

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДНЫХ НАНОСТРУКТУР НА НЕЙТРОННЫХ И СИНХРОТРОННЫХ ИСТОЧНИКАХ

М. А. Киселев

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ	579
Биологическая роль липидов.	579
Применение липидов в фармацевтике.	581
Методы исследования структуры и свойств липидных мембран и липидных наночастиц.	584
МЕТОДЫ ПРИМЕНЕНИЯ НЕЙТРОННОГО И СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН И ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ	585
ОДНОСЛОЙНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И ПЕРЕНОСЧИКИ ЛЕКАРСТВ. МЕТОД РАЗДЕЛЕННЫХ ФОРМФАКТОРОВ	592
ДИФРАКЦИЯ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ	597
Дифракция в реальном времени на синхротронных источниках.	597
Дифракция в реальном времени на импульсных источниках нейтронов.	600
ДИФРАКЦИЯ НЕЙТРОНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ СТРУКТУРЫ ЛИПИДНОЙ МАТРИЦЫ ВЕРХНЕГО СЛОЯ КОЖИ	603
ОРИЕНТАЦИЯ ЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ В МАГНИТНОМ ПОЛЕ	609
ВЗАИМОДОПОЛНЯЮЩЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДИФРАКЦИИ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ, МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ЯВЛЕНИЯ ДМСО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ДЕГИДРАТАЦИИ МЕЖМЕМБРАННОГО ПРОСТРАНСТВА	620
ВЫВОДЫ	629
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	630

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДНЫХ НАНОСТРУКТУР НА НЕЙТРОННЫХ И СИНХРОТРОННЫХ ИСТОЧНИКАХ

М. А. Киселев

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

Липидная мембрана является главным компонентом биологической мембраны. Современные бионанотехнологии используют фосфолипиды и керамиды как основной компонент лекарств и косметических средств. Наночастицы на основе фосфолипидов используются в качестве переносчиков лекарств. Развитие бионанотехнологий в России требует разработки физических методов диагностики наноструктуры частиц, перспективных для применения в фармакологии. Излучения с длиной волны 1–10 Å являются адекватным инструментом определения наноструктуры липидного би- и монослоя. Представлен обзор применения рассеяния нейтронов и синхротронного излучения для исследования наноструктуры липидных мембран, фосфолипидных наночастиц и фосфолипидных монослоев на поверхности воды методами дифракции, малоуглового рассеяния и рефлектометрии. На конкретных примерах исследований фосфолипидных мембран и мембран на основе керамидов показана важность взаимодополняющего использования нейтронного и синхротронного излучения для решения актуальных задач биофизики мембран, микробиологии, дермафармакологии, бионанотехнологий. Продемонстрирована эффективность развития и применения новых методов для решения отдельных современных задач биофизики. Обзор написан на основе результатов, полученных в период 1999–2010 гг. в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ в коллаборации с фармацевтическими факультетами университетов Франции (Paris-Sud, Chateau Malabry) и Германии (Martin Luther University, Halle). Эксперименты выполнялись на различных европейских и российских нейтронных и синхротронных источниках.

Lipid membrane is a major component of the biological membrane. Phospholipids and ceramides are basic components of drugs and cosmetics in the modern bionanotechnologies. Phospholipids nanoparticles are used as drug carriers. Development of bionanotechnology in Russia is urgency and requires the development of diagnostic methods for nanoparticles, which are prospective for pharmacology application. Radiations with a wavelength of 1–10 Å are appropriate instrument for examination of the bilayer and monolayer of lipids. Review of methods of application of the neutron and synchrotron radiations is presented for the case of nanostructure investigation of the lipid bilayer, phospholipid nanoparticles, phospholipid monolayer on the water substrate via methods of diffraction, small-angle scattering, and reflectometry. The importance of complementary application of neutron and synchrotron radiation is demonstrated as the specific study of phospholipid membranes and membranes based on the ceramides for the decision of hot topics in the membrane biophysics, microbiology, dermapharmacology, and bionanotechnology. The efficiency of development and application of new methods for the decision of separate problems of current importance in biophysics is demonstrated. The review presents the main results obtained from 1999 to 2010 in Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR in the collaboration with Pharmaceutical Faculties of Paris-Sud University (Chateau Malabry, France) and Martin Luther University (Halle, Germany).

PACS: 87.15.By; 87.15.Kg; 87.22.Bt; 61.10.Eq

Используемые сокращения:

SC — stratum corneum
ДМФХ — димиристоилфосфатидилхолин
ДПФХ — дипальмитоилфосфатидилхолин
ДСФХ — дистеароилфосфатидилхолин
ПОФХ — пальмитоилолеоилфосфатидилхолин
ДМСО — диметилсульфоксид
NaC — холат натрия
Cer6, Cer[AP] — короткоцепочечный керамид-6
Cer1, Cer[EOS] — длинноцепочечный керамид-1
BA — бегеновая кислота
PA — пальмитиновая кислота
 q — модуль вектора рассеяния
 λ — длина волны нейтрона (фотона)
ЯМР — ядерный магнитный резонанс
ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия
СИ — синхротронное излучение
SAXS — малоугловая (ламеллярная) дифракция рентгеновских лучей
WAXS — широкоугловая (латеральная) дифракция рентгеновских лучей
ПЧД — позиционно-чувствительный детектор
СМС — критическая концентрация мицеллообразования
МУРН — малоугловое рассеяние нейтронов

1. ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

1.1. Биологическая роль липидов. Главная биологическая роль липидов заключается в формировании липидного бислоя — основы биологической мембраны. Из множества функций, выполняемых биологической мембраной, наиболее важной является образование плазматической мембраны клетки [1]. Собственно клетка начала формироваться в тот момент, когда липидный бислой замкнулся в сферическую оболочку и отделил внутреннюю часть от объемной воды Мирового океана. Основными липидными компонентами биологической мембраны клетки являются фосфолипиды, что и определяет интерес биологов к изучению наноструктуры и свойств мембран, построенных из фосфолипидов, — так называемых модельных биологических мембран. На рис. 1 изображена структурная формула молекулы димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), одного из представителей фосфолипидов. Фосфолипид — полярная молекула, состоящая из двух углеводородных цепочек, присоединенных к полярной голове. Полярная голова фосфолипида может быть нейтральной, заряженной или дипольной. Фосфолипиды с дипольной полярной головой называются цвиттерионными. ДМФХ является цвиттерионным насыщенным

липидом. Дипольный заряд полярной головы ДМФХ обеспечивает ее высокую полярность (гидратацию). ДМФХ и лецитин широко используются при изучении модельных биологических мембран, при производстве фармацевтических и косметических препаратов, а также пищевых добавок [2].

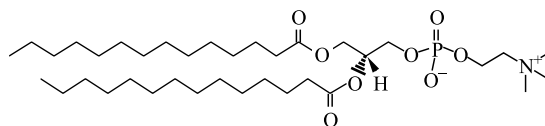


Рис. 1. Структурная формула молекулы димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), $C_{36}H_{72}NO_8P$

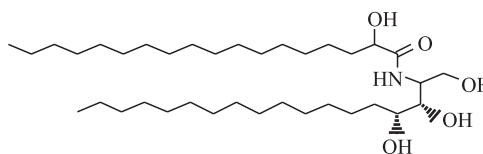


Рис. 2. Структурная формула молекулы церамида-6 (церамида [AP]), $C_{36}H_{73}NO_5$

В отличие от мембраны клетки основным компонентом липидной матрицы *stratum corneum* (SC) являются церамиды. На рис. 2 изображена пространственная структура церамида-6, который также обозначается как церамид [AP]. Фосфолипиды не входят в состав липидной матрицы *stratum corneum*. Церамиды в малых количествах входят в состав плазматической мембраны. При этом в процессе апоптоза концентрация церамидов в клеточной мембране увеличивается. 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, наноструктурой липидной матрицы и ее зависимостью от физико-химического воздействия на кожу. Этим определяется интерес биологов и дерматологов к вопросам изучения структуры и свойств липидной матрицы SC млекопитающих [3].

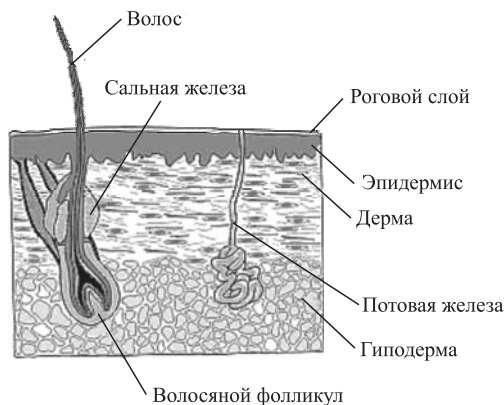


Рис. 3. Структура кожи млекопитающих. Верхний роговой слой — *stratum corneum*

Stratum corneum (роговой слой) является ее верхним слоем. Этот слой состоит из умерших клеток (корнеоцитов), окруженных липидной матрицей, которая является многослойной мембраной, как изображено на рис. 4. Ли-

рица SC является основным диффузионным барьером для воды и малых молекул. Процесс переноса лекарств и воды через кожу человека определяется, прежде всего, наноструктурой липидной матрицы и ее зависимостью от физико-химического воздействия на кожу. Этим определяется интерес биологов и дерматологов к вопросам изучения структуры и свойств липидной матрицы SC млекопитающих [3].

На рис. 3 изображена структура кожи млекопитающих.

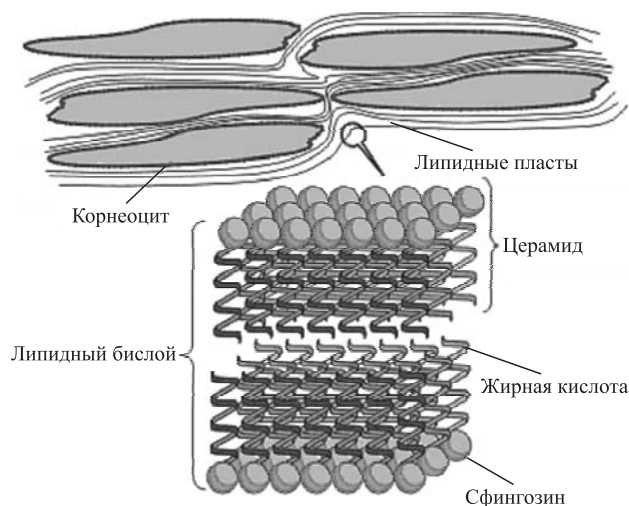


Рис. 4. Структура верхнего рогового слоя (SC) кожи. Внизу изображена структура липидного бислоя мембраны SC

Липидный бислой этой матрицы образуется церамидами, жирными кислотами, холестерином и его производными. Молекула церамида образована жирной кислотой и сфингозином (фитосфингозином). К настоящему времени установлено 11 типов церамидов, входящих в состав липидной матрицы SC млекопитающих [4].

1.2. Применение липидов в фармацевтике. Фосфолипиды и церамиды могут быть получены двумя способами. Первый — извлечение из биологических объектов или растений. Например, один из наиболее применяемых в бионанотехнологиях фосфолипидов — яичный лецитин — извлекают из куриных яиц. Смесь различных церамидов может извлекаться биохимическими методами из верхнего слоя кожи млекопитающих. Второй способ — синтезирование молекул. Большинство фосфолипидных молекул синтезируется и предлагается в виде коммерческого продукта фирмами «Avanti» (<http://www.avantilipids.com>), «Sigma-Aldrich» (<http://www.sigmaaldrich.com/>), «Lipoid» (<http://www.lipoid.com>) и др. Церамиды, в отличие от фосфолипидов, еще не стали дешевым коммерческим продуктом. Производство постоянно увеличивается за счет выхода на рынок новых типов церамидов, которые в основном идут на изготовление кремов для увлажнения кожи. В косметических продуктах используются церамиды, экстрагированные из растений. Получение липидов из трав и растений является наиболее перспективным направлением их производства для фармакологии и косметологии. Церамиды (сфинголипиды) значительно увеличивают уровень увлажнения поверхности

кожи. Они помогают удерживать дермальные клетки вместе, укрепляя клеточные стенки, что предотвращает преждевременное образование мелких морщин. Поэтому многие косметические фирмы делают на их основе кремы и гели. Сфинголипиды были впервые выделены из мозговой ткани. Свое второе название — церамиды (ceramides) — они получили от латинского слова «cerebrum» (мозг). В публикациях на русском языке и биохимических описаниях продукции используется два написания слова «ceramide»: церамид и керамид. Правильным, безусловно, является церамид.

В качестве примера применения фосфолипидов приведем гепапротекторное лекарство для печени — фосфоглив (рис. 5), которое представляет собой липидные наночастицы, изготовленные из смеси фосфатидилхолина и глицерризиновой кислоты [5]. Размеры наночастиц фосфоглива известны и составляют 200–500 Å, а вот их морфология и форма до сих пор не изучены.



Рис. 5. Лекарство фосфоглив, выпускаемое в виде капсул и лиофилизированного порошка. Разработано в Институте биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАН

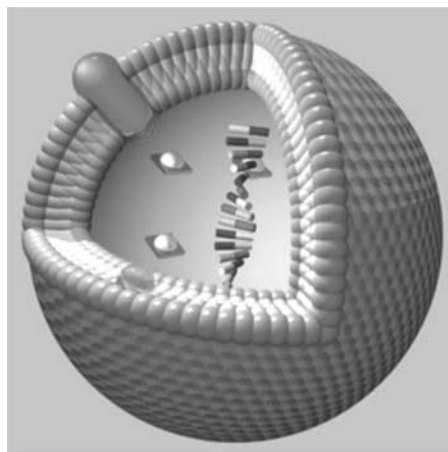


Рис. 6. Однослойная липидная везикула со встроенными молекулами лекарств. Молекулы водорастворимых лекарств находятся внутри везикулы, а молекулы водонерастворимых лекарств встроены в липидный бислой

80% продукции на современном рынке бионанотехнологий составляют переносчики лекарств. Особое место здесь занимают трансдермальные везикулярные переносчики лекарств. Такие переносчики, выполненные на основе однослойных везикул размерами от 500 до 2000 Å, способны векторно в течение нескольких минут доставлять в кожу или через кожу лекарства, чистые витамины, аминокислоты, пептиды, молекулярный кислород, активные вещества, а также церамиды. На рис. 6 изображена общая структура везикулярного переносчика лекарства.

