

P3-2009-193

Н. Ю. Рябова\*, М. А. Киселев, А. М. Балагуров

ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА И ЦЕРАМИДА-VI  
НА СТРУКТУРУ МНОГОСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ  
МЕМБРАН ПРИ ВОДНОМ ОБМЕНЕ

Направлено в журнал «Кристаллография»

---

\* НИИЯФ МГУ

Рябова Н. Ю., Киселев М. А., Балагуров А. М.  
Влияние холестерина и церамида-VI на структуру  
многослойных липидных мембран при водном обмене

P3-2009-193

В работе представлены результаты нейтронного дифракционного эксперимента, полученные при изучении структурных изменений в многослойных липидных мембранах двойных систем ДПФХ/холестерин и ДПФХ/церамид-VI (ДПФХ — дипальмитоилфосфатидилхолин) в ходе процессов гидратации и дегидратации. Охарактеризовано влияние холестерина и церамида на кинетику водного обмена в мембране ДПФХ.

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

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2009

Ryabova N. Yu., Kiselev M. A., Balagurov A. M.  
Influence of Cholesterol and Ceramide-VI on Structure  
of the Multilamellar Lipid Membrane at Water Exchange

P3-2009-193

The results of neutron diffraction investigation of structure changes in multilamellar lipid membranes DPPC/cholesterol and DPPC/ceramide-VI (DPPC — dipalmitoylphosphatidylcholine) during the processes of hydration and dehydration are presented in this work. The influence of cholesterol and ceramide-VI on kinetic of water exchange in DPPC membrane is characterized.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2009

## ВВЕДЕНИЕ

Многослойные ориентированные липидные мембраны на подложках продолжают оставаться важным модельным объектом для изучения биофизических характеристик реальных биологических мембран. Их основные структурные характеристики, в число которых входят период повторяемости ламеллярной структуры, толщина липидного бислоя, размеры гидрофильной и гидрофобной областей, конформация углеводородных цепей и т.д., могут быть определены с помощью хорошо отработанных методов рентгеновской или нейтронной дифракции. Одним из актуальных вопросов является зависимость структурной организации мембраны от степени ее гидратации, т.е. от состояния водной прослойки между полярными областями липидных бислоев. Как правило, такого рода исследования выполняются в стационарных условиях, т.е. при фиксированном уровне влажности окружающей среды или же в избытке воды [1]. Дифракционные исследования кинетики водного обмена в липидных многослойных структурах уже проводились [2], но они ограничивались регистрацией изменений во времени структурного фактора только одного, наиболее интенсивного дифракционного пика, что не позволяло следить за изменениями структуры в ходе процесса. Недавно в наших нейтронных дифракционных экспериментах, выполненных на ориентированных мембранах, приготовленных из дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), удалось одновременно измерять несколько (до 5) порядков отражения от ламеллярных слоев, и это дало возможность проследить эволюцию внутренней структуры мембраны непосредственно в ходе кинетических процессов ее гидратации и дегидратации. Эксперименты были проведены на высокопоточном импульсном реакторе ИБР-2 (Дубна) по оригинальной методике (дифракция в реальном времени) и позволили помимо структурной информации получить данные о характерных временах процессов [3]. В продолжение этих исследований в настоящей работе представлены результаты аналогичных нейтронных дифракционных экспериментов с мембранами ДПФХ, в которые в определенном соотношении встраивались молекулы холестерина и церамида-VI. Эти молекулы оказывают значительное влияние на свойства и функционирование реальных биологических мембран клетки, что и обусловило их выбор. Кроме того, в работе представлены результаты по структуре ориентированной мембраны, приготовленной на основе тройной системы ДПФХ/церамид-VI/холестерин с мольным соотношением компонент 3:3:4.

## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН С ХОЛЕСТЕРИНОМ И ЦЕРАМИДОМ

Структура ориентированных многослойных мембран из ДПФХ при различной степени их гидратации хорошо изучена. При комнатной температуре и влажности окружающей среды 60 % липидный бислои находится в гель-фазе, характеризующейся хорошо упорядоченной конформацией углеводородных цепей, наклоненных относительно нормали к поверхности бислоя, периодом повторяемости в ламеллярном (перпендикулярном поверхности мембраны) направлении около 60 Å и толщиной водной прослойки между бислоями около 8 Å. Период ламеллярной структуры и толщина бислоя полностью гидратированной мембраны при 20 °С равны соответственно ~ 63,5 и ~ 48 Å [1].

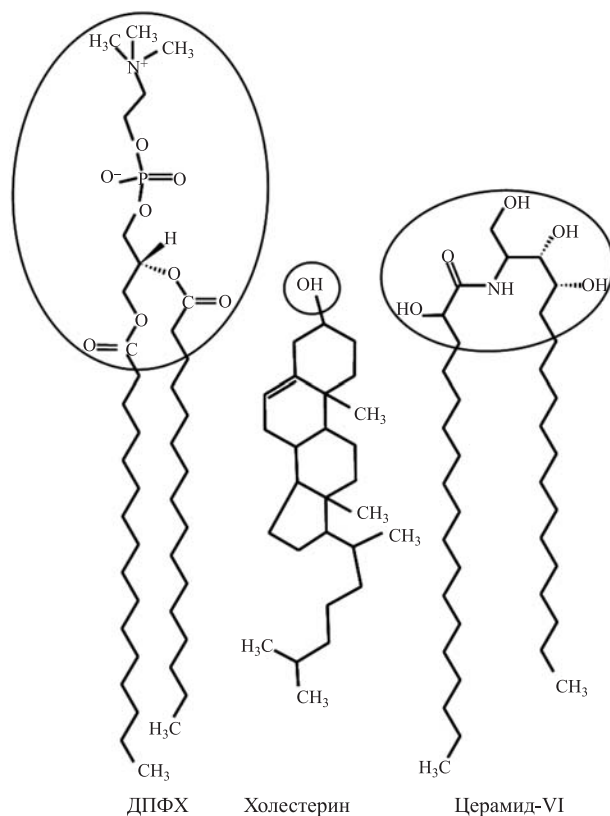


Рис. 1. Схематическое изображение молекул ДПФХ, холестерина и церамида-VI, состоящих из полярной головы (выделена круговой линией) и неполярных углеводородных цепей

