малоуглового рассеяния нейтронов. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования* 11(2008) 14-19.
35. A. Schroeter, D. Kessner, M.A. Kiselev, Th. Hauss, S. Dante, R.N.N. Neubert. Basic nanostructure of CER[EOS]/ CER[AP]/ CHOL/ FFA multilamellar membranes. A neutron diffraction study. *Biophysical J.* 97 (2009) 1104-1114.
36. A. Schroeter, M.A. Kiselev, Th. Hauss, S. Dante, R.H.H. Neubert. Evidence of free fatty acid interdigitation in stratum corneum model membranes based on ceramide [AP] by deuterium labeling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2009) 2194-2203.
37. J. Zbytovska, K. Vavrova, M.A. Kiselev, P. Lesieur, S. Wartewig, R.H.H. Neubert. The effects of transdermal permeation enhancers on thermotropic phase behaviour of a stratum corneum lipid model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 351 (2009) 30-37.

38. М.А. Киселев, Е.В. Ермакова, Н.Ю. Рябова, О.В. Найда, А.В. Забелин, Д.К. Погорелый, В.Н. Корнеев, А.М. Балагуров. Структурные исследования липидных мембран на синхротронном источнике СИБИРЬ-2. *Кристаллография* 55 (2010) 503-509.
39. 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.* 39 (2010) 1167-1176.
40. М.А. Киселев. Методы исследования липидных наноструктур на нейтронных и синхротронных источниках. *ЭЧАЯ* 42 (2011) 578-635.

### **Цитируемая литература:**

- 1S. D.H. Rasmussen, A.P. MacKenzie. Phase diagram for the system water – dimethylsulfoxide. *Nature* 220 (1968) 1315-1317.
- 2S. Z.W. Yu, P.J. Quinn. Phase stability of phosphatidylcholines in dimethylsulfoxide solutions. *Biophys. J.* 69 (1995) 1456-1463.
- 3S. V.I. Gordeliy, M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.V. Pole, J. Teixeira. Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures. *Biophys. J.* 75 (1998) 2343-2351.
- 4S. Z.W. Yu, P.J. Quinn. Solvation effects of dimethyl sulfoxide on the structure of phospholipids bilayers. *Biophys. Chemistry* 70 (1998) 35-39.
- 5S. S. Tristram-Nagle, T. Moore, H.I. Petrache, J.F. Nagle. DMSO produces a new subgel phase in DPPC: DSC and X-ray diffraction study. *Biochem. Biophys. Acta* 1369 (1998) 19-33.
- 6S. F. Scholz, E. Boroske, W. Helfrich. Magnetic anisotropy of lecitin membranes. *Biophys. J.* 45 (1984) 589-592.
- 7S. F. Picard, M.J. Paquet, J. Levesque, A. Belanger, M. Auger. <sup>31</sup>P NMR first spectral moment study of the partial magnetic orientation of phospholipid membranes. *Biophys. J.* 77 (1999) 888-902.
- 8S. C. R. Sanders, J. H. Prestegard. Magnetically orientable phospholipid bilayers containing small amounts of a bile salt analogue, CHAPSO. *Biophys. J.* 58 (1990) 447-460.
- 9S. B.J. Hare, J.H. Prestegard, D.M. Engelman. Small angle X-ray scattering studies of magnetically oriented lipid bilayers. *Biophys. J.* 68 (1995) 1891-1896.
- 10S. R.P. Hjelm, P. Thiyagarajan., H.J. Alkan-Onyuksel. Organization of phosphatidylcholine and bile salt in rodlike mixed micelles. *Phys. Chem.* 96 (1992) 8653-8661.