Довольно часто однослойные везикулы на основе фосфолипидов называют липосомами, а в последние годы — нанолипосомами [6], что также приводит к терминологической путанице. В нашем обзоре липосомы — это многослойные везикулы из фосфолипидов, состоящие из повторяющихся липидных бислоев. Они имеют микронные размеры и используются как пищевые добавки (рис. 7). Благодаря высокой полярности фосфолипидов создается достаточно большое (около 15 Å) водное пространство между бислоями, в котором размещаются водорастворимые витамины и пищевые добавки. Гидрофобная часть липидного бислоя толщиной около 20 Å служит для размещения витаминов и пищевых добавок, нерастворимых в воде.

Переносчик лекарства — это наночастица размером от 100 до 2000 Å. Такие размеры обеспечивают высокую проницаемость наночастиц через биологическую ткань. Использование в наночастицах фосфолипидов, с одной стороны, обеспечивает биосовместимость материала переносчика, а с другой — высокую эффективность взаимодействия переносчика с плазматической мембраной клетки.

Все вышеизложенное говорит о важности понимания физических принципов организации и функционирования биологических и липидных мембран, что невозможно без получения детальных знаний о наноструктуре липидного бислоя [7].

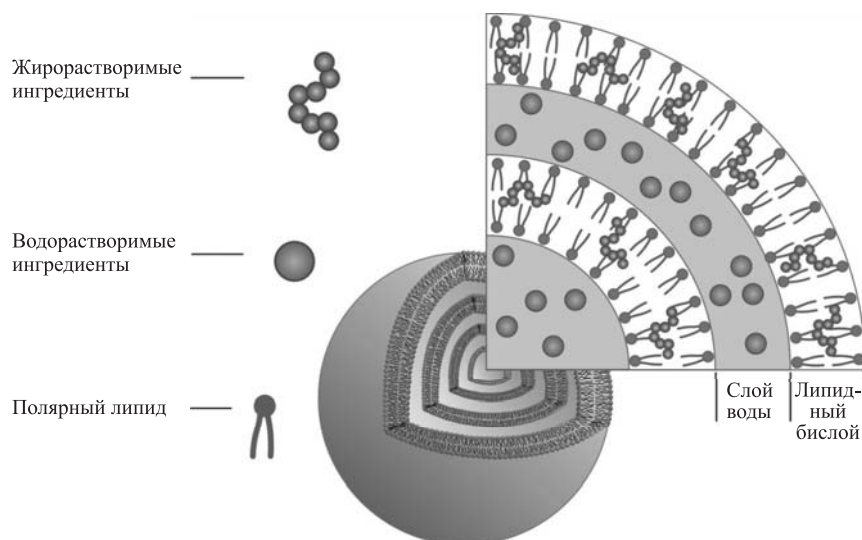


Рис. 7. Многослойная везикула (липосома) из полярных липидов. Жирорастворимые ингредиенты встроены в липидный бислой. Водорастворимые ингредиенты сконцентрированы в межмембранном водном пространстве. Справа показан увеличенный разрез везикулы, демонстрирующий детали структурной организации

1.3. Методы исследования структуры и свойств липидных мембран и липидных наночастиц. Характерные размеры липидного бислоя (около 50 Å) требуют применения для определения его структуры длинноволнового излучения с длиной волны в несколько ангстрем. Здесь наиболее эффективными методами изучения являются рассеяние нейтронов с длиной волны в интервале от 1 до 10 Å (тепловые и холодные нейтроны) и рассеяние синхротронного рентгеновского излучения с длиной волны от 1 до 2 Å. Детально эти методы будут описаны в разд. 2.

Другим методом определения локальной структуры липидной мембраны служит ядерный магнитный резонанс (ЯМР), который позволяет определять локализацию молекул в мембране и, тем самым, строить функции распределения различных веществ в липидном бислое [8]. Особенно эффективно применение ЯМР для определения кинетики проникновения веществ через мембрану в диффузионных процессах [9]. Электронная микроскопия позволяет исследовать структуру липидных агрегатов, помещенных в вакуум или охлажденных до низких температур в воде [10, 11]. Получаемое при этом разрешение не бывает лучше чем 50 Å. При этом всегда остается вопрос об изменении структуры при дегидратации и охлаждении.

Рассеяние нейтронов и рентгеновского синхротронного излучения эффективно для определения наноструктуры липидной мембраны, липидных мицелл и более сложных фаз (гексагональной, кубической и др.), но неэффективно для определения микроскопических параметров липидных систем с размерами более 1000 Å (липосомы и др.). Здесь более информативно применение статического и динамического рассеяния света, комбинацией которых можно определять как форму, так и размер сильнорастворенных липидных частиц [12]. Комбинированное применение динамического и статического рассеяния света является одним из наиболее применяемых методов в бионанотехнологиях как при разработке технологий изготовления переносчиков лекарств [13], так и при изготовлении соответствующих приборов и аппаратов [14].

Флюоресценция позволяет исследовать структуру как липидных, так и биологических мембран [15]. С помощью флюоресцентных зондов впервые были одновременно измерены потенциалы двух электрических полей (на плазматической и митохондриальной мембранах) в лимфоцитах крови [16]. Хроматография является основным методом разделения и очистки липидных компонентов. Вместе с тем хроматографические методы могут использоваться для определения распределения липосом по размерам [17]. Для определения размеров липидных агрегатов, в частности стержнеобразных мицелл, иногда весьма эффективно применяется вискозиметрия. Наиболее эффективно применение вискозиметрии в комбинации с малоугловым рассеянием нейтронов [18].

лучей применительно к липидным мембранам являются дифракция, малоугловое рассеяние и рефлектометрия.

Дифракция тепловых нейтронов от ориентированных многослойных липидных мембран первой стала применяться для исследования наноструктуры липидного бислоя [26, 27], что обусловлено двумя причинами. Первая — решение фазовой проблемы. Внутренняя структура липидного бислоя может быть определена по функции распределения плотности длины рассеяния в направлении нормали к мембране. Распределение плотности длины рассеяния нейтрона (фотона) в элементарной ячейке в направлении нормали к плоскости мембраны вычисляется в относительных единицах как фурье-синтез:

$$\rho_z(x) = A + B \sum_{h=1}^{h_{\max}} \alpha_h |F_h| \cos\left(\frac{2\pi hx}{d}\right). \quad (1)$$

Здесь A и B — неизвестные константы; F_h — структурный фактор, определяемый по интенсивности дифракционных пиков; d — период повторяемости мембраны, определяемый по положению дифракционных пиков; h — порядок дифракционного отражения и α_h — фазовый множитель.

В случае рентгеновского излучения функция $\rho_z(x)$ пропорциональна плотности распределения электронов $\rho_z^e(x)$:

$$\rho_z(x) = r_D \rho_z^e(x). \quad (2)$$

Здесь $r_D = e^2/mc^2 = 2,82 \cdot 10^{-13}$ см — классический (томсоновский) радиус электрона. Знание $\rho_z^e(x)$ позволяет определить толщину мембраны, толщину полярной области липидов, толщину области углеводородных хвостов, а также ответить на вопрос о влиянии различных веществ на параметры мембраны. Во втором случае — дифракции нейтронов — $\rho_z(x)$ соответствует плотности длины рассеяния нейтрона на ядрах, входящих в состав липидной молекулы. Длины рассеяния тепловых нейтронов определяются экспериментально и являются табличными величинами.

Если монослой, образующие бислои, одинаковы, то мембрана обладает центральной симметрией и фазовый множитель может принимать только два значения: $+1$ или -1 . В этом случае проблема определения фазового множителя сводится к определению знака структурного фактора F_h . В нейтронном дифракционном эксперименте проблема определения знака структурного фактора решается за счет вариации контраста. Для этого измерения проводятся при гидратации мембраны водой с различным процентным содержанием H_2O и D_2O [28]. Достаточно провести измерения при трех различных значениях содержания D_2O , например 8, 20 и 50 % по весу. На рис. 8 показано распределение плотности длины рассеяния нейтрона для мембраны ДМФХ. Измерения были выполнены на дифрактометре V1 Центра им. Г. Гельмгольца для исследования материалов и энергии (Берлин) [35].

Одной из важнейших характеристик липидной системы является ее фазовое состояние. С помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) можно определять температуры и энтальпии термотропных фазовых переходов в липидных системах, возникающих как при положительных температурах [19], так и при охлаждении, что позволяет исследовать свойства фазовых переходов свободной и связанной воды, находящейся в липидной мембране [20]. С помощью изотермической титрационной калориметрии можно исследовать лиотропные фазовые переходы и получать термодинамические параметры в смешанных системах липид/детергент, что важно для исследования процесса растворения-самосборки липидной мембраны и реконструкции мембранных белков [21]. В современных исследованиях липидных мембран ДСК является одним из первых методов, который следует применять для получения информации о свойствах новых объектов. Другим методом определения фазового состояния липидного бислоя и, прежде всего, конформационных состояний углеводородных цепочек служит рамановская спектроскопия [22]. Инфракрасная спектроскопия занимает важное место в исследованиях структуры и свойств липидных систем, позволяя фиксировать изменение интенсивности различных связей в липидных молекулах при воздействии на них других веществ или изменении физико-химических параметров [23].

Реже используемыми, но иногда чрезвычайно полезными для интерпретации результатов методами являются гравиметрия и измерение прозрачности. В последнее время появились приборы, в которых одновременно используется несколько методов для определения размеров липидных частиц. В качестве примера приведем установку, в которой одновременно применяется падение частиц в потоке жидкости и рассеяние света (flow field-flow fractionation fractograms in combination with multi-angle light scattering) [24].

Вычислительные мощности современных компьютеров позволяют делать расчеты структуры мембран методами моделирования молекулярной динамики. Результаты таких расчетов чрезвычайно полезны в сочетании с проведением экспериментальных измерений [25].

2. МЕТОДЫ ПРИМЕНЕНИЯ НЕЙТРОННОГО И СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН И ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

В рассеянии нейтронов и рентгеновских лучей исследуется зависимость интенсивности рассеяния от модуля вектора рассеяния $q = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda}$. Здесь θ — угол рассеяния падающего излучения, λ — длина волны используемого излучения. Основными методами рассеяния нейтронов и рентгеновских

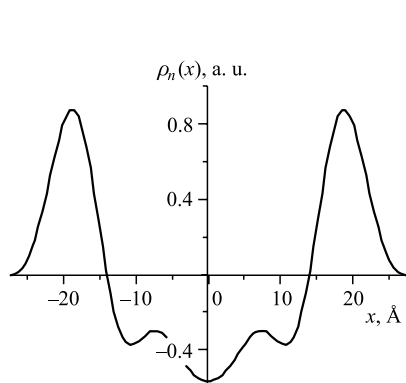


Рис. 8. Распределение плотности длины рассеяния нейтрона в направлении нормали к бислою $\rho_n(x)$ в многослойной мембране ДПФХ, измеренное при относительной влажности 60%, $T = 32^\circ\text{C}$ и 8%-м содержании D_2O

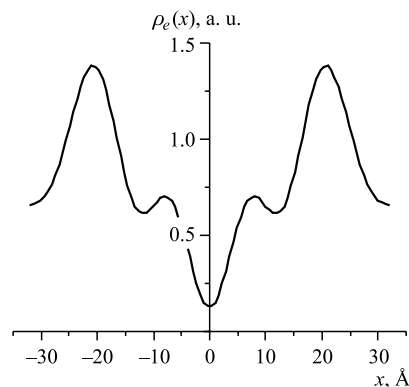


Рис. 9. Распределение плотности электронов $\rho_e(x)$ в направлении нормали к бислою ДПФХ. Измерения проводились на многослойных везикулах ДПФХ в избытке воды при $T = 20^\circ\text{C}$

Кроме того, в нейтронном эксперименте за счет вариации контраста можно определять функцию распределения воды в направлении нормали к бислою. Применение липидов с дейтерированными метками позволяет определять позиции этих меток с высокой точностью.

В случае рентгеновского излучения для определения знаков структурных факторов необходимо проведение серии дополнительных измерений и восстановление из этих измерений кривой $F(q)$ по теореме Шеннона [29]. На рис. 9 представлено распределение плотности электронов, измеренное для мембраны ДПФХ в избытке воды на установке ДИКСИ Курчатовского центра синхротронного излучения [37].

Вторая причина применения дифракции нейтронов начиная с 70-х гг. прошлого века связана с тем, что нейтронные источники реакторного типа с высокими потоками на образце ($10^6 - 10^7 \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) появились существенно раньше синхротронных центров по применению рентгеновского излучения для исследований в области биофизики. К концу XX в. большая часть исследований структуры фосфолипидных мембран сместилась в область применения синхротронного рентгеновского излучения. Несмотря на это, новые липидные структуры или решение сложных структурных задач в области фосфолипидов требуют применения дифракции нейтронов на ориентированных липидных мембранах [30].

Применение нейтронов эффективно при исследовании дифракции от ориентированных на кварцевых подложках многослойных мембран [31], которые

гидратируются парами воды и, соответственно, находятся в частично гидратированном состоянии. Биологическая мембрана находится в избытке воды. Поэтому более важным является исследование мембран фосфолипидов в полностью гидратированном состоянии. К таким объектам относятся многослойные везикулы в избытке воды (липосомы). Интенсивности современных источников нейтронов оказывается недостаточно для исследования неориентированных многослойных везикул в избытке воды. Здесь наиболее эффективно применение источников синхротронного излучения. Спектрометры на установках СИ имеют три преимущества по сравнению с нейтронными. Первое — более высокие потоки фотонов, второе — высокая когерентность пучка, третье — существенно лучшее разрешение в обратном пространстве векторов рассеяния. Обзор применения рентгеновского синхротронного излучения для исследования наноструктуры и свойств полностью гидратированного бислоя фосфолипидов дан в [32], и здесь не имеет смысла его повторять.

Малоугловое рассеяние нейтронов и рентгеновских лучей позволяет исследовать мицеллярные и везикулярные системы в большом избытке воды, при котором концентрация липидов в воде составляет 1–2% по весу. Для улучшения контраста и снижения некогерентного фона в экспериментах на нейтронных источниках применяют тяжелую воду. Улучшение контраста при использовании рентгеновского излучения возможно за счет увеличения плотности электронов в водных растворах дисахаридов [41, 42]. Применение дисахаридов для контрастирования малоуглового рассеяния рентгеновских лучей подробно описано в работах [41, 80–82]. В настоящее время в Институте биомедицинской химии РАН разработаны транспортные фосфолипидные системы (нанофосфолип, доксолип, фосфоглив), которые будут выпускаться в лиофилизированном виде как фосфолипидные везикулы, заключенные в матрицу из мальтозы. Применение малоуглового рассеяния рентгеновских лучей для нанодиагностики таких систем на основе методик, разработанных нами в [41, 42, 80–82], может стать перспективным направлением деятельности для нанотехнологического центра, создаваемого в Дубне в настоящее время. Подробно применение и развитие методов малоуглового рассеяния на нейтронных и синхротронных источниках описано в разд. 3, 6, 7.