Церамиды (рис. 1) являются основным компонентом липидной матрицы *stratum corneum* (SC), верхнего слоя эпидермиса млекопитающих, выполняющего барьерные функции кожи. Из-за низкой растворимости в воде и неспособности самоорганизовываться в липидный бислой керамиды исследуются либо в составе многокомпонентных систем, либо в смесях с фосфолипидами. Исследования ориентированной многослойной модельной мембраны SC керамид-VI/пальмитиновая кислота/холестерин/сульфат холестерина с весовым соотношением компонент 55/25/15/5 показали, что по сравнению с фосфолипидными мембранами гидратация этой системы в избытке воды идет очень медленно: характерное время набухания мембраны SC составляет 93 мин (для фосфолипидов  $\sim 1$  мин) [4]. В [4, 5] выдвинуто предположение о том, что основой медленной гидратации модельной мембраны SC и малого межмембранного пространства (около  $1 \text{ \AA}$  в гидратированной в избытке воды мембране по сравнению с  $\sim 16 \text{ \AA}$  в мембране ДПФХ) является полностью вытянутая конформация молекул керамид-VI, стягивающая соседние бислои до тесного контакта друг с другом. Исследование однослойных везикул этой же системы методом малоуглового рассеяния нейтронов и расчеты на основе разделенных формфакторов показали, что структура бислоя однослойных везикул отличается от структуры бислоев ориентированной мембраны [6]. Однослойные везикулы, в которых керамид-VI находится в односторонней конформации, способны образовывать кластеры при сферическом контакте везикул друг с другом за счет переворота углеводородной цепочки молекулы керамид, т. е. перехода керамид в полностью вытянутую конформацию. В [7], посвященной исследованию мембраны ДПФХ с 32 мол. % керамид-VI (одного из девяти типов керамидов липидной матрицы SC) при низком уровне относительной влажности, показано, что добавление керамид в мембрану значительно увеличивает толщину гидрофобной области бислоя и, наоборот, уменьшает толщину водной прослойки между бислоями. В [8] обнаружено, что молекулы керамид-VI увеличивают период повторяемости ( $d$ ) мембраны мультислойных и однослойных везикул димиристоилфосфатидилхолина, причем наблюдается линейная зависимость между  $d$  и мольной концентрацией керамид до 25 %.

В смесях фосфолипида и холестерина при высоких концентрациях последнего была обнаружена фаза с высокой степенью упорядоченности углеводородных цепочек в жидкокристаллическом состоянии, названная жидкой упорядоченной фазой  $L_o$  (liquid ordered phase) [9]. Бислой в фазе  $L_o$  обладает свойствами, промежуточными между свойствами, характерными для бислоя в гель-фазе  $L_\beta$  и жидкокристаллической фазе  $L_\alpha$ . Рентгеновские исследования показали, что толщина липидного бислоя, находящегося в фазе  $L_o$ , является средней величиной между толщинами бислоя чистого фосфолипида в фазах  $L_\beta$  ( $\sim 48 \text{ \AA}$ ) и  $L_\alpha$  ( $\sim 39 \text{ \AA}$ ) [1, 10]. Согласно предложенной в [11] модели липидных плотов (lipid rafts), именно в фазе  $L_o$  находятся микро-

домены (плоты) липидного бислоя клеточной мембраны, обогащенные холестерином и церамидами, «плавающие» среди жидкого неупорядоченного бислоя фосфолипидов и служащие платформой для осуществления клеточных функций.

Для наиболее изученной двойной системы ДПФХ/холестерин построено несколько фазовых диаграмм, иногда существенно отличных друг от друга. Согласно диаграмме в [12], ниже температуры фазового перехода ( $\approx 38^\circ\text{C}$ ) система характеризуется сосуществованием жидкой упорядоченной  $L_o$ - и гелевой  $L_\beta$ -фаз при мольной концентрации холестерина  $5\% < x_{\text{хол}} < 22\%$  и наличием только жидкой упорядоченной фазы во всем температурном интервале при  $x_{\text{хол}} \geq 25\%$ . В рентгеновских дифракционных экспериментах на ориентированных образцах при относительной влажности 98% обнаружена новая модулированная фаза, обозначенная как  $P_\beta$ , с ламеллярной периодичностью около 65 Å, периодом в латеральном направлении и амплитудой модуляции соответственно  $\sim 70$  и 2,5 Å [13]. Углеводородные цепочки липидов в этой фазе перпендикулярны поверхности мембраны, толщина бислоя оценивается  $\sim 50$  Å. При температурах ниже температуры предперехода ( $34^\circ\text{C}$ ) к основному фазовому переходу система ДПФХ/холестерин при  $15\% < x_{\text{хол}} < 20\%$  находится в состоянии  $P_\beta$ , а при  $x_{\text{хол}} \geq 22\%$  — в жидком упорядоченном состоянии  $L_o$ . Следует отметить, что при построении фазовых диаграмм точное определение указанных граничных концентраций холестерина в этих работах не выполнялось.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОД

**Материалы и приготовление образцов.** Дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) и N-( $\alpha$ -гидроксооктадеcanoил)-фитосфингозин (церамид-VI) были синтезированы фирмой «Cosmoferm» (Нидерланды). Холестерин приобретен в фирме «Sigma-Aldrich» («Сигма-Алдрич», Россия), тяжелая вода (чистота 99,8%) — в фирме «Изотоп» (Санкт-Петербург). Кварцевые пластины «Spectrosil 2000» приобретены в компании «Saint-Gobain» (Германия).