- 11S. M.A. Long, E.W. Kaler, S.P. Lee, G.D. Wignall. Structural characterization of the micelle-vesicle transition in lecithin-bile salt solutions. *Biophys. J.* 67 (1994) 1733-1742.
- 12S. S.U. Egelhaaf, P. Schurtenberger. Shape transformations in the lecithin-bile salt system: from cylinders to vesicles. *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 8560-8573.
- 13S. J.S. Pedersen, S.U. Egelhaaf, P. Schurtenberger. Formation of polymerlike mixed micelles and vesicles in lecithin-bile salt solutions: a small-angle neutron scattering study. *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 99, 1299-1305.
- 14S. T.M. Weiss, T. Narayanan, C. Wolf, M. Gradzielski, P. Panine, S. Finet, W.I. Helsby. Dynamics of the self-assembly of unilamellar vesicles. *Phys. Rev. Letters* 94 (2005) 038303.
- 15S. Ю.В. Храпцов, Т.Н. Симонова, С.В. Суханов, Л.И. Барсуков. Термотропные структурные и фазовые переходы в смешанной системе димиристоилфосфатидилхолин - холат натрия по данным турбидиметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии. *Биофизика* 9 (2008) 138-149.
- 16S. M. Ollivon, S. Lesieur, C. Grabielle-Madellmont, M. Paternostre. Vesicle reconstitution from lipid -detergent mixed micelles. *Bioch. & Bioph. Acta* 1508 (2000) 34-50.
- 17S. J. Zeng, K. E. Smith, P. L.-G. Chong. Effect of alcohol-induced lipid interdigitation on proton permeability in L- $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Biophys. J.* 65 (1993) 1404-1414.
- 18S. K. Ohki, K. Tamura, I. Hatta. Ethanol induced interdigitated gel phase ( $L_{\beta 1}$ ) between lamellar gel phase ( $L_{\beta'}$ ) and ripple phase ( $P_{\beta'}$ ) in phosphatidylcholine membranes: a scanning density meter study. *Bioch. & Bioph. Acta* 1028 (1990) 215-222.
- 19S. U. Vierl, L. Lobbecke, N. Nagel, G. Cevc. Solute Effects on the Colloidal and Phase Behavior of Lipid Bilayer Membranes: Ethanol-Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures. *Biophys. J.* 67 (1994) 1067-1079.
- 20S. K. Lohner. Effect of small organic molecules on phospholipid phase transitions. *Chemistry and Physics of Lipids* 57 (1991) 341-362.
- 21S. J. Pencer, S. Krueger, C. Adams, J. Katsaras. Method of separated form factors for polydisperse vesicles. *J. Appl. Cryst.* 39 (2006) 1-11.
- 22S. В.А. Твердислов, А.Н. Тихонов, Л.В. Яковенко. Физические механизмы функционирования биологических мембран. *Москва, Московский университет* (1987).

- 23S. H. Schmiedel, P. Almsy L., G. Klose. Multilamellarity, structure and hydration of extruded POPC vesicles by SANS. *European Biophys. J.* 35 (2006) 181-189.
- 24S. J. Bouwstra, G. Pilgram, G. Gooris, H. Koerten, M. Ponc. New aspects of the skin barrier organization. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 14, suppl 1 (2001) 52-62.
- 25S. T. McIntosh. Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol. *Biophys J.* 85 (2003) 1675-1681.
- 26S. D. Groen, G.S. Gooris, D.J. Barlow, M.J. Lawrence, J.B. van Mechelen, J.A. Bouwstra. Disposition of ceramide in model lipid membranes determined by neutron diffraction. *Biophysical J.* 100 (2011) 1481-1489.
- 27S. Н.Ю. Рябова, М.А. Киселёв, А.М. Балагуров. Переходные процессы в модельных липидных мембранах Stratum corneum со смесью жирных кислот. *Биофизика* 54 (2009) 852-862.
- 28S. 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* 52 (2010) 984-991.
- 29S. Н.Ю. Рябова, М.А. Киселёв, А.М. Балагуров. Влияние холестерина и церамида VI на структуру многослойных липидных мембран при водном обмене. *Кристаллография* 55 (2010) 515-525.
- 30S. Д.И. Свергун, Л.А. Фейгин, Малоугловое рассеяние нейтронов и рентгеновских лучей. *Москва, Наука* (1986).
- 31S. M. Schalke, M. Losche. Structural models of lipid surface monolayers from X-ray and neutron reflectivity measurements. *Adv. Colloid&Interface Science* 88 (2000) 243-274.
- 32S. C. Grabielle-Madelmont, R. Perron. Calorimetric studies on phospholipid-water systems. II. Study of water behavior. *J. Colloid Interface Sci.* 95 (1983) 483-493.
- 33S. J. Zeng, K. E. Smith, P. L.-G. Chong. Effect of alcohol-induced lipid interdigitation on proton permeability in L- $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Biophys. J.* 65 (1993) 1404-1414.
- 34S. N.Kucerka, Y. Liu, N. Chu, H.I. Petrache, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle. Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using X-Ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles. *Biophys J.* 88 (2005) 2626-2637.
- 35S. F.R. Hallet, J. Watton, P. Krygsmann. Vesicle sizing. Number distributions by dynamic light scattering. *Biophys. J.* 59 (1991) 357-362.

- 36S. J.F Nagle, S. Tristram-Nagle. Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000) 159-195.
- 37S. Ю.Н. Овчинников. Биоорганическая химия. *Москва, Просвещение* (1987).
- 38S. D. Groen, G.S. Gooris, D.J. Barlow, M.J. Lawrence, J.B. van Mechelen, J.A. Bouwstra. Disposition of ceramide in model lipid membranes determined by neutron diffraction. *Biophysical J.* 100 (2011) 1481-1489.

Получено 10 августа 2011 г.

Отпечатано методом прямого репродуцирования  
с оригинала, предоставленного автором.

Подписано в печать 12.08.2011.

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

Усл. печ. л. 2,94. Уч.-изд. л. 3,0. Тираж 100 экз. Заказ № 57398.

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

E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)