Рентгеновская и нейтронная рефлектометрия являются методами исследования липидных монослоев (ленгмюровских пленок) на водных подложках. Наиболее значительные результаты получены на синхротронных источниках при использовании излучения с вилгера. Низкий некогерентный фон позволяет получать рефлектометрическую кривую в широком диапазоне векторов рассеяния вплоть до максимального значения $q = 0,8 \text{ \AA}^{-1}$, а высокая интенсивность — проводить измерения скользящей дифракции от углеводородных цепей. Квазимолекулярный метод описания рефлектометрической кривой служит для определения положения отдельных молекул и молекулярных групп [33]. Методом рентгеновской рефлектометрии была решена задача

о расположении молекул диметилсульфоксида (ДМСО) в липидном бислое. Было показано, что молекулы ДМСО проникают в область углеводородных хвостов [34], что объясняет высокую проникающую способность молекул ДМСО через липидную мембрану. Недостатком исследования липидных монослоев на водной подложке является зависимость фазового состояния монослоя от поверхностного давления, а также вопрос идентичности структуры монослоя структуре липидной мембраны. На рис. 10 изображена зависимость площади, приходящейся на одну молекулу липида, A от величины поверхностного давления липидной пленки π (π - A изотерма), а на рис. 11 — рентгеновская рефлектометрическая кривая от монослоя ДПФХ на поверхности водного раствора ДМСО с $X_{\text{DMSO}} = 0,01$, $\pi = 15$ мН/м, $T = 20^\circ\text{C}$.

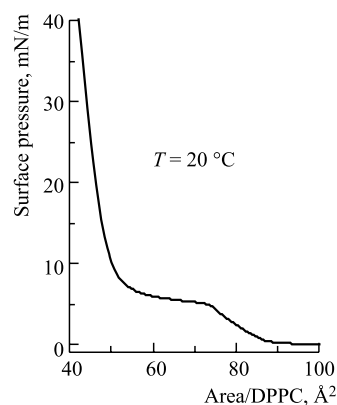


Рис. 10. Зависимость площади, приходящейся на молекулу ДПФХ, от величины поверхностного давления липидного монослоя на поверхности воды (π - A изотерма)

Квазиупругое рассеяние нейтронов широко и успешно применяется как для исследования динамики белков в водных растворах, так и для исследования влияния различных растворителей на динамику молекул воды. Применение квазиупругого рассеяния нейтронов к проблемам исследования динамических свойств липидного бислоя наиболее эффективно при использовании метода спин-эхо, который позволяет определять упругие свойства липидного бислоя однослойных везикул [38]. Определение модуля упругости бислоя

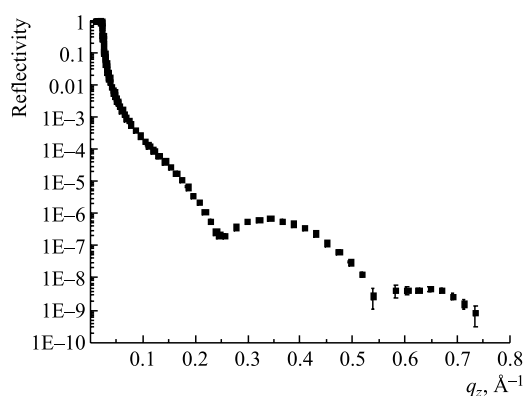


Рис. 11. Рентгеновская рефлектометрическая кривая от монослоя ДПФХ на поверхности водного раствора ДМСО с $X_{\text{DMSO}} = 0,01$, $\pi = 15$ мН/м, $T = 20^\circ\text{C}$

везикул имеет большое значение при создании везикулярных наночастиц — переносчиков лекарств через кожу. Основным физическим требованием к таким переносчикам являются высокие деформационные свойства, что позволяет везикулам проникать через дефекты, имеющиеся в липидной матрице верхнего слоя кожи, размеры которых существенно меньше размера везикул.

Исследования липидных мембран в Лаборатории нейтронной физики начались в 1980-х гг. с вводом в действие импульсного реактора ИБР-2, потоки нейтронов от которого позволяли проводить исследования жидких кристаллов [83]. Основная часть исследований выполнялась на высокопоточном дифрактометре ДН-2 методом дифракции нейтронов на многослойных ориентированных мембранах фосфолипидов [84]. Возможности методики по времени пролета на импульсном источнике позволяют исследовать кинетические процессы. Одной из первых работ, выполненных на реакторе ИБР-2 по липидной тематике, было исследование кинетики сорбции и десорбции воды в многослойных мембранах лецитинов [85]. Было показано, что эти процессы с хорошей точностью подчиняются экспоненциальному закону и имеют, как правило, две или более стадий, различающихся характерным временем. Изучение сорбции и десорбции воды в мультислоях из лецитина показало, что существует быстрая фаза гидратации с характерным временем $\tau_c \approx 1$ мин и медленные фазы гидратации с τ_c до десятков минут. Также было показано, что быстрая фаза процесса изотопического замещения легкой воды на тяжелую $\tau_c(\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D}_2\text{O}) = 92$ с больше, чем при обратном замещении $\tau_c(\text{D}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}) = 71$ с. Проведенные эксперименты демонстрировали различную скорость диффузии легкой и тяжелой воды. Последующие исследования, выполненные в 2005 г., показали, что эти различия связаны с различием в силах водородных и дейтериевых связей между молекулами воды и полярной головой фосфолипидов [90]. В экспериментах, выполненных в 1980-х гг., регистрация нейтронов осуществлялась одномерным позиционно-чувствительным детектором, поэтому для определения характерных времен регистрировалось изменение во времени структурного фактора только одного, наиболее интенсивного дифракционного пика, что возможно и в эксперименте на дифрактометре с монохроматическим пучком нейтронов. Однако еще в первых нейтронографических исследованиях на дифрактометре ДН-2 было показано, что на дифрактометре по времени пролета на импульсном источнике нейтронов возможна одновременная регистрация нескольких порядков отражения от ламеллярной структуры [85]. При этом появляется возможность наблюдения кинетических структурных изменений по восстанавливаемой из дифракционных спектров функции $\rho_n(x)$. Описанию таких исследований, проведенных в 2010 г., посвящен разд. 4.

Важной характеристикой многослойной липидной мембраны является размер когерентно рассеивающей области (размер мембранного домена). Раз-

мер домена в латеральном направлении определяет ширину дифракционного пика. В работе [86] была разработана методика определения относительной ширины дифракционного пика, позволяющая исключать инструментальную ошибку. Эта методика основана на методе времени пролета, а именно регистрации дифракционного пика при различных длинах волн нейтронов на одномерном позиционно-чувствительном детекторе. Исследованию флуктуаций структуры липидной многослойной мембраны на синхротронных источниках и определению из экспериментально измеряемой формы дифракционного пика свойств липидного бислоя и сил межмембранного взаимодействия посвящен ряд работ Дж. Нагла [32].

В 1980-х гг. были начаты исследования влияния неводных полярных растворителей (диметилсульфоксида, глицерина, этиленгликоля) на структуру и свойства фосфолипидных мембран. Применение вариации контраста в нейтронных дифракционных экспериментах на многослойных мембранах позволило определить функцию распределения молекул ДМСО в направлении нормали к бислою. Было доказано, что молекулы ДМСО проникают в глубь бислоя частично гидратированной мембраны до уровня углеводородных хвостов [87]. Исследования многослойных везикул ДПФХ в избытке растворителя методом дифракции рентгеновских лучей показали, что многослойные мембраны в чистом ДМСО существуют в фазе со взаимным проникновением углеводородных хвостов (*interdigitated phase*) [88]. Как правило, фазовый переход в *interdigitated* фазу связан с увеличением проницаемости мембраны, т. е. с проникновением молекул ДМСО в область углеводородных хвостов. Противоречие между результатами нейтронных и рентгеновских синхротронных экспериментов явилось стимулом для дальнейших исследований тройной системы фосфолипид/ДМСО/вода. Результаты этих исследований будут изложены в разд. 4 и 7.

В период 1987–1991 гг. методом малоуглового рассеяния нейтронов на установке ЮМО были выполнены исследования дефектов, возникающих в липидном бислое лецитина и ДПФХ [89]. Исследовались многослойные мембраны, ориентированные на кварцевых подложках и частично гидратированные тяжелой водой. Было установлено наличие дефектов в упаковке углеводородных хвостов, которые приводили к образованию кластерной структуры липидного монослоя с размером кластера 24 \AA в плоскости мембраны. Предложенная теория образования дефектов предполагает, что дефекты в упаковке углеводородных хвостов не пронизывают липидный бислой, т. е. не формируют мембранных пор, так как размер дефекта в направлении нормали бислоя составляет 7 \AA . Площадь поверхности мембраны, занимаемая дефектами, составляет 9%. Теория образования пор в полностью гидратированном фосфолипидном бислое была разработана в работах В. Ф. Антонова [59] в 2003–2005 гг. Исследование геометрических характеристик пор, их зависимости от фазового состояния липидного бислоя, влияния холестерина и

детергентов на процесс порообразования в фосфолипидном бислое является интересной задачей будущего, требующей проведения прецизионных экспериментов.

3. ОДНОСЛОЙНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И ПЕРЕНОСЧИКИ ЛЕКАРСТВ. МЕТОД РАЗДЕЛЕННЫХ ФОРМФАКТОРОВ

Производство транспортных наносистем и нанолечарств на основе фосфолипидов показало, что с помощью методов, описанных в разд. 1, нельзя ответить на ряд важных вопросов. К таким вопросам относятся морфология частицы (мицелла или везикула), форма частицы, полидисперсность везикулярной популяции, место локализации лекарства в липидном бислое. В принципе, ответы на эти вопросы являются предметом специализации МУРН. Но в малоугловом рассеянии нейтронов и рентгеновских лучей методы анализа структуры были развиты для глобулярных частиц (белок, мицелла, полимерный гауссов клубок), имеющих один характерный размер [45]. Липидная везикула имеет два характерных размера: радиус везикулы R и толщину липидного бислоя d_m , которые существенно отличаются друг от друга, как показано на рис. 12. Информация о форме и размерах везикул находится в начале кривой рассеяния, а информация о толщине липидного бислоя и его внутренней структуре — в конце кривой рассеяния.

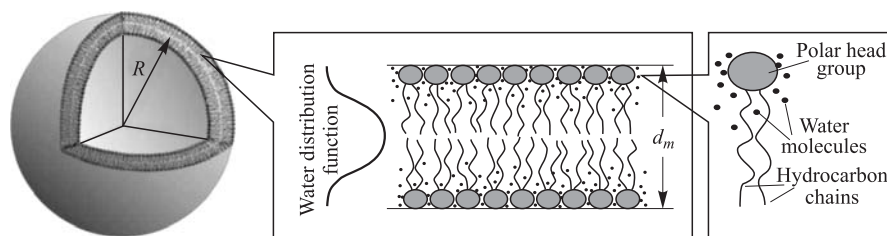


Рис. 12. Изображение структуры однослойных везикул. Радиус везикул R в пять и более раз превышает толщину липидного бислоя d_m . Функция распределения воды описывает расположение молекул воды в бислое

В работах [39–42] нами был развит метод разделенных формфакторов (РФФ) для исследования везикулярных систем методом малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей. Применение этого метода к исследованию однослойных везикул ДМФХ позволило впервые получить важную информацию о свойствах везикулярных фосфолипидных систем [43, 44]. Приведем основные положения метода.

Макроскопическое когерентное сечение рассеяния нейтрона монодисперсной популяцией везикул определяется выражением [45]

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega_{\text{мон}}} (q) = nA^2(q)S(q), \quad (3)$$

где n — количество везикул в единице объема; q — модуль вектора рассеяния; $A(q)$ — амплитуда рассеяния нейтрона одной везикулой; $S(q)$ — структурный фактор популяции везикул. Проблема расчета структурного фактора решена в [42], где показано, что $S(q) \approx 1$ для концентрации липидов в образце 1 % по весу. В методе РФФ показано, что амплитуда рассеяния для везикулы записывается в виде

$$A_{\text{ves}}(q) = 4\pi \frac{R^2}{qR} \sin(qR) \int_{-d_m/2}^{d_m/2} \rho_c(x) \cos(qx) dx + 4\pi \frac{R}{qR} \cos(qR) \int_{-d_m/2}^{d_m/2} \rho_c(x)x \sin(qx) dx. \quad (4)$$

Здесь d_m — толщина мембраны (липидного бислоя); R — радиус везикулы; $\rho_c(x) = \rho(x) - \rho_{\text{D}_2\text{O}}$ — контраст; $\rho(x)$ — плотность длины рассеяния нейтрона вдоль нормали к плоскости бислоя; $\rho_{\text{D}_2\text{O}}$ — плотность длины рассеяния нейтрона тяжелой водой. В выражении (4) параметр размера R отделен от параметров бислоя d_m и $\rho(x)$. При этом появляется возможность описания внутренней структуры бислоя с помощью любых приближений функции $\rho(x)$. Для липидных везикул выполняется условие $R \gg d_m/2$. В предположении симметричности функции $\rho(x)$ имеем:

$$A_{\text{SFF}}(q) = 4\pi \frac{R^2}{qR} \sin(qR) \int_{-d_m/2}^{d_m/2} \rho_c(x) \cos(qx) dx. \quad (5)$$

Мы получили выражение для амплитуды рассеяния, в котором размер везикулы (радиус) и внутренняя структура бислоя (интеграл) разделены на два множителя. Разделение на два множителя важно, так как измеряемая в эксперименте интенсивность рассеяния пропорциональна квадрату амплитуды рассеяния. Теперь макроскопическое сечение рассеяния для монодисперсной популяции везикул записывается как

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega_{\text{мон}}} (q) = nF_s(q, R)F_b(q, d)S(q), \quad (6)$$

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

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

а $F_b(q, d)$ — формфактор симметричного липидного бислоя:

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

Выражение (6) составляет основу метода разделенных формфакторов. Разделение формфактора формы везикулы и формфактора бислоя позволяет описывать деформацию формы везикулы. Для везикул с формой вытянутого эллипсоида вращения с полуосями $(a, a, \varepsilon a)$ формфактор эллиптической поверхности записывается в виде [43]

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

где функция $A_E(z)$ записывается как

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

Липидная везикулярная система (популяция везикул) обладает полидисперсностью по размерам. Распределение везикул около среднего значения радиуса $\langle R \rangle$ (или среднего значения малой полуоси эллипса $\langle a \rangle$) описывается несимметричным распределением Шульца [46, 47]

$$G(R, \langle R \rangle) = \frac{R^m}{m!} \left(\frac{m+1}{\langle R \rangle} \right)^{m+1} \exp \left[-\frac{(m+1)R}{\langle R \rangle} \right], \quad (11)$$

где m — коэффициент полидисперсности. Относительное стандартное отклонение радиуса везикул определяется как

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{m+1}} \quad (12)$$

и характеризует полидисперсность везикулярной популяции.