При выборе соотношения компонент в двойных системах мы руководствовались стремлением получить однофазный образец с максимальной концентрацией холестерина и церамида. Были приготовлены образцы двойных систем ДПФХ/церамид-VI с мольным соотношением компонент 3:2, ДПФХ/холестерин с мольным соотношением компонент 4:1 и образец тройной системы ДПФХ/церамид-VI/холестерин с мольным соотношением компонент 3:3:4. Для получения образцов использовалась стандартная процедура приготовления ориентированной липидной мембраны на подложке [14]. Около 2,4 мл 10% раствора липидов в органическом растворителе (хлороформ/метанол в массовом отношении 2/1) выливалось на кварцевую пластину

площадью  $65 \times 25$  мм<sup>2</sup>. Образец высушивался при комнатной температуре и на 12 ч помещался в вакуум для удаления остатка растворителя. Для уменьшения мозаичности образец отжигали в горизонтальном положении при 100 % влажности паров воды и 80 °С.

**Измерение дифракционных спектров.** Измерение нейтронных дифракционных спектров по времени пролета проводилось на дифрактометре ДН-2, расположенном на импульсном реакторе ИБР-2. Подробное описание методики экспериментов приведено в работе [3].

Исследовалась кинетика изменения состояния мембраны ДПФХ/холестерин в случае ее гидратации при переходе из состояния с низкой относительной влажностью (RH) паров воды к состоянию с высокой влажностью и последующей дегидратацией при переходе обратно в состояние с низкой влажностью паров воды:

[70 % RH, 24 °С] → [98 % RH, 8 % D<sub>2</sub>O, 24 °С] → [58 % RH, 8 % D<sub>2</sub>O, 24 °С].

Для этого сухой образец двойной системы ДПФХ/холестерин из комнатных условий (70 % RH) помещался в алюминиевый контейнер объемом 2600 см<sup>3</sup>, внутри которого задавалась относительная влажность 98 % насыщенным раствором соли K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в воде с содержанием 8 % D<sub>2</sub>O. Нейтронограммы регистрировались двухкоординатным позиционно-чувствительным детектором при угле рассеяния  $2\theta = 11^\circ$  в течение  $\sim 350$  мин с постепенно увеличивающимся временем набора одного спектра от 30 до 60 мин. Регистрация первого спектра начиналась через 2 мин после помещения насыщенного раствора соли в измерительную камеру. После достижения образцом равновесного состояния, определяемого выходом значения периода повторения на неизменяемое значение, раствор соли K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> заменялся на насыщенный раствор NaBr, который задает 58 % относительную влажность паров воды. Процесс дегидратации мембраны регистрировался в течение  $\sim 320$  мин с постепенно увеличивающимся временем набора одного спектра от 10 до 60 мин. В случае двойной системы ДПФХ/церамид-VI исследовалась только кинетика гидратации мембраны при задании высокой влажности паров воды: [37 % RH, 18 °С] → [98 % RH, 8 % D<sub>2</sub>O, 18 °С]. Тройная система ДПФХ/церамид-VI/холестерин была измерена в равновесном состоянии при 20 °С и 58 % RH.

Измерение системы ДПФХ/церамид-VI при 58 % RH и 20 °С проводилось на дифрактометре V1 на стационарном источнике нейтронов BERII (BENSC, Берлин, Германия) [15].

**Анализ экспериментальных данных.** В дифракционных экспериментах на ориентированных на кварцевой подложке липидных мультислоях удается измерить интенсивности нескольких порядков отражения от периодической ламеллярной структуры. Определение структуры бислоев из дифракцион-

ных спектров проводится при анализе восстановленной с помощью стандартной процедуры фурье-преобразования экспериментальных структурных факторов проекции распределения плотности длины рассеяния нейтрона  $\rho_{\text{exp}}(z)$  (фурье-профиль) вдоль направления, перпендикулярного плоскости мембраны [16–18]:

$$\rho_{\text{exp}}(z) = \iint \rho(x, y, z) dx dy = a + b \sum_{h=1}^{h_{\text{max}}} F_h \cos\left(\frac{2\pi h z}{d_0}\right), \quad (1)$$

где  $h$  — индекс Миллера дифракционного пика (порядок отражения),  $d_0$  — период структуры. Значение модуля структурного фактора  $|F_h| = (L I_h)^{1/2}$  определяется из интегральной интенсивности  $I_h$  соответствующего дифракционного пика с учетом фактора Лоренца  $L$ , который при использовании метода времени пролета равен  $\sim \lambda^4$ . За нуль принят центр гидрофобной области бислоя. Константы  $a$  и  $b$  в уравнении (1) определяются из нормировки  $\rho_{\text{exp}}(z)$  с точностью до постоянного множителя при использовании значений плотности длины рассеяния нейтронов  $0,0085 \cdot 10^{-12} \text{ см}^{-2}$  для групп  $\text{CH}_3$  и  $0 \text{ см}^{-2}$  для межмембранной водной прослойки с содержанием  $\text{D}_2\text{O}$  8%. Период повторяемости мембраны  $d_0$  совпадает с положением первого дифракционного пика на шкале межплоскостных расстояний  $d$ . Знаки структурных факторов были определены с помощью процедуры изоморфного замещения  $\text{H}_2\text{O}$  на  $\text{D}_2\text{O}$  в наших предыдущих измерениях. Для системы ДПФХ/холестерин с мольным соотношением компонент 4:1 при обоих уровнях влажности паров воды знаки совпадают: «-», «-», «+», «-», «-» соответственно для  $h = 1, 2, 3, 4, 5$ . Структурные факторы системы ДПФХ/церамид-VI при относительной влажности 58% имеют знаки «-», «+», «+», «-» соответственно для порядков отражения  $h = 1, 2, 3, 4$ . Количественный анализ фурье-профиля проводился при его моделировании предложенной в [19] модельной функцией, являющейся суммой функций Гаусса, соответствующих молекулярной группе полярных голов, группам  $\text{CH}_2$  и  $\text{CH}_3$  углеводородных цепочек. Основными параметрами липидной мембраны, характеризующими ее внутреннюю структуру, являются толщина бислоя  $d_B$ , размер области углеводородных цепочек липидов  $d_C$  и ширина водной прослойки между полярными головами пространства  $d_W$ . Для расчета этих параметров используются параметры группы полярных голов — ее положение и ширина, которые определяются из найденных положения  $z_{\text{ph}}$  и полной ширины на половине высоты  $F_{\text{ph}}$  функции Гаусса, соответствующей этой молекулярной группе:

$$d_B = 2(z_{\text{ph}} + F_{\text{ph}}/2), \quad d_C = 2(z_{\text{ph}} - F_{\text{ph}}/2).$$