На рис. 13 представлено гидрофобно-гидрофильное приближение, используемое для описания функции $\rho(x)$, а на рис. 14 — спектр малоуглового рассеяния нейтронов и расчетная кривая, из которой определялись форма вези-

кулы, полидисперсность размера, толщина липидного бислоя, толщина гидрофобной части бислоя. Полный набор параметров липидного бислоя, определенных на основе метода РФФ, представлен в табл. 1 для везикул, приготовленных экстракцией через поры диаметром 500 и 1000 Å. Применение метода РФФ к популяции везикул ДМФХ в различных фазовых состояниях [42, 43] продемонстрировало его высокую эффективность, что позволяет использовать в будущем этот метод для исследования морфологии и наноструктуры везикулярных переносчиков лекарств (фосфолипидная транспортная наносистема) в виде фосфолипидных наночастиц.

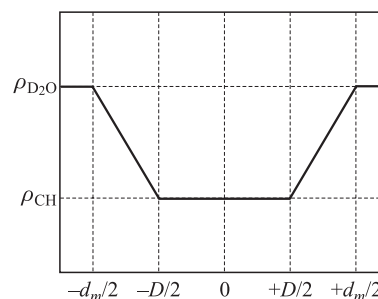


Рис. 13. Гидрофобно-гидрофильное приближение плотности длины рассеяния нейтрона вдоль нормали к плоскости бислоя. Свободные параметры: d_m — толщина бислоя, D — толщина гидрофобной части бислоя

Методом РФФ была впервые определена зависимость наноструктуры липидного бислоя ДМФХ в L_α -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 $R \approx 500 \text{ \AA}$, $d_m = 44,2 \text{ \AA}$,

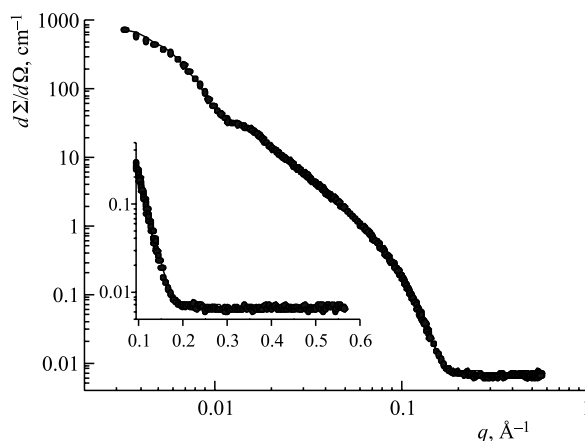


Рис. 14. Экспериментальное макроскопическое сечение рассеяния нейтронов от популяции однослойных везикул при $T = 30^\circ\text{C}$ (точки) и расчетная кривая в гидрофобно-гидрофильном приближении. Вставка показывает более детально кривую при больших значениях q

Таблица 1. Результаты расчетов для везикул ДМФХ в L_α -фазе ($T = 30^\circ\text{C}$)

$\langle R \rangle$ или $\langle a \rangle$, Å	ε	σ , %	d_m , Å	D , Å	N_w	A , Å ²
275,6	1	27	$47,8 \pm 0,2$	$20,5 \pm 0,3$	$11,9 \pm 0,3$	$61,0 \pm 0,4$
266	1,11	26	$48,9 \pm 0,2$	$19,9 \pm 0,4$	$12,8 \pm 0,3$	$60,7 \pm 0,5$
450	1	48	$45,5 \pm 0,6$	$20,8 \pm 0,4$	$10,8 \pm 0,4$	$62,6 \pm 1,0$

Примечание. $\langle a \rangle$ — среднее значение малой полуоси вытянутого эллипсоида вращения, ε — отношение большой и малой полуосей эллипса, $\langle R \rangle$ — средний радиус везикул для $\varepsilon \equiv 1$, σ — полидисперсность везикул (относительное среднеквадратичное отклонение радиуса или малой полуоси эллипса), d_m — толщина мембраны (липидного бислоя), D — толщина гидрофобной части липидного бислоя, N_w и A — количество молекул воды и площадь мембранной поверхности на одну молекулу ДМФХ.

$N_w = 7,2$ для $R = \infty$. Также было доказано, что форма однослойных везикул не является сферической. Отклонения формы везикулы от сферической более существенны в $L_{\beta'}$ - и $P_{\beta'}$ -фазах ($\varepsilon = 1,6$), чем в L_α -фазе ($\varepsilon = 1,1$) [42].

Важнейшей функцией плазматической мембраны клетки является ее проницаемость для молекул воды. Диффузия воды на плоских однослойных липидных мембранах ДПФХ происходит через поры диаметром 10–17 Å, образуемые в липидном бислое при наложении электрического поля или в момент фазового перехода из жидкокристаллической L_α -фазы в гель- $L_{\beta'}$ -фазу. При этом на 1 мм² плоской поверхности мембраны ДПФХ образуется около 50 пор [59]. Поверхность, занимаемая порами, составляет всего 10⁻⁸ % поверхности мембраны. Поэтому прямое измерение их размеров является нетривиальной задачей. Однако косвенно информацию о порах можно получать, измеряя другие параметры: например, электрический ток через мембрану, диффузию воды, функцию распределения воды.

Применение метода РФФ позволило рассчитать функцию распределения воды в липидном бислое однослойной везикулы ДМФХ в L_α -фазе. Было показано, что вероятность нахождения молекул воды в середине бислоя не равна нулю, как изображено на рис. 15 [44]. Полученные результаты принципиально отличаются от распределения воды в плоских многослойных мембранах. Исследования функции распределения воды, выполненные на многослойных мембранах ненасыщенного липида ПОФХ методом дифракции нейтронов, показали, что молекулы воды не проникают в область углеводородных хвостов [60].

Отличие в диффузии воды через однослойные и многослойные мембраны фосфолипидов носит принципиальный характер. Плазматическая мембрана является однослойной, поэтому исследование структуры и свойств многослойных мембран дифракционными методами не всегда дает правильную информацию о физических свойствах плазматической мембраны. Наиболее адекватным и, одновременно, более сложным является исследование однослойных

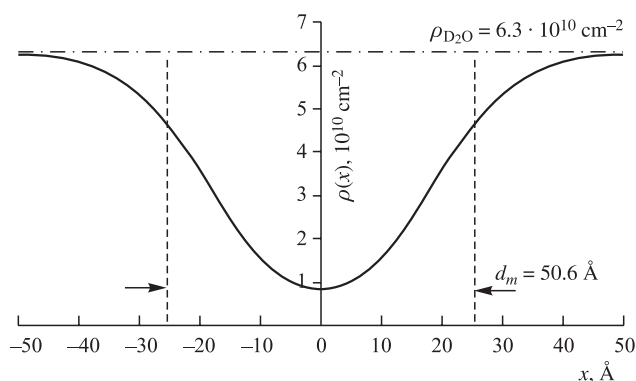


Рис. 15. Плотность длины рассеяния молекул D_2O в направлении нормали к липидному бислою однослойной липидной везикулы ДМФХ со средним радиусом $\langle R \rangle = 272 \text{ \AA}$ в большом избытке воды (D_2O). $T = 30^\circ\text{C}$ (L_α -фаза). Вертикальные штриховые линии изображают границу липидного бислоя

мембран (липидных бислоев) в избытке воды. Развитый нами метод РФФ позволяет выполнять такие исследования на современных высокопоточных нейтронных источниках, оснащенных установками малоуглового рассеяния с низким значением некогерентного фона.

4. ДИФРАКЦИЯ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

4.1. Дифракция в реальном времени на синхротронных источниках.

Процессы охлаждения и хранения биологической ткани при низких температурах важны как в медицине (хранение имплантатов, крови и т.д.), так и в микробиологии (хранение коллекции бактерий). Основной проблемой является наличие свободной воды в охлаждаемом объекте, которая при кристаллизации разрушает клетку. Диффузия свободной воды при охлаждении идет через плазматическую мембрану клетки в физиологический раствор. Задачей криобиологии является поиск криопротекторов и разработка технологии охлаждения, обеспечивающих быструю диффузию свободной воды через клеточную мембрану в окружающий раствор.

В течение 1999–2005 гг. автором была выполнена серия экспериментов по исследованию изменения наноструктуры мембран фосфолипидов при их охлаждении и влияния криопротекторов (диметилсульфоксида, глицерина) на этот процесс [48–50]. Для исследований использовалось три типа фосфолипидов: димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), дипальмитоилфосфатидилхо-

лин (ДПФХ) и дистеароилфосфатидилхолин (ДСФХ). Эти липиды имеют одинаковую полярную голову и отличаются длиной углеводородной цепочки. Количество атомов углерода в углеводородной цепочке молекул ДМФХ, ДПФХ и ДСФХ составляет соответственно 14, 16 и 18. Исследования проводились методом порошковой рентгеновской дифракции на канале D22 синхротронного источника DCI (LURE, Франция). Для получения необходимой информации важным является приготовление образцов. Тройная система фосфолипид/криопротектор/вода была изготовлена так, чтобы количество молекул связанной воды, свободной воды и воды в объемном водном растворе было соизмеримо. Для двойной системы ДПФХ/вода количество молекул связанной воды на молекулу ДПФХ в гель-фазе равно 10,8, а количество молекул свободной воды на молекулу ДПФХ равно 4. В многослойных липосомах ДПФХ, приготовленных с весовым соотношением липид/вода 1/1 (система 1/1), общее количество молекул воды на молекулу ДПФХ составляет 40,8, из которых 26 молекул находятся в объемном водном растворе, окружающем липосомы и образующем избыток воды. Аналогично системе 1/1 приготавливались тройные системы.

На рис. 16 представлена последовательность SAXS и WAXS дифракционных спектров, записанных в режиме реального времени на установке D22 при охлаждении многослойных везикул ДПФХ в избытке воды при температуре от 14,1 до $-55,5^{\circ}\text{C}$. Для записи спектров использовалось два детектора: SAXS и WAXS. Малоугловая дифракция (SAXS) в интервале температур от 14,1 до $-19,4^{\circ}\text{C}$ соответствует началу кристаллизации гель- $L_{\beta'}$ -фазы в L_c -фазу. Сдвиг дифракционного пика при $T = -19,4^{\circ}\text{C}$ в сторону больших значений вектора рассеяния q соответствует уменьшению периода повторяемости мембраны d на величину $\Delta d = (5,9 \pm 0,6) \text{ \AA}$. Резкое (за время 1–2 мин) уменьшение периода повторяемости мембраны связано с образованием льда в объемной воде, окружающей везикулы. Спектр широкоугольной дифракции (WAXS) при $T = -19,4^{\circ}\text{C}$ демонстрирует образование трех дифракционных пиков, соответствующих гексагональной решетке кристаллов льда с минимальными межплоскостными расстояниями решетки: 3,9, 3,6, 3,4 \AA . При $T = 14,1^{\circ}\text{C}$ широкоугольная дифракция от углеводородных хвостов демонстрирует (2,0) пик при $q = (1,49 \pm 0,002) \text{ \AA}^{-1}$ и широкое (1,2) «плечо» при $q = (1,53 \pm 0,01) \text{ \AA}^{-1}$.

Положение этих двух дифракционных рефлексов соответствует прямоугольной ячейке с постоянными решетки $a = (8,46 \pm 0,01) \text{ \AA}$, $b = (9,38 \pm 0,07) \text{ \AA}$, что соответствует упаковке углеводородных хвостов ДПФХ в гель- $L_{\beta'}$ -фазе. Рефлексы (2,0) и (1,2) монотонно отодвигаются друг от друга при охлаждении до температуры образования льда, достигая положения $(1,46 \pm 0,002) \text{ \AA}^{-1}$ и $(1,58 \pm 0,002) \text{ \AA}^{-1}$, что соответствует прямоугольной ячейке $a = (8,61 \pm 0,01) \text{ \AA}$ и $b = (8,97 \pm 0,08) \text{ \AA}$. Происходит медленное преобразование $L_{\beta'}$ -фазы в кристаллическую L_c -фазу.

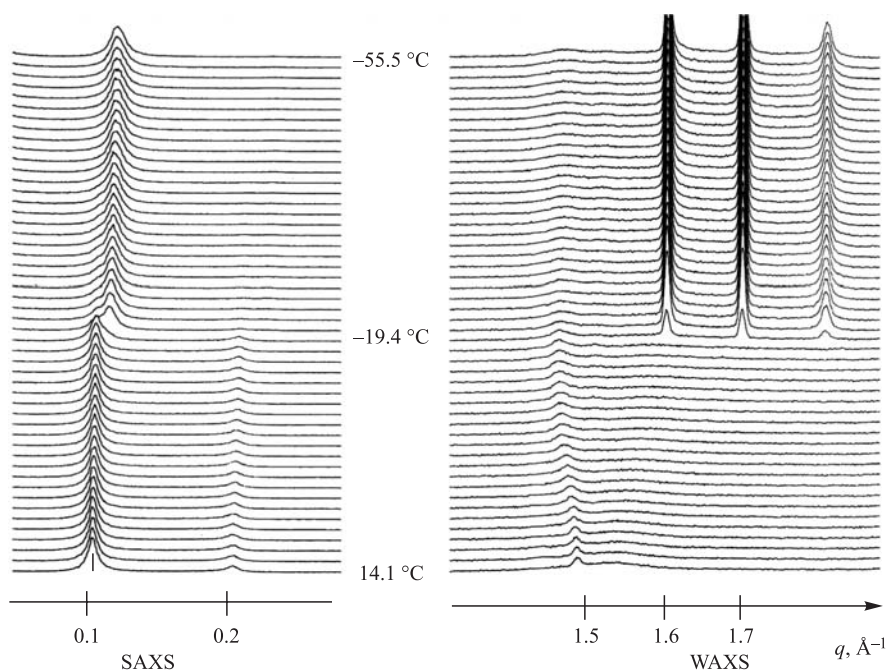


Рис. 16. Последовательность SAXS и WAXS дифракционных спектров, записанных в реальном времени при охлаждении многослойных везикул ДПФХ в избытке воды. SAXS спектры имеют два дифракционных пика от многослойной структуры ДПФХ в ламеллярном направлении. WAXS спектры соответствуют дифракции от двумерной решетки углеводородных хвостов (маленький пик при $T = 14,1\text{ °C}$) и дифракции от гексагонального льда (три пика при $T_{\text{ice}} = -19,4\text{ °C}$). Скорость охлаждения $1,5\text{ °C/мин}$. Время набора одного спектра 1 мин

На рис. 17 представлены SAXS и WAXS дифракционные спектры, записанные в реальном времени при охлаждении многослойных везикул тройной системы ДПФХ/ДМСО/вода с $X_{\text{DMSO}} = 0,05$. При температуре $-23,2\text{ °C}$ происходит образование льда без изменения величины периода повторяемости. При температуре $-37,5\text{ °C}$ возникает новая многослойная L_{sr} -фаза, которая сосуществует с основной L_{c} -фазой при дальнейшем охлаждении. Образование фазы с большим содержанием растворителя зависит от типа криопротектора (при использовании глицерина L_{sr} -фаза не образуется) и от длины углеводородной цепочки фосфолипида. L_{sr} -фаза образуется при длине цепи больше или равной 16.

Главным результатом представленных экспериментов является обнаружение новой L_{sr} -фазы в тройных системах фосфолипид/ДМСО/вода. На сегодня

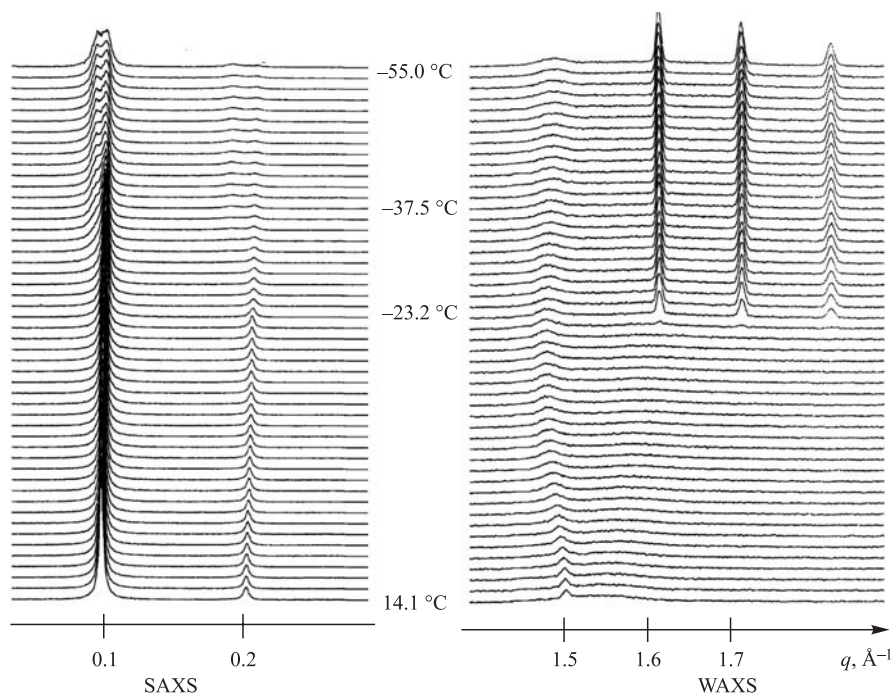


Рис. 17. Последовательность SAXS и WAXS дифракционных спектров, записанных в реальном времени при охлаждении многослойных везикул ДПФХ/ДМСО/вода с $X_{\text{DMSO}} = 0,05$. SAXS спектры соответствуют дифракции от многослойной структуры ДПФХ. WAXS спектры соответствуют дифракции от двумерной решетки углеводородных хвостов (маленький пик при $T = 14,1^\circ\text{C}$) и дифракции от гексагонального льда (три пика при $T_{\text{ice}} = -23,2^\circ\text{C}$). Скорость охлаждения $1,5^\circ\text{C}/\text{мин}$. Время набора одного спектра 1 мин

не существует теоретического объяснения этого явления. Скорее всего, оно связано со спецификой взаимодействия молекул ДМСО с углеводородными цепочками.

4.2. Дифракция в реальном времени на импульсных источниках нейтронов. Основным преимуществом кинетических экспериментов на синхротронных источниках является возможность фиксировать структурные изменения с временными характеристиками порядка 1 мин. На рис. 16 видно, что при $T = -19,4^\circ\text{C}$ в момент образования льда происходит диффузия свободной воды за время 1–2 мин из межмембранного пространства многослойных липосом. Применение метода времени пролета на импульсных реакторах позволяет проводить измерения в большем объеме обратного пространства по

сравнению с дифракционными измерениями, выполняемыми на монохроматических пучках синхротронных источников или реакторов постоянной мощности. Наиболее перспективно исследование кинетических процессов, временные характеристики которых составляют десятки минут и более. К таким процессам относится диффузия связанной воды в многослойных фосфолипидных мембранах, ориентированных на кварцевых подложках и частично гидратированных. В таких образцах гидратация осуществляется в основном связанной водой, которая, в свою очередь, состоит из слабосвязанной и сильносвязанной воды, как изображено на рис. 18.

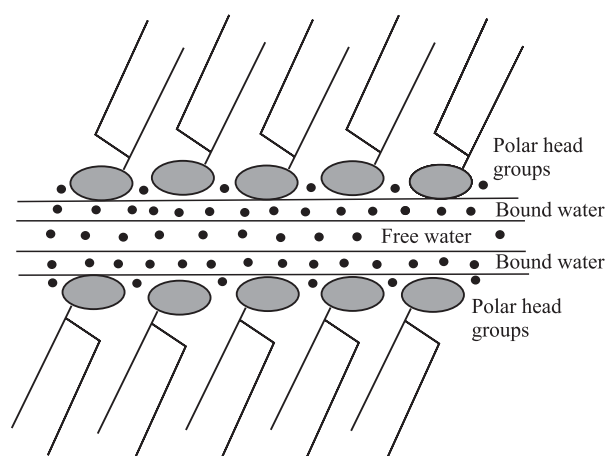


Рис. 18. Расположение молекул воды внутри межмембранного пространства. Схематично изображено расположение трех типов молекул воды: свободной (в центре межмембранного пространства), слабосвязанной (в межмембранном пространстве около области полярных голов), сильносвязанной (в области полярных голов липидных молекул)

На дифрактометре по времени пролета ДН-2 импульсного реактора ИБР-2 была проведена одновременная регистрация нескольких (до пяти, при минимальном времени накопления статистики 3 мин) порядков отражения от ламеллярной структуры многослойной мембраны ДПФХ, ориентированной на кварцевой подложке, как изображено на рис. 19 [51]. Исследовалась кинетика диффузии воды для случая гидратации мембраны ДПФХ парами воды при переходе из состояния с комнатными условиями к высокой относительной влажности (RH) паров воды и затем дегидратации, при переходе к низкой относительной влажности: [46 % RH] → [97 % RH] → [58 % RH]. Одновременная регистрация нескольких порядков отражения позволяет вычислять распределение плотности длины рассеяния нейтронов в соответствии с

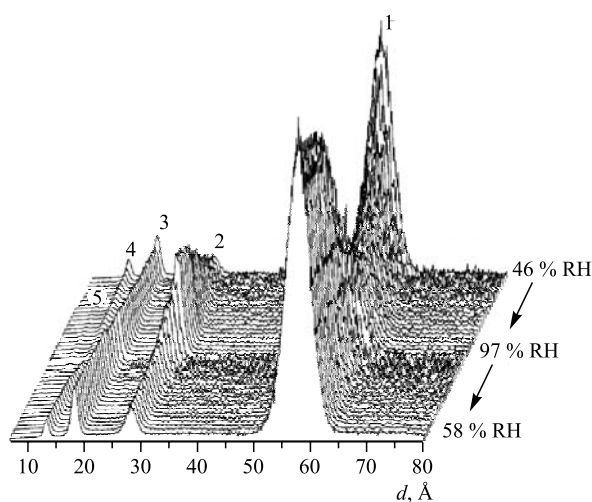


Рис. 19. Последовательность нейтронных дифракционных спектров от мембраны ДПФХ, измеренных в реальном времени в процессе гидратации и последующей дегидратации мембраны. Указаны номера порядков отражения. Пятый дифракционный пик становится виден через полтора часа после начала процесса гидратации. Спектр, соответствующий мембране в состоянии равновесия при 58% относительной влажности, содержит четыре видимых дифракционных пика

уравнением (1) как функцию времени и, соответственно, проследивать последовательность кинетических изменений в процессе гидратации-дегидратации следующих параметров мембраны: периода повторяемости мембраны $d(t)$, толщины липидного бислоя $d_b(t)$, толщины водной прослойки $d_w(t)$, толщины области углеводородных хвостов $d_c(t)$. Анализ, проведенный в [51], показал, что зависимости $d(t)$, $d_b(t)$, $d_w(t)$, $d_c(t)$ хорошо описываются экспоненциальными законами, что позволяет определить временные характеристики кинетических изменений.

Влажность воздуха в камере образца задается парами насыщенных растворов солей. При помещении в камеру раствора, увеличивающего влажность, возникает систематическая ошибка, связанная с медленным увеличением влажности внутри камеры. Процесс дегидратации не вызывает такой проблемы, так как открытие камеры мгновенно уменьшает влажность до комнатной. Поэтому временные характеристики, полученные при дегидратации, более важны. Толщина липидной мембраны является суммой двух компонентов, $d_b = d_c + d_{ph}$. Характерные времена изменения d_b в начале процесса дегидратации мембраны ($\tau = 27$ мин) сильно отличаются от аналогичных характеристик для d_w ($\tau = 15$ мин) и d_c ($\tau = 18$ мин). Таким образом, кинетические

тика гидратации области полярных голов примерно в два раза медленнее по сравнению с кинетикой гидратации водной прослойки. Отсюда следует вывод о том, что диффузия сильносвязанной воды в липидных мембранах идет в два раза медленнее по сравнению с диффузией слабосвязанной воды.

5. ДИФРАКЦИЯ НЕЙТРОНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ СТРУКТУРЫ ЛИПИДНОЙ МАТРИЦЫ ВЕРХНЕГО СЛОЯ КОЖИ

Дифракция нейтронов по сравнению с дифракцией рентгеновских лучей имеет важное преимущество, связанное с определением знаков структурных факторов в уравнении (1). По этой причине первые работы на новых структурах следует проводить на нейтронных источниках, а уточнение структуры в избытке воды возможно в дальнейшем на синхротронных источниках рентгеновского излучения. Именно так исторически развивались исследования фосфолипидных мембран. История повторилась и с исследованиями мембран на основе церамидов. Первая работа, в которой структура модельной мембраны верхнего слоя кожи была определена с хорошим пространственным разрешением, была выполнена методом дифракции нейтронов на дифрактометре V1 Берлинского центра по рассеянию нейтронов в 2005 г. [35]. Затем для исследования аналогичной мембраны в избытке воды методом дифракции в реальном времени было применено синхротронное излучение [36]. В настоящее время исследования модельных мембран SC в избытке воды ведутся методом дифракции рентгеновского излучения на спектрометре ДИКСИ синхротронного источника КЦСИиНТ (Москва) [37].

В работе [35] была создана ориентированная на кварцевой подложке модельная мембрана SC, обладающая низкой мозаичностью. При создании этой мембраны использовались четыре основных компонента, входящих в состав липидной матрицы SC. Молекулярная структура липидов, используемых при приготовлении этой мембраны, показана на рис. 20.

Создание высокоориентированной мембраны позволило провести измерение пяти порядков отражения от ее многослойной структуры и, соответственно, построить распределение плотности длины рассеяния нейтрона в направлении перпендикуляра к мембране $\rho_s(x)$ (рис. 22). Для сравнения на рис. 21 представлена функция $\rho_s(x)$ для многослойной мембраны ДМФХ, измеренной в аналогичных условиях на том же самом инструменте. Два наблюдаемых на рис. 22 максимума функции $\rho_s(x)$ (слева и справа) соответствуют положению областей полярных голов липидов. Минимум при $x = 0$ соответствует положению CH_3 групп молекул церамида-6 и пальмитиновой кислоты. Вычисленный фурье-профиль модельной мембраны SC не имеет на концах уменьшения $\rho_s(x)$, типичного для фосфолипидов и соответствующего заполненному водой межмембранному пространству. Такой спад $\rho_s(x)$ по-

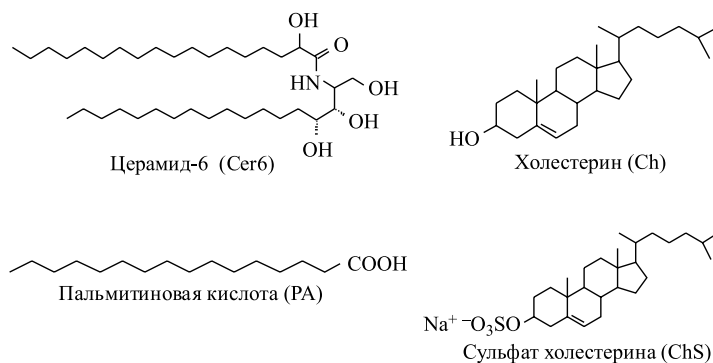


Рис. 20. Молекулярная структура компонентов модельной мембраны липидной матрицы SC млекопитающих с композицией Cer6/Ch/PA/ChS

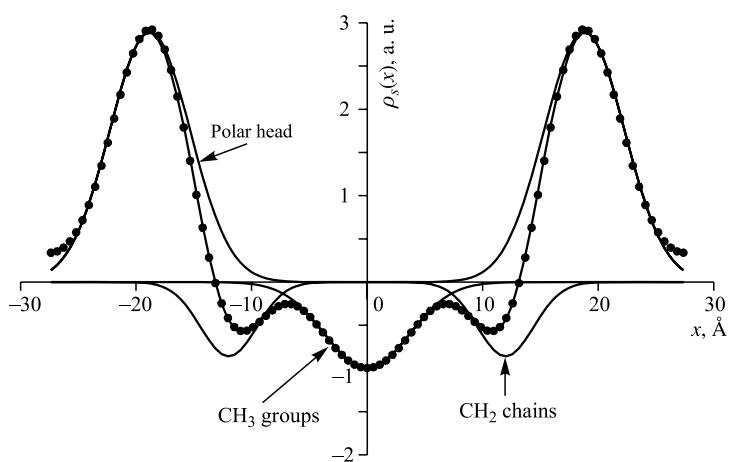


Рис. 21. Распределение плотности длины рассеяния нейтрона $\rho_s(x)$ в многослойной мембране ДМФХ при RH = 60%, $T = 32^\circ\text{C}$ и 8%-м содержании D_2O (точки) и расчетные кривые. Стрелки показывают положение трех молекулярных групп: групп CH_3 , цепочек CH_2 и групп полярных голов