Толщина слоя воды рассчитывается как разница величин периода повторяемости мембраны и толщины бислоя:  $d_W = d_0 - d_B$ . Ошибки структурных



параметров мембраны вычислялись через рассчитанные методом наименьших квадратов абсолютные погрешности параметров описывающей область полярных голов функции Гаусса:

$$\Delta d_B = \Delta d_C = (4(\Delta z_{ph})^2 + (\Delta F_{ph})^2)^{1/2}, \quad \Delta d_W = ((\Delta d_0)^2 + (\Delta d_B)^2)^{1/2}.$$

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Двойная система ДПФХ/холестерин с мольным соотношением компонент 4:1.** На рис. 2 представлены дифракционные спектры от мембраны, измеренные при 24 °С в процессах гидратации и последующей дегидратации, и

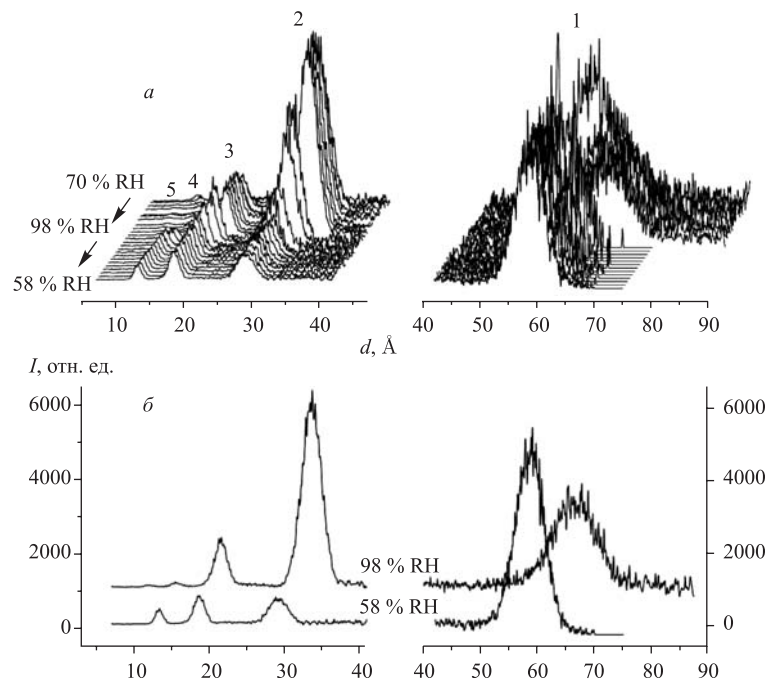


Рис. 2. *а)* Последовательность нейтронных дифракционных спектров от мембраны ДПФХ/холестерин с мольным соотношением компонент 4:1, измеренных в реальном времени в процессе гидратации и последующей дегидратации мембраны при 24 °С. Указаны номера порядков отражения  $h = 1, 2, 3, 4, 5$ . Пятый дифракционный пик становится виден через час после начала процесса гидратации. Спектр, соответствующий мембране в состоянии равновесия при RH = 58 %, содержит четыре видимых дифракционных пика. Стрелки показывают направление процессов. *б)* Дифракционные спектры от мембраны, находящейся в равновесных состояниях при 58 % RH и 98 % RH

спектры от мембраны, находящейся в равновесных состояниях при 98 % RH и 58 % RH. При анализе последовательности восстановленных из дифракционных картин фурье-профилей мембраны в процессах ее гидратации и дегидратации, как было изложено в работе [3], выявлена картина эволюции ламеллярной структуры липидного бислоя в реальном времени в ходе этих кинетических процессов. Временные зависимости периода повторяемости мембраны, толщины бислоя и слоя воды в ходе процессов гидратации и дегидратации представлены на рис. 3, значения этих параметров в равновесных состояниях мембраны (при относительной влажности 98 и 58 %) даны в табл. 1.

Судя по дифракционной картине, мембрана ДПФХ/холестерин с мольной концентрацией  $x_{\text{хол}} = 20$  мол. % при обоих уровнях влажности является од-