казан на рис. 21 для многослойной мембраны ДМФХ, измеренной в тех же самых экспериментальных условиях. Для четырехкомпонентной мембраны Cer6/Ch/PA/ChS = 55/25/15/5 $d_{\text{ph}} = 45,6 \text{ \AA}$ является расстоянием между максимумами, относящимися к полярным группам. Одинаковые значения d_{ph} и d говорят о том, что межмембранное пространство достаточно мало, чтобы быть измеренным в дифракционном эксперименте. Важным выводом, основанным на проведенном фурье-синтезе, является равенство $d_m = d_{\text{ph}} = d$, из которого

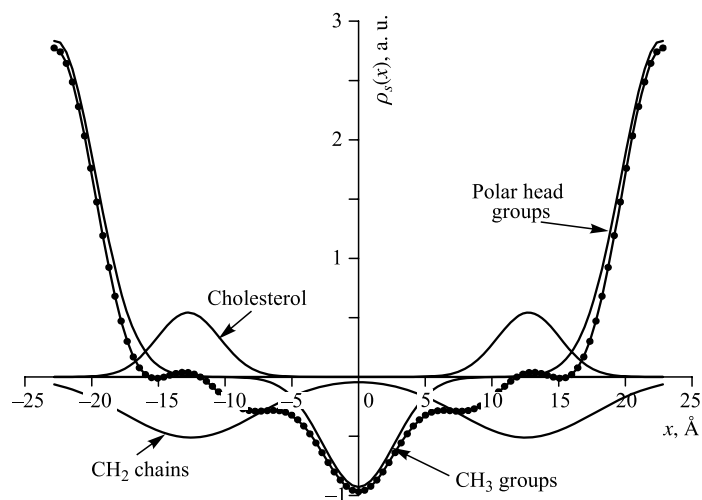


Рис. 22. Распределение плотности длины рассеяния нейтрона $\rho_s(x)$ в многослойной мембране с композицией Cer6/Ch/PA/ChS и весовым соотношением компонентов 55/25/15/5 при RH = 60 %, $T = 32^\circ\text{C}$ и 8 %-м содержании D₂O (точки) и расчетные кривые. Стрелки показывают положение четырех молекулярных групп: групп CH₃, цепочек CH₂, холестерина и групп полярных голов

следует, что толщина слоя воды в межмембранном пространстве $d_w \approx 0$ при относительной влажности RH = 60 %.

Положение холестеринового максимума в функции $\rho_s(x)$ при $x = 12,8 \text{ \AA}$ соответствует положению стероидных ядер. Этот вывод был в дальнейшем подтвержден экспериментами с применением дейтерированного холестерина [52]. Полученные структурные результаты для липидной мембраны с композицией Cer6/Ch/PA/ChS и весовым соотношением компонентов 55/25/15/5 в избытке воды при $T = 32^\circ\text{C}$ представлены на рис. 23.

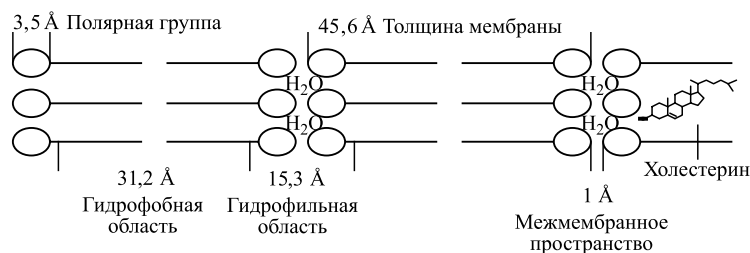


Рис. 23. Наноструктура мембраны с композицией Cer6/Ch/PA/ChS и весовым соотношением компонентов 55/25/15/5 при полной гидратации и $T = 32^\circ\text{C}$

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 [58]. 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 [53]. Применение длинноцепочечных жирных кислот должно было привести к увеличению периода повторяемости мембраны. Однако результаты экспериментов, представленные на рис. 24, показали,

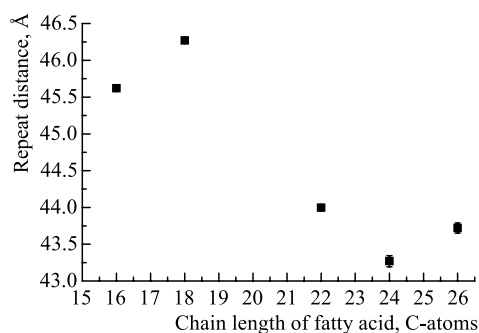


Рис. 24. Зависимость периода повторяемости модельной мембраны SC от длины углеводородной цепочки жирной кислоты, выраженной количеством атомов углерода в ней, C. Для пальмитиновой кислоты C = 16

что при увеличении длины молекулы кислоты происходит уменьшение периода повторяемости и толщины мембраны. Введение в состав мембраны более длинных молекул кислоты не может разрушить сверхсильное взаимодействие, создаваемое церамидом-6, и поэтому длинные углеводородные цепочки жирных кислот начинают проникать в углеводородное пространство соседнего монослоя, как изображено на рис. 25 для случая церотовой кислоты (C = 26). Даже для самой длинноцепочечной кислоты (C = 26) ее длины не хватает, чтобы полностью за-

полнить пространство соседнего монослоя. Минимизация свободного пространства выражается в уменьшении толщины бислоя, наблюдаемом в эксперименте. Проникновение молекул длинноцепочечных кислот в соседний монослой было показано в дальнейших экспериментах с применением дейтерированных липидов. Фурье-профили плотности длины рассеяния мембраны, построенной с применением длинноцепочечных жирных кислот, дейтерированных в конце углеводородной цепочки, ясно демонстрировали проникновение дейтерированной метки в соседний монослой [54].

Следующим шагом в экспериментальном доказательстве явления сверхсильного межмембранного взаимодействия, создаваемого церамидом-6 в липидной матрице, было исследование наноструктуры мембран, построенных с введением в их состав длинноцепочечного церамида-1

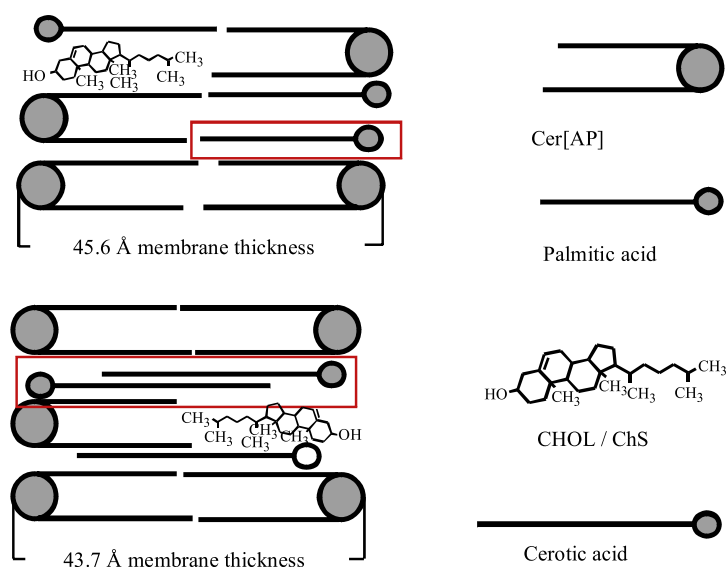


Рис. 25. Структура модельной мембраны SC, построенной с пальмитиновой и церотовой кислотами. Углеводородные цепочки молекул церотовой кислоты проникают в соседний монослой мембраны

(Cer[EOS]). Была изготовлена многослойная мембрана с составом Cer[EOS](Cer1)/Cer[AP](Cer6)/Ch/BA с весовым соотношением компонентов 23/10/33/33. Исследования ее структуры методом дифракции нейтронов показали, что толщина липидного бислоя такой мембраны 47,5 Å близка к толщине мембраны с составом Cer6/Ch/PA/ChS — 45,6 Å [56]. Длина жирнокислотного остатка молекулы Cer1 превышает на 30 атомов углерода длину жирнокислотного остатка молекулы Cer6, что соответствует разнице примерно 37 Å в длине молекул Cer1 и Cer6. Молекула Cer1 не может уложиться в один липидный бислой и проникает в соседний бислой, как изображено на рис. 26. Основным выводом проведенных в [56] исследований является то, что молекулы длинноцепочечного церамида не могут разрушить сверхсильное взаимодействие, создаваемое молекулами Cer6, и образовать длиннопериодную фазу с периодом повторяемости 130 Å.

Наличие в составе мембраны длинноцепочечного церамида-1 является необходимым, но недостаточным условием формирования длиннопериодной фазы. Достаточным условием формирования длиннопериодной фазы является полная гидратация мембраны и низкое значение pH воды, pH = 6–7. Длиннопериодная фаза обнаружена нами при проведении измерений мембран с

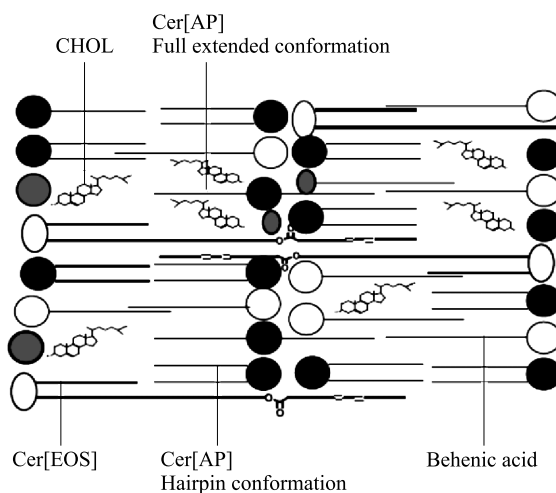


Рис. 26. Структура модельной мембраны SC с составом Cer[EOS](Cer1)/Cer[AP](Cer6)/Ch/BA = 23/10/33/33. Молекулы длинноцепочечного Cer1 проникают в соседний бислои. Молекулы короткоцепочечного Cer6 находятся в двух конформациях: hairpin и full extended

весовым соотношением компонентов Cer1/Cer6/Chol/PA/ChS = 30/30/20/15/5 в избытке воды при значениях pH = 7,2 [61]. Методом дифракции рентгеновского синхротронного излучения исследовались многослойные везикулы в области ламеллярной и латеральной дифракции. На рис. 27 представлен спектр, демонстрирующий три порядка отражения (L_1 , L_2 , L_3) от длиннопериодной фазы с периодом повторяемости 126,7 Å. При этом часть образца находится в короткопериодной фазе с периодом повторяемости 46,7 Å.

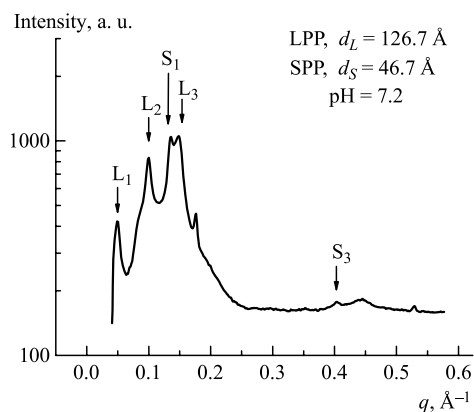


Рис. 27. Спектр ламеллярной дифракции от многослойных везикул в избытке воды с pH = 7,2. LPP — длиннопериодная фаза, SPP — короткопериодная фаза. Спектрометр ДИКСИ (синхротронный источник КЦСИиНТ, Курчатовский институт)

На рис. 27 виден первый S_1 и третий S_3 порядки отражения от короткопериодной фазы многослойной мембраны. Увеличение pH до 9 вызывает переход липидного бислоя из кристаллического в жидкокристаллическое состояние. При этом происходит разрушение длиннопериодной фазы.

Главным выводом проведенных в [35, 52–57] исследований являлось экспериментальное доказательство сверхсильного межмембранного взаимодействия, создаваемого молекулами церамида-6, находящимися в состоянии полностью протяженной конформации (full extended), как изображено на рис. 26. Это свойство церамида-6 определяет механическую прочность липидной матрицы SC и препятствует гидрофильной диффузии воды и лекарств в латеральном направлении. Отсюда следует важный практический вывод о том, что главным направлением диффузии через липидную матрицу SC будет липофильный путь в ламеллярном (перпендикулярном бислою) направлении. Для усиления липофильной диффузии следует применять вещества, увеличивающие дефекты в мембранной поверхности. Одним из путей увеличения дефектов является образование двухфазных систем с развитой доменной структурой. Как было показано нами в [50], этим свойством обладает ДМСО — жидкость, нанесение которой на кожу увеличивает ее проницаемость. Это свойство ДМСО используется при изготовлении лекарств, применяемых трансдермально.

6. ОРИЕНТАЦИЯ ЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ В МАГНИТНОМ ПОЛЕ

Углеводородные цепи фосфолипидов обладают различной диамагнитной восприимчивостью в направлении вдоль цепи и в перпендикулярном. Благодаря этому фосфолипидные молекулы, организованные в бислое (мембрану), обладают анизотропией диамагнитной восприимчивости в двух взаимно перпендикулярных направлениях: в направлении плоскости мембраны и в направлении нормали к мембранной поверхности $\Delta\chi = \chi_{||} - \chi_{\perp}$, что приводит к их ориентации в магнитном поле. Оси углеводородных цепочек липидов ориентируются перпендикулярно к направлению вектора напряженности магнитного поля. Анизотропия максимальна для насыщенных фосфолипидов. Для ДМФХ в жидкой L_{α} -фазе анизотропия диамагнитной восприимчивости характеризуется величиной $\Delta\chi_{\text{ДМФХ}} = -1,06 \cdot 10^{-29}$ эрг·Гс⁻². Параметр ориентации β плоского бислоя ДМФХ в магнитном поле напряженностью H зависит от количества липидных молекул N , образующих бислое [62]:

$$\beta = \frac{N |\Delta\chi_{\text{ДМФХ}}| H^2}{k_B T}. \quad (13)$$

Энергия теплового движения $k_B T$ при комнатной температуре составляет $4 \cdot 10^{-14}$ эрг. Так как величина $\Delta\chi_{\text{ДМФХ}}$ мала, то для получения эффекта

ориентации требуется большое количество молекул липида в бислое и (или) использование сильных магнитных полей (более 10^4 Гс = 1 Тл), так чтобы числитель уравнения (13) был соизмерим с $k_B T$. С другой стороны, измерение степени ориентации липидного бислоя или более сложных структур позволяет определять количество липидных молекул, образующих надмолекулярную структуру.

В работе [63] было обнаружено влияние магнитного поля на нейтронный дифракционный спектр от многослойных везикул ДМФХ в избытке воды. Спектры измерялись на малоугловом спектрометре PAXY (LLB, Сакле, Франция), оснащенный двухмерным ПЧД.

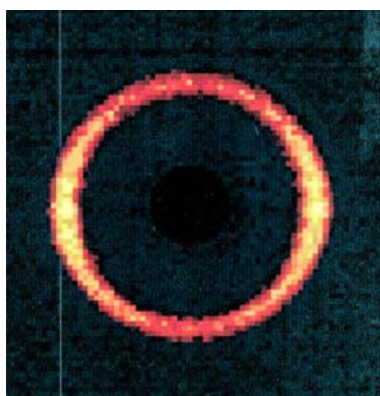


Рис. 28. Дифракционная картина от многослойных везикул ДМФХ в магнитном поле 2 Тл, записанная на двухмерном ПЧД спектрометра PAXY (LLB, Франция). Магнитное поле направлено вертикально относительно изображения

Измерения проводились в магнитном поле 0 и 2 Тл, создаваемом горизонтальным электромагнитом, установленным на пучке спектрометра. Образец в кварцевой кювете «Hellma» толщиной 2 мм помещался между полюсами электромагнита. Температура образца составляла $(24 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, концентрация ДМФХ в D_2O — 15 мМ (1% по весу). Дифракционная картина, регистрируемая двухмерным ПЧД, представлена на рис. 28. При наличии магнитного поля 2 Тл видна анизотропия рассеяния. При отключении магнитного поля анизотропия изображения на рис. 28 исчезает и интенсивность дифракционного пика становится аксиально-симметричной. Включение поля восстанавливает анизотропию рассеяния, возникающую из-за деформации многослойных везикул и их ориентации вдоль направления магнитного поля.

Степень ориентации липидного бислоя (степень деформации многослойной везикулы) можно охарактеризовать параметром ориентации

$$\beta = 2 \ln \left(\frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}} \right). \quad (14)$$

Здесь I_{\perp} — интенсивность рассеяния в направлении, перпендикулярном направлению магнитного поля; I_{\parallel} — интенсивность рассеяния в направлении, параллельном направлению магнитного поля. Для ДМФХ при $T = 24^\circ\text{C}$ $\beta = 1,06$ при наложении поля 2 Тл. Деформация везикул существенно уменьшается при переходе бислоя ДМФХ из жидкокристаллической фазы в гелевую. При $T = 10^\circ\text{C}$ $\beta = 0,46$ при наложении поля 2 Тл.

Многослойная липидная везикула имеет размеры порядка 1 мк, содержит сотни повторяющихся липидных бислоев и состоит из 10^7 – 10^9 молекул ДМФХ. Однослойная везикула ДМФХ диаметром 500 Å состоит из 10^4 молекул ДМФХ. Разница в три порядка между числом молекул в однослойных и многослойных везикулах делает весьма затруднительным определение деформации и ориентации однослойных везикул в малоугловом нейтронном эксперименте. Впервые ориентация однослойных везикул диаметром 500 Å была обнаружена экспериментально при их помещении в магнитное поле 4 Тл [64]. На рис. 29 схематично изображена однослойная липидная везикула без внешнего магнитного поля и ее деформация вдоль направления магнитного поля, которая возникает при включении внешнего магнитного поля. Описанный в [64] эффект ориентации везикул достаточно слабый, что не позволяет сделать количественный расчет величины деформации формы везикулы. Применение липидных бислоев с меньшим модулем упругости и использование в будущем сверхпроводящих магнитов с полями больше 10 Тл позволит развить методику измерения упругих свойств везикулярных переносчиков лекарств через кожу. Основным требованием к таким переносчикам являются высокие деформационные свойства, позволяющие везикулам существенно изменять форму при прохождении узких каналов липидной матрицы верхнего слоя кожи [65]. Формулирование (молекулярный дизайн) таких переносчиков наиболее эффективно с одновременной диагностикой их упругих и деформационных свойств методом МУРН с наложением магнитного поля.

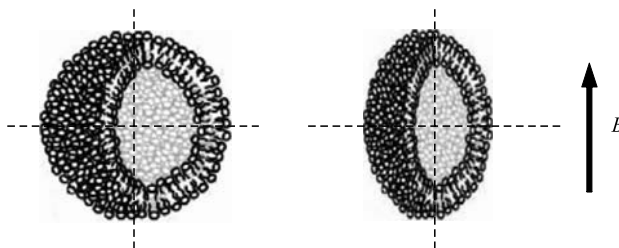


Рис. 29. Однослойная сферическая везикула в воде в отсутствие внешнего магнитного поля (слева). При включении магнитного поля происходит деформация формы везикулы и ее ориентация вдоль направления магнитного поля

Ориентация липидных молекул в сильных магнитных полях также использовалась нами для исследования процесса самосборки липидного бислоя в смешанных липид-детергентных системах с ионным детергентом хлоридом натрия и неионным детергентом $C_{12}E_8$. Изучение самосборки модельных биологических мембран важно как для понимания физико-химических основ существования липидного бислоя, так и для развития методов рекон-

струкции мембранных белков. Наиболее существенным моментом в процессе самосборки липидного бислоя в смешанной системе фосфолипид/детергент является преобразование надмолекулярных наноструктур из мицеллярного состояния в везикулярное [66]. Малоугловое рассеяние нейтронов и рентгеновских лучей успешно используется для исследования таких преобразований [39, 67–69].

Чрезвычайно удобным подходом к изучению самосборки липидных мембран является создание систем, в которых мицелло-везикулярный переход возникает при изменении температуры системы. Температурно-индуцированный мицелло-везикулярный переход наблюдается в различных смешанных системах: яичный лецитин/октилглюкозид [70], фосфатидилхолин/холат натрия [71], фосфатидилхолин/ $C_{12}E_8$ [72]. Использование температурочувствительных систем дает ряд существенных преимуществ для исследования мицелло-везикулярного перехода, главными из которых являются постоянство концентраций веществ в образце и возможность многократного индуцирования перехода в одном и том же образце, обуславливаемая полной обратимостью перехода. Более того, эволюция системы может быть остановлена на любой ее стадии, что позволяет проводить измерения при стационарных изотермических условиях. Мицелло-везикулярный переход в системе ДМФХ/холат натрия исследовался нами методом малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей [39, 63, 73]. Было показано, что как в системе с ионным детергентом (холат натрия), так и в системе с неионным детергентом ($C_{12}E_8$) в процессе медленного увеличения температуры ($0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$) происходит следующая последовательность морфологических изменений наноструктуры частиц: сферическая мицелла, эллиптическая мицелла, стержнеобразная мицелла, гауссов клубок стержнеобразных мицелл, однослойная везикула, многослойная везикула. Наблюдение всей последовательности морфологических преобразований от сферической мицеллы до многослойной везикулы в одном образце невозможно. Для этого требуется несколько образцов с различной концентрацией детергента. Но переход из мицеллярного в везикулярное состояние, т. е. процесс самосборки липидного бислоя (образование мембраны), происходит в одном образце, как показано на рис. 30 и в табл. 2. Анализ спектров МУРН выполнялся в приближении Гинье

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = \frac{d\Sigma}{d\Omega}(0)q^a \exp[-q^2b], \quad (15)$$

здесь параметр a определяет морфологию частицы: $a = 0$ для сферических или эллиптических мицелл, $a = -1$ для стержнеобразных мицелл и $a = -2$ для плоских протяженных мембран или везикул. Радиус инерции наночастицы определяется по значению параметра b , что, совместно со знанием морфологии частицы, позволяет определять ее геометрические параметры. На рис. 30 представлено преобразование наноструктуры агрегатов от мицелл-

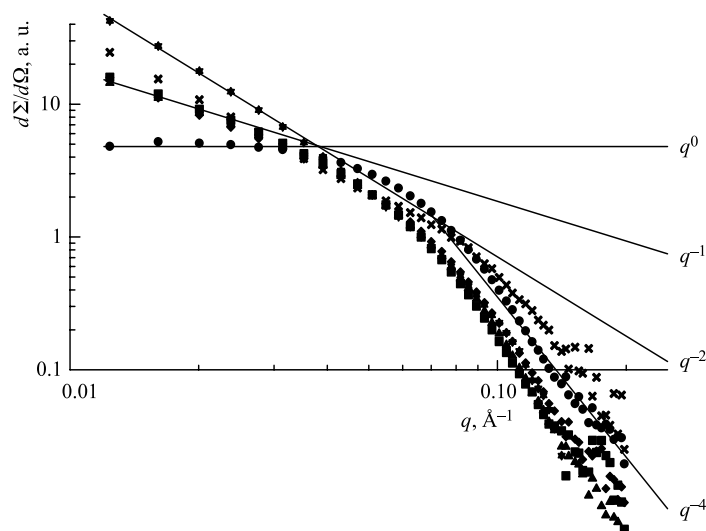


Рис. 30. Кривые малоуглового рассеяния от смешанных агрегатов ДМФХ/холат натрия в D_2O . Крестики — 15 мМ ДМФХ/12 мМ холата натрия при $T = 20^\circ C$. Остальные точки соответствуют концентрации 15 мМ ДМФХ/6 мМ холата натрия при $T = 20^\circ C$ (квадраты), $T = 25^\circ C$ (треугольники), $T = 30^\circ C$ (крестики), $T = 40^\circ C$ (звездочки). Переход из мицеллярного в везикулярное состояние происходит за счет увеличения температуры образца. Спектрометр ЮМО (Дубна) [73]

Таблица 2. Параметры наноструктуры смешанных 15 мМ ДМФХ/ 6 мМ NaC агрегатов в D_2O . RL — стержнеобразные мицеллы с эллиптическим сечением и полуосями a и b , GC — гауссов клубок из стержнеобразных мицелл с эллиптическим сечением и полуосями a и b , UV — однослойные везикулы с толщиной бислоя d_G

Параметры	Тип частицы								
	RL				GC		UV		
$T, ^\circ C$	20	25	28	30	33	35	40	50	60
$a, \text{Å}$	21,7	20,8	19,9	19,6	19,5	19,3			
$b, \text{Å}$	38,7	36,4	35,4	34,2	34,3	33,0			
$d_G, \text{Å}$							35,2	35,6	36

лярной системы с $a = 0$ в систему стержнеобразных мицелл с $a = -1$ и, окончательно, в везикулярную систему с $a = -2$. Определенные из эксперимента параметры смешанной системы 15 мМ ДМФХ/6 мМ холата натрия содержит табл. 2. При температуре $20^\circ C$ наноструктура смешанных агрегатов ДМФХ/NaC представляет собой стержнеобразные мицеллы с сечением в

виде эллипса с полуосями $a = (21,7 \pm 0,5) \text{ \AA}$ и $b = (38,7 \pm 0,5) \text{ \AA}$, что соответствует соотношению полуосей $\varepsilon = 1,8$. При увеличении температуры до 30°C сечение этих мицелл уменьшается без существенного изменения величины ε . При 33°C система невзаимодействующих стержнеобразных мицелл преобразуется в гауссов клубок стержнеобразных мицелл, но эллиптическое сечение мицеллы существенно не изменяется. При 40°C происходит самосборка липидного бислоя и образуются однослойные везикулы больших размеров. При этом толщина липидного бислоя увеличивается с увеличением температуры.

Увеличение толщины мембраны с ростом температуры объясняется выходом молекул холата натрия из липидного бислоя в окружающую воду, т. е. температурной зависимостью критической концентрации мицеллообразования (СМС) для холата натрия. Температурная зависимость СМС холата натрия была определена методом титрационной калориметрии [74]. В зависимости от рН и ионной силы воды минимум СМС находится между 22 и 27°C . Для рН = $7,5$ и концентрации холата натрия $0,1 \text{ M}$ СМС равна $12,5 \text{ mM}$ при 10°C , затем СМС, при увеличении температуры до 24°C , уменьшается до 10 mM (минимум) и монотонно увеличивается до значения $15,5 \text{ mM}$ при 70°C [74]. Такая зависимость СМС от температуры является физико-химической основой температурно-индуцированного мицелло-везикулярного перехода. Аналогичные температурно-индуцированные мицелло-везикулярные переходы были исследованы методом МУРН в смешанных системах с неионным детергентом C_{12}E_8 .

Наиболее важной, но малоизученной является структура, предшествующая образованию бислоя. Анализ спектров МУРН, выполненный для ионного и неионного детергентов, говорит о том, что кривая рассеяния перед образованием бислоя соответствует гауссову клубку [73]. Для получения большей информации об этой особенности были проведены измерения в сильных магнитных полях на малоугловом спектрометре V4, оснащенный сверхпроводящим магнитом [63]. Для исследований были выбраны два образца с различной концентрацией неионного детергента: 45 mM ДМФХ/ 12 mM C_{12}E_8 и 45 mM ДМФХ/ 18 mM C_{12}E_8 . Величина магнитного поля составляла 0 и 4 Tл . Кривые малоуглового рассеяния для образца с концентрацией липидов 45 mM ДМФХ/ 12 mM C_{12}E_8 представлены на рис. 31. Кривые измерялись при температуре образца 10°C без магнитного поля и с включенным полем величиной 4 Tл . Кривая МУРН без магнитного поля соответствует рассеянию от гауссова клубка стержнеобразных мицелл с круглым поперечным сечением мицеллы. При включении магнитного поля 4 Tл увеличивается интенсивность рассеяния в области малых значений вектора рассеяния, что демонстрирует увеличение размера гауссова клубка. Длина персистентности L_p гауссова клубка стержнеобразных мицелл вычислялась из графика Хольтцера, а размеры поперечного сечения — из графика Гинье. Параметры гауссова клубка без поля составили:

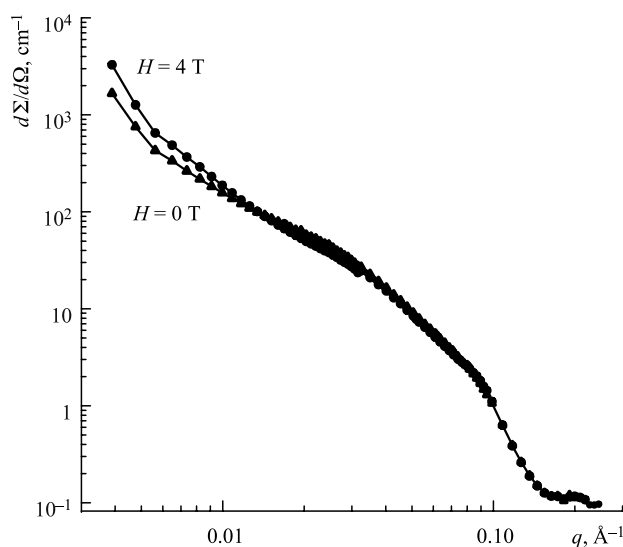


Рис. 31. Спектры малоуглового рассеяния от гауссова клубка стержнеобразных мицелл 45 мМ ДМФХ/12 мМ $C_{12}E_8$ без и в магнитном поле 4 Тл. Температура образца 10°C

$L_p = (170 \pm 15) \text{ \AA}$, радиус поперечного сечения мицеллы $R = (28 \pm 1) \text{ \AA}$. В магнитном поле $H = 4 \text{ Тл}$ $L_p = (160 \pm 15) \text{ \AA}$, $R = (26,0 \pm 2) \text{ \AA}$. Как видно, ни длина персистентности клубка, ни радиус его сечения не меняются при наложении магнитного поля.