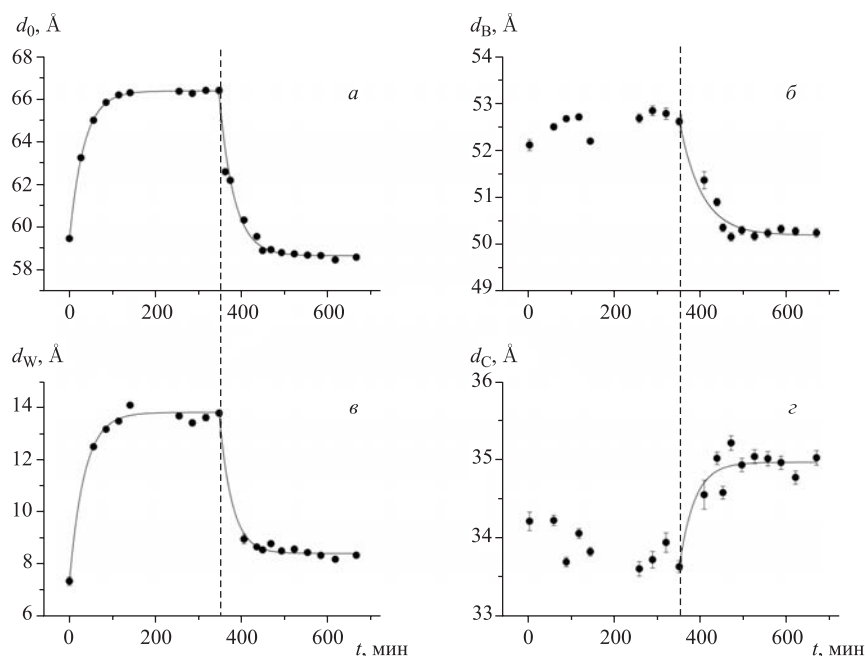


Рис. 3. Изменение периода повторяемости  $d_0$  (а) мембраны ДПФХ/холестерин с мольным соотношением компонент 4:1, толщины липидного бислоя  $d_B$  (б), слоя воды  $d_W$  (в) и толщины области углеводородных цепочек липидов  $d_C$  (г) во времени в процессе гидратации парами воды и последующей дегидратации мембраны при 24 °С. Кривые соответствуют описанию временных зависимостей параметров функцией (2). Вертикальной линией отмечено время начала процесса дегидратации. Эволюция параметров  $d_B$ ,  $d_W$  и  $d_C$  в ходе дегидратации восстановлена приблизительно через час после начала кинетического процесса, когда на дифракционном спектре становятся четко видны первые четыре порядка отражения

**Таблица 1. Структурные параметры мембран ДПФХ/холестерин с мольным соотношением компонент 4:1 при 20 °С, ДПФХ/церамид-VI с мольным соотношением компонент 3:2 при 18 °С, мембраны чистого ДПФХ при 20 °С при разных значениях относительной влажности и тройной системы ДПФХ/церамид-VI/холестерин с мольным соотношением компонент 3:3:4 при 20 °С и относительной влажности 58 %**

Система	RH, %	$d_0$ , Å	$d_B$ , Å	$d_C$ , Å	$d_W$ , Å
ДПФХ/ холестерин	98	66,4 ± 0,1	52,7 ± 0,1	33,8 ± 0,2	13,7 ± 0,1
	58	58,6 ± 0,1	50,2 ± 0,2	35,0 ± 0,2	8,4 ± 0,1
ДПФХ/ церамид-VI	98	62,1 ± 0,5	52,7 ± 0,1	35,2 ± 0,1	9,4 ± 0,1
	58	57,8 ± 0,1	50,6 ± 0,1	37,4 ± 0,1	7,2 ± 0,1
ДПФХ [3]	98	60,0 ± 0,1	48,1 ± 0,1	30,8 ± 0,1	11,9 ± 0,1
	58	57,8 ± 0,1	49,5 ± 0,1	33,9 ± 0,1	8,3 ± 0,1
ДПФХ/ церамид-VI/ холестерин	58	55,8 ± 0,5	47,7 ± 0,1	32,6 ± 0,1	8,1 ± 0,1

нофазной системой. Поскольку на нейтронограммах дифракционный рефлекс от холестерина в кристаллической фазе не наблюдается, можно сделать заключение, что молекулы холестерина полностью встраиваются в липидный бислой ДПФХ.

В исследованиях влияния холестерина на структурные параметры полностью гидратированного ДПФХ определено, что период ламеллярной структуры, равный в избытке воды 64,5 Å, увеличивался до 81 Å при добавлении 7,5 мол. % холестерина в результате увеличения толщины бислоя на 7 Å и возрастания слоя свободной воды между бислоями с 18,5 до 27,5 Å [20]. Последнее объяснялось предположением о возрастании электростатического отталкивания между бислоями за счет изменения ориентации диполей полярных голов ДПФХ при уменьшении площади поперечного сечения молекулы, что происходит вследствие изменения ориентации углеводородных цепей от наклонной к выпрямленной [21]. В нашем случае гидратации системы ДПФХ/холестерин при 98 % RH увеличение периода повторяемости составляет 7,8 Å, что является результатом увеличения толщин липидного бислоя и слоя воды соответственно на 2,5 и 5,3 Å. Молекулы холестерина, располагаясь перпендикулярно поверхности бислоя, препятствуют наклону углеводородных цепочек и тем самым увеличивают толщину углеводородной области липидного бислоя:  $d_C$  при 58 % RH больше  $d_C$  ДПФХ на 1,1 Å, а увеличение  $d_C$  при дегидратации составляет 1,2 Å по сравнению с изменением  $d_C$  на 3,1 Å для мембраны ДПФХ. В отличие от чистого ДПФХ дегидратация си-

**Таблица 2.** Характерные времена  $\tau$  (в минутах) процессов гидратации [70 % RH  $\rightarrow$  98 % RH] и дегидратации [98 % RH  $\rightarrow$  58 % RH] мембраны ДПФХ/холестерин с мольным соотношением компонент 4:1 при 24 °C

Параметр	Гидратация	Дегидратация
$d_0$	$34 \pm 1$	$34,5 \pm 0,4$
$d_B$		$52 \pm 5$
$d_C$		$35 \pm 9$
$d_W$	$35 \pm 1$	$30 \pm 3$

сте́мы ДПФХ/холестерин сопровождается уменьшением толщины липидного бислоя  $d_B$ , тогда как для ДПФХ  $d_B$  увеличивалась на 1,4 Å, что являлось результатом, с одной стороны, увеличения области полярных голов и, с другой стороны, уменьшения  $d_C$  за счет увеличения наклона углеводородных цепочек [3]. В случае двойной системы увеличение области полярных голов при гидратации происходит на значительно большую величину, а  $d_C$  сужается на гораздо меньшую величину, чем для ДПФХ, что и объясняет разное поведение толщины липидного бислоя мембран при дегидратации.

Изменение периода повторяемости мембраны в процессе гидратации и дегидратации описывается экспоненциальным законом с характерным временем, равным в обоих процессах  $\tau \approx 34$  мин:

$$d_0(t) = d_0 - \Delta d \exp(-t/\tau). \quad (2)$$

При переходе системы из условий с относительной влажностью 70 % к влажности 98 % толщина бислоя  $d_B$  увеличивается на  $0,6 \pm 0,1$  Å, а толщина углеводородной области  $d_C$  уменьшается на эту же величину нерегулярным образом. Изменения параметров  $d_B$  и  $d_C$  в процессе дегидратации и слоя воды  $d_W$  в обоих кинетических процессах описываются уравнением (2). Постоянные времена изменения параметров бислоя в кинетических процессах приведены в табл. 2. По сравнению с мембраной из чистого ДПФХ, изменение структурных параметров которой при дегидратации происходило в две стадии (быстрой начальной и последующей очень медленной), перестройка внутренней структуры бислоя системы ДПФХ/холестерин в ходе дегидратации имеет характерное время, равное нескольким десяткам минут.

**Двойная система ДПФХ/церамид-VI с мольным соотношением компонент 3:2.** На рис. 4, а показана последовательность дифракционных картин от мембраны ДПФХ/церамид-VI в процессе ее гидратации. В начале кинетического процесса дифракционные спектры содержат только видимый первый порядок отражения. Через 40 мин после начала гидратации становятся видны

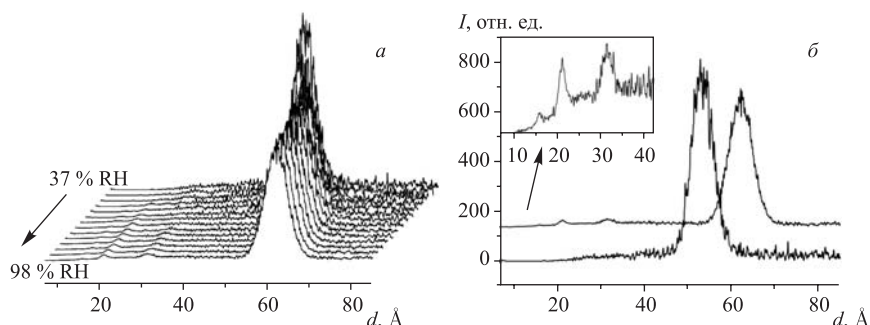


Рис. 4. *а*) Нейтронные дифракционные спектры от мембраны ДПФХ/церамид-VI с мольным соотношением компонент 3:2, измеренные в реальном времени в процессе гидратации мембраны при 18 °С при ее переходе из комнатного состояния с относительной влажностью 37 % в состояние с заданной влажностью 98 %. Стрелка показывает направление процесса. *б*) Дифракционные спектры, соответствующие началу (внизу) и завершению (вверху) гидратации

третий и четвертый дифракционные пики. При гидратации структурный фактор второго дифракционного пика  $F_2$  меняет знак с «+» на «-», при этом абсолютное значение  $F_2$  уменьшается, проходит через 0, а затем начинает увеличиваться, и на нейтронограмме становится виден второй порядок отражения. Через час после начала кинетического процесса, когда на нейтронограмме становятся видны все четыре порядка отражения, удалось проследить эволюцию внутренней структуры бислоя в ходе гидратации. Временная зависимость периода ламеллярной структуры мембраны в целом процессе гидратации и изменение параметров внутренней структуры липидного бислоя за последние два часа процесса представлены на рис. 5. Из графика видно, что происходит увеличение периода повторяемости мембраны за 3 ч гидратации с  $53,3 \pm 0,5$  Å до  $62,1 \pm 0,5$  Å, и это увеличение описывается экспоненциальным законом с характерным временем  $\tau = 28 \pm 0,2$  мин. Характерные времена увеличения толщины бислоя  $d_B$  и сужения толщины углеводородной области  $d_C$  в ходе гидратации не определены, поскольку изменение  $d_B$  и  $d_C$  происходит в первый час гидратации, а первые значения этих параметров получены только через час с момента начала кинетического процесса. В течение последующих двух часов гидратации толщины бислоя и углеводородной области практически не изменяются, а рост периода повторяемости мембраны происходит за счет продолжающегося увеличиваться слоя воды. Следует отметить, что продолжающееся увеличение  $d_W$  при почти неизменных параметрах  $d_B$  и  $d_C$  спустя час гидратации характерно и для системы ДПФХ/холестерин, тогда как для чистого ДПФХ существует экспоненциальная зависимость между изменением толщины бислоя и толщины слоя воды в кинетических процессах.

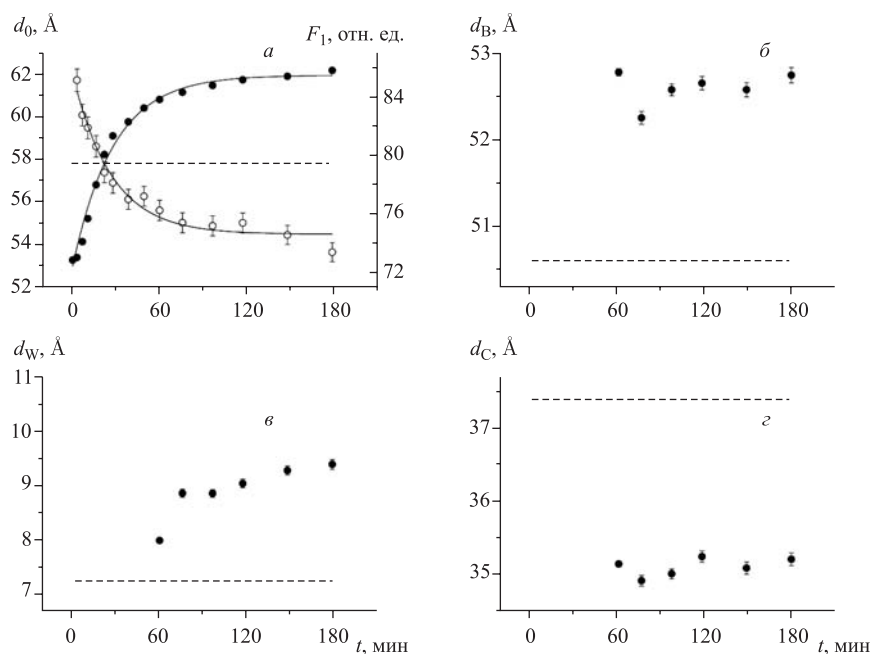


Рис. 5. Изменение периода повторяемости  $d_0$  (●) мембраны ДПФХ/церамид-VI и первого структурного фактора  $F_1$  (○, правая шкала) (а), толщины липидного бислоя  $d_B$  (б), слоя воды  $d_W$  (в) и толщины области углеводородных хвостов липидов  $d_C$  (г) во времени в процессе гидратации парами воды при 18 °С. Кривые соответствуют описанию временных зависимостей  $d_0(t)$  и  $F_1(t)$  функцией (2). Пунктирными линиями обозначены значения параметров мембраны при 58 % RH

Скорость изменения внутренней структуры бислоя в процессе гидратации можно оценить по временной зависимости изменения первого структурного фактора. Как видно из рис. 5, зависимость  $F_1(t)$ , как и  $d_0(t)$ , описывается экспоненциальным законом. Характерное время изменения  $F_1$  составляет  $27 \pm 4$  мин, что совпадает с характерным временем набухания мембраны.

В предыдущих экспериментах с системой ДПФХ/церамид-VI с мольным соотношением компонент 3:2 была получена информация о внутренней структуре мембраны в равновесном состоянии при влажности 58 % и 20 °С, представленная в табл. 1 для сравнения с параметрами мембраны в гидратированном состоянии. Как и холестерин, церамид увеличивает толщину липидного бислоя и сужает область углеводородных цепочек при гидратации. Хотя период мембраны ДПФХ/церамид-VI увеличивается на  $2,1 \text{\AA}$  по сравнению с мембраной из чистого ДПФХ, межмембранное пространство в системе ДПФХ/церамид-VI при обоих уровнях влажности уже, чем в чистом ДПФХ.

Полярная голова молекул церамида меньше, чем у ДПФХ, и она меньше гидратируется, что и обуславливает меньшую водную прослойку между бислоями.

Толщина межмембранного пространства мембраны ДПФХ с 40 мол. % церамида-VI при высокой влажности ( $\sim 9 \text{ \AA}$ ) значительно больше по сравнению с ориентированной многослойной мембраной SC ( $\sim 1 \text{ \AA}$ ). Гидратация мембраны двойной системы парами воды при 98 % RH ( $\tau \sim 30$  мин) происходит быстрее гидратации мембраны SC в избытке воды ( $\tau \sim 90$  мин). На основании сравнения структуры и гидратации этих двух систем можно заключить, что полностью вытянутая конформация молекул церамида-VI, локализованная между соседними бислоями и обуславливающая особенности мембраны SC, в смеси с ДПФХ экспериментально не выявлена.

**Тройная система ДПФХ/церамид-VI/холестерин с мольным соотношением компонент 3:3:4.** На нейтронограмме тройной системы, находящейся в равновесном состоянии при 58 % RH, виден дифракционный пик от холестерина в кристаллической фазе с периодом повторяемости около  $34 \text{ \AA}$  [22] (рис. 6). Все молекулы церамида встраиваются в бислоюную структуру ДПФХ, поскольку дифракционный пик в позиции около  $37 \text{ \AA}$  от церамида в кристаллической фазе [23] не наблюдается. Период повторяемости и вычисленные при анализе фурье-профиля параметры мембраны равны:  $d_0 = 55,8 \pm 0,5 \text{ \AA}$ ,  $d_B = 47,7 \text{ \AA}$ ,  $d_C = 32,6 \text{ \AA}$  и  $d_W = 8,1 \text{ \AA}$ . Из табл. 1 видно, что толщина бислоя  $d_B$  и толщина области углеводородных цепочек  $d_C$  тройной системы намного меньше соответствующих параметров двойных систем с холестерином и церамидом. По-видимому, углеводородные цепочки липидов должны быть значительно наклонены по отношению к поверхности мембраны.

При сравнении структурных параметров систем ДПФХ/церамид-VI/холестерин и ДПФХ/церамид-VI можно отметить их сильное отличие при близ-

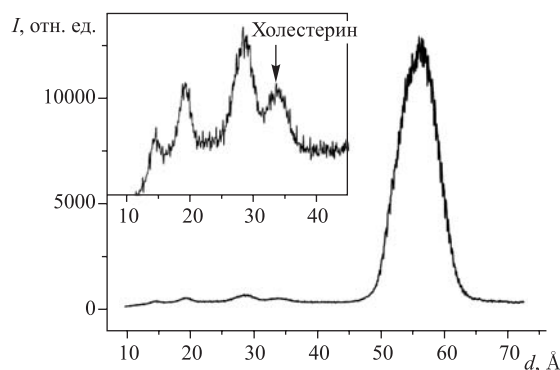


Рис. 6. Нейтронный дифракционный спектр от мембраны ДПФХ/церамид-VI/холестерин с мольным соотношением компонент 3:3:4 при  $20^\circ\text{C}$  и 58 % RH

ких мольных соотношениях ДПФХ и церамида в составах мембран. Это указывает на то, что какая-то часть холестерина встраивается в ламеллярную структуру тройной системы, изменяя организацию бислоев ДПФХ + церамид. В [24] построена фазовая диаграмма для тройной системы ПОФХ(пальмитоилэтилфосфатидилхолин)/церамид (brain ceramide)/холестерин и показано, что бислоидная фаза существует ниже максимальной суммарной мольной концентрации церамида и холестерина 67 %, причем бислоид включает все молекулы фосфолипида и предпочтительно холестерину молекулы церамида. Только затем некоторое количество холестерина встраивается в бислоид при общей концентрации  $x_{\text{цер}} + x_{\text{хол}} \leq 67\%$ , а избыток холестерина выделяется в кристаллическую фазу. Поскольку величины максимальной растворимости холестерина в ДПФХ и ПОФХ очень близки [24], можно предположить, что наша система имеет похожую фазовую диаграмму и зарегистрированная дифракционная картина от ламеллярной структуры является спектром от эквимольной системы ДПФХ/церамид-VI/холестерин. Избыток холестерина (25 мол. % всего холестерина в предположении эквимольности ламеллярной структуры) выпадает в кристаллы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью нейтронной дифракции исследованы процессы гидратации-дегидратации в модельной двойной системе ДПФХ/холестерин с мольным соотношением компонент 1:4 и процесс гидратации мембраны ДПФХ/церамид-VI с мольным соотношением компонент 3:2. Охарактеризовано влияние холестерина и церамида-VI на скорость водного обмена в мембране ДПФХ и изменение структуры во времени. По сравнению с чистым ДПФХ набухание мембран ДПФХ/холестерин и ДПФХ/церамид-VI в процессе гидратации происходит быстрее и имеет характерное время  $\sim 30$  мин. Холестерин замедляет изменение внутренней структуры бислоя при дегидратации: временные зависимости параметров мембраны описываются экспоненциальной зависимостью с характерным временем несколько десятков минут, тогда как структура мембраны ДПФХ изменяется в два этапа (быстрый начальный этап и медленный последующий). Церамид-VI и холестерин оказывают одинаковый эффект на мембрану ДПФХ при гидратации: увеличение периода повторяемости происходит за счет увеличения толщины бислоя  $d_B$  (для чистого ДПФХ  $d_B$  уменьшается). Однако в отличие от холестерина церамид-VI значительно снижает степень гидратации мембраны: толщина водного слоя в межмембранном пространстве  $d_W$  при относительной влажности 98 % составляет 9,4 Å по сравнению с 13,7 Å для ДПФХ/холестерин и 11,9 Å для ДПФХ. Полученная информация о структуре двойной ориентированной мембраны ДПФХ/церамид-VI и скорости процесса ее гидратации парами воды позволяет заключить, что



в смесях с фосфолипидами вероятность нахождения молекул церамида-VI в полностью вытянутой конформации, существующей в многокомпонентных системах, моделирующих липидную составляющую верхнего слоя кожи млекопитающих — *stratum corneum*, достаточно мала.

Измерения мембраны ДПФХ/церамид-VI/холестерин в стационарных условиях при комнатной температуре и низкой относительной влажности показали, что эта тройная система имеет значительно меньшие толщины бислоя и области углеводородных цепочек, чем двойные системы ДПФХ/церамид-VI, ДПФХ/холестерин и чистый ДПФХ. Часть холестерина выпадает из ламеллярной структуры мембраны в кристаллическую фазу.

Таким образом, в настоящей работе продемонстрирована эффективность методики дифракции в реальном времени для изучения структурных изменений двойных липидных систем в кинетических процессах. Дифракция нейтронов в реальном времени может быть применена для изучения такого рода переходных процессов в более сложных системах и использоваться, например, для изучения проникновения лекарственных средств в биологические мембраны.

Авторы выражают благодарность С. Г. Василовскому за помощь в проведении экспериментов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nagle J. F., Tristram-Nagle S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1469. P. 159.
2. Балагуров А. М., Миронова Г. М. // *Кристаллография*. 1991. Т. 36. С. 314.
3. Рябова Н. Ю., Киселев М. А., Бескровный А. И., Балагуров А. М. Исследование структуры многослойных липидных мембран методом дифракции нейтронов в реальном времени // *Физика твердого тела*. 2010. Т. 52, № 5. С. 984–991.
4. Kiselev M. A., Ryabova N. Yu., Balagurov A. M. et al. // *Eur. Biophys. J.* 2005. V. 34. P. 1030.
5. Киселев М. А. // *Кристаллография*. 2007. Т. 52, № 3. С. 549.
6. Земляная Е. В., Киселев М. А., Нойберт Р. и др. // *Поверхность. Рентген., синхротрон. и нейтр. исслед.* 2008. № 11. С. 14.
7. Киселев М. А., Рябова Н. Ю., Балагуров А. М. и др. // *Поверхность. Рентген., синхротрон. и нейтр. исслед.* 2006. № 6. С. 30.
8. Zbytovska J., Kiselev M. A., Funari S. S. et al. // *Chem. Phys. Lipids*. 2005. V. 138. P. 69.
9. Ipsen J. H., Karlstrom G., Mouritsen O. G. et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. V. 905. P. 162.

10. *Maulik P. R., Shipley G. G. // Biophys. J. 1996. V. 70. P. 2256.*
11. *Simons K., Ikonen E. // Nature. 1997. V. 387. P. 569.*
12. *Vist M. R., Davis J. H. // Biochemistry. 1990. V. 29 P. 451.*
13. *Karmakar S., Raghunathan V. A. // Phys. Rev. Lett. 2003. V. 91. P. 098102.*
14. *Seul M., Sammon M. J. // Thin Solid Films. 1990. V. 185. P. 287.*
15. *Kiselev M., Ryabova N., Dante S., Hauss Th. // BENS experimental reports. 2006. P. 119.*
16. *Büldt G., Gally H. U., Seelig A., Seelig J. // Nature. 1978. V. 271. P. 182.*
17. *Worcester D. L., Franks N. P. // J. Mol. Biol. 1976. V. 100. P. 359.*
18. *Schoenborn B. P. // Biochim. Biophys. Acta. 1976. V. 457. P. 41.*
19. *Rand R. P., Luzzati V. // Biophys. J. 1968. V. 8. P. 125.*
20. *Ladbrooke B. D., Williams R. M., Chapman D. // Biochim. Biophys. Acta. 1968. V. 150. P. 333.*
21. *Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М.: Наука, 1981. 296 с.*
22. *Shieh H. S., Hoard L. G., Nordman C. E. // Nature. 1977. V. 267. P. 287.*
23. *Raudenkolb S., Wartewig S., Neubert R. H. H. // Chem. Phys. Lipids. 2005. V. 133. P. 89.*
24. *Ali M. R., Chen K. H., Huang J. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 12629.*

Получено 14 декабря 2009 г.

Редактор *А. И. Петровская*

Подписано в печать 02.03.2010.

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

Усл. печ. л. 1,18. Уч.-изд. л. 1,47. Тираж 290 экз. Заказ № 56917.

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/)