Постоянное значение L_p без поля и при включении поля дает возможность утверждать, что гауссов клубок состоит именно из стержнеобразных, а не нитевидных мицелл, так как нитевидные мицеллы должны менять персистентную длину при их вытягивании в магнитном поле. Длина стержнеобразных мицелл $L = 2L_p$ [45]. Концы стержнеобразных мицелл являются областями с высоким содержанием детергента. Эти концы обладают высокой эластичностью и подвижностью в угловом расположении одной стержнеобразной мицеллы относительно другой. При наложении магнитного поля происходит изменение углового распределения в местах соединения стержнеобразных мицелл, при этом длина самих стержней $L = (320 \pm 30) \text{ \AA}$ не меняется. Можно назвать такую структуру полимероподобной. Как видно на рис. 31, в области малых значений вектора рассеяния q макроскопическое сечение существенно изменяется при наложении магнитного поля. Это изменение демонстрирует изменение ориентации гауссова клубка. Изотропное пространственное распределение углов между соседними стержнеобразными мицеллами в гауссовом клубке, существующее без поля, изменяется

при наложении поля на анизотропное, которое сопровождается вытягиванием клубка вдоль поля. Движение клубка является кооперативным, так как, в соответствии с уравнением (13), в нем должно участвовать много молекул. Для проверки того, что движение является кооперативным, т. е. стержнеобразные мицеллы связаны между собой, были выполнены измерения на системе, состоящей из невзаимодействующих эллиптических мицелл. Такая система получается при увеличении концентрации детергента и соответствует смеси 45 мМ ДМФХ/18 мМ $C_{12}E_8$. Малоугловые измерения, проведенные на мицеллах с концентрацией липидов 45 мМ ДМФХ/18 мМ $C_{12}E_8$, показали, что спектры МУРН, измеренные без поля и при наложении магнитного поля 4 Тл, полностью совпадают. На рис. 32 показан спектр МУРН, измеренный на такой системе при температуре образца 10°C и магнитном поле 4 Тл. Анализ кривой рассеяния в приближении Гинье говорит о том, что мицеллы имеют эллиптическую форму со значениями полуосей $27,5 \text{ \AA}$ и $(81,6 \pm 2,5) \text{ \AA}$.

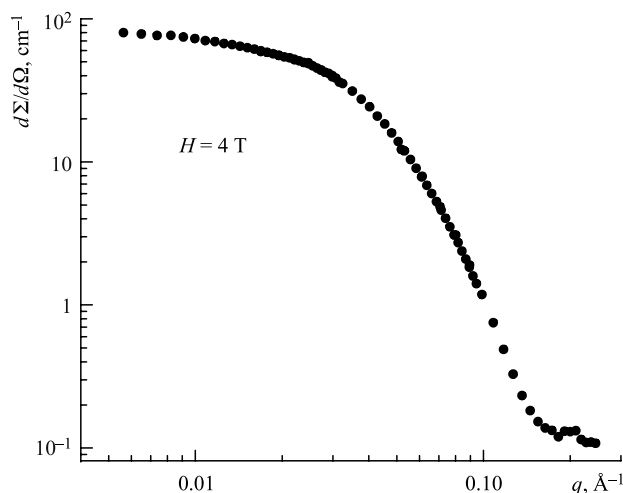


Рис. 32. Спектр малоуглового рассеяния от эллиптических мицелл 45 мМ ДМФХ/18 мМ $C_{12}E_8$ в магнитном поле 4 Тл. Температура образца 10°C

Как было сказано выше, для исследования самосборки липидного бислоя наиболее удобны системы, в которых самосборка происходит при увеличении температуры. Естественно, возникает вопрос о зависимости параметров самосборки от скорости роста температуры. В представленных выше экспериментах наборы спектров производились при фиксированной температуре, а изменение температуры образцов со скоростью примерно $0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$ производилось между измерениями. Большой объем образца (1–2 мл) и инерционность системы нагрева термостатов, используемых на малоугловых нейтрон-

ных спектрометрах, не позволяют нагревать образец в кварцевой кювете со скоростью выше $1^\circ\text{C}/\text{мин}$. Размер пучка на синхротронном источнике (около $0,1 \times 1$ мм) существенно меньше размера нейтронного пучка (около 14 мм в диаметре), что позволяет использовать для измерений объема образца в несколько микролитров. В этом случае возможен быстрый нагрев образца со скоростью около $100^\circ\text{C}/\text{мин}$ (путем инъекции образца в предварительно разогретый капилляр).

Температурно-индуцированные мицелло-везикулярные переходы в смешанных системах с ионным (холат натрия) и неионным (C_{12}E_8) детергентами исследовались методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на установке D22 синхротронного источника DCI (LURE, Франция). Главный результат, представленный на рис. 33, заключается в формировании смешанных монодисперсных везикул при скачке температуры со скоростью более $100^\circ\text{C}/\text{мин}$ в системе ДМФХ/холат натрия. При быстром температурном скачке были получены качественные спектры с осцилляциями (рис. 33), характерными для сферических однослойных везикул. Радиус везикул составляет 225 \AA . Большая амплитуда осцилляций говорит о низкой полидисперсности размеров везикул и, следовательно, о прецизионности молекулярного механизма их формирования. Помимо этого было обнаружено, что малые везикулы стабильны в течение нескольких часов, что свидетельствует о том, что не происходит деградации системы и, следовательно, нельзя говорить о кинетической эволюции, основанной на слиянии или делении везикул. Малая

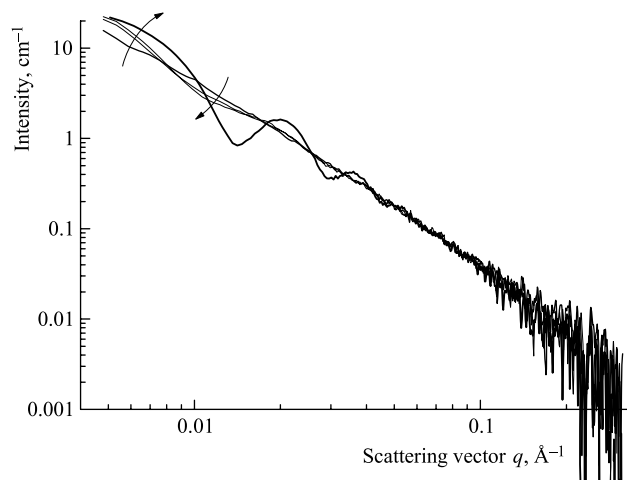


Рис. 33. Малоугловые рентгеновские спектры системы 15 мМ ДМФХ/8 мМ NaC в водно-сахарозном буфере (40 % сахарозы) при различных скоростях нагрева. Стрелки показывают расположение спектров в соответствии с увеличением скорости нагрева ($< 5, 5, 20$ и $100^\circ\text{C}/\text{мин}$)

амплитуда осцилляций на кривой рассеяния, полученная для более медленных скоростей увеличения температуры, говорит о большом размере и высокой полидисперсности полученных везикул. При уменьшении скорости нагрева системы увеличивается как размер, так и полидисперсность везикул. Образующиеся при переходе промежуточные структуры и сам путь перехода зависят от скорости изменения температуры.

Аналогичные измерения с системой ДМФХ/ $C_{12}E_8$, основанной на неионном детергенте с углеводородной цепочкой, проникающей в бислои, показали, что, вне зависимости от скорости нагрева образца, всегда образуются большие везикулы с высокой полидисперсностью. Создание везикулярных систем малого радиуса и полидисперсности на основе применения $C_{12}E_8$ невозможно. Процесс самосборки липидного бислоя в присутствии детергента $C_{12}E_8$ не зависит от скорости нагрева, в то время как система на основе холата натрия демонстрирует существенную зависимость морфологии конечных структур от скорости нагрева.

Представленные нейтронные и рентгеновские синхротронные исследования позволили сформировать последовательность процесса самосборки липидного бислоя в исследуемых системах, представленную на рис. 34. Первый шаг (А) — это мицеллы с малым процентным содержанием ДМФХ и большим содержанием детергента, структура которых близка к сферической. Нагрев таких систем не приводит к самосборке липидного бислоя, так как процесс морфологических преобразований заканчивается на стадии стержнеобразных мицелл.

Мицеллы, содержания детергента в которых при их нагреве достаточно для самосборки мембраны, как правило, имеют эллиптическую форму (В) за счет маленького радиуса кривизны участков мицеллы, обогащенных детергентом. Дальнейшее уменьшение содержания детергента в системе или увеличение температуры приводит к образованию стержнеобразных мицелл, торцевые стороны которых обогащены детергентом (С). При медленном квазистатическом нагреве образца стержнеобразные мицеллы соединяются торцами, образуя гауссов клубок (В). Такую структуру мы назвали полимероподобной. Незначительное нагревание системы приводит к самосборке липидного бислоя, который при дальнейшем нагревании преобразуется в многослойные везикулы. Бислои после самосборки мембраны существуют в виде больших однослойных замкнутых или незамкнутых везикул, не исключено и существование бислоя в виде плоских структур. Определение точного типа таких структур выходит за рамки современных возможностей малоуглового рассеяния.

Быстрый нагрев системы на основе холата натрия от состояния В приводит к образованию однослойных везикул низкой полидисперсности и малого радиуса (225 Å). Быстрый нагрев системы на основе детергента $C_{12}E_8$ от состояния В образует везикулы с большой полидисперсностью и большим

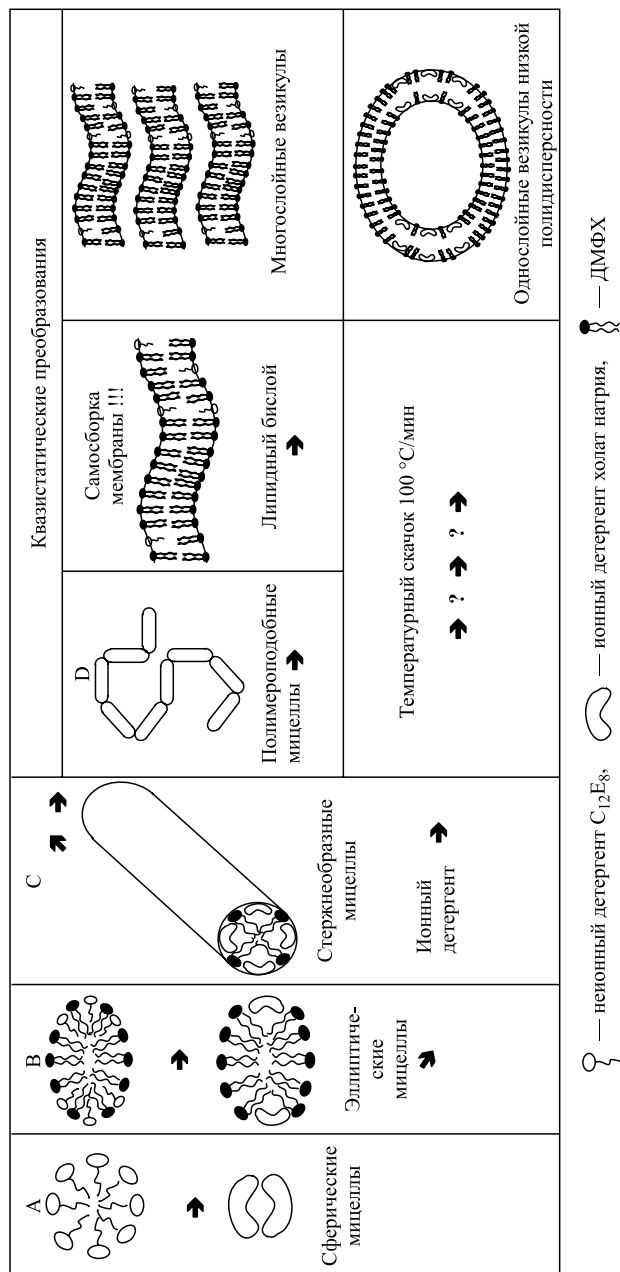


Рис. 34. Последовательность морфологических преобразований при температурно-индуцированной самосборке мембраны в смешанных липид-детергентных системах

радиусом. Таким образом, в процессе изучения самосборки мембраны был разработан новый метод создания везикул низкой полидисперсности в системе ДМФХ/холат натрия. Также впервые для исследования процесса самосборки применялась ориентация липидов в сильных магнитных полях.

7. ВЗАИМОДОПОЛНЯЮЩЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДИФРАКЦИИ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ, МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ЯВЛЕНИЯ ДМСО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ДЕГИДРАТАЦИИ МЕЖМЕМБРАННОГО ПРОСТРАНСТВА

Не существует одного метода, позволяющего получить всю необходимую информацию о свойствах и структуре липидных мембран. Наиболее эффективно взаимодополняющее применение различных методов. В данном разделе обзора мы продемонстрируем это общепризнанное утверждение на примере применения дифракции рентгеновского синхротронного излучения, МУРН и ДСК, результатом которого стало описание явления ДМСО-индуцированной дегидратации межмембранного пространства в фосфолипидных системах [75, 76].

Дифракция в реальном времени при нагревании системы ДПФХ/ДМСО/вода использовалась для определения зависимости структуры мембраны ДМФХ от концентрации ДМСО. ДСК использовалась для определения температуры фазовых переходов. Обобщенные результаты экспериментов представлены на рис. 35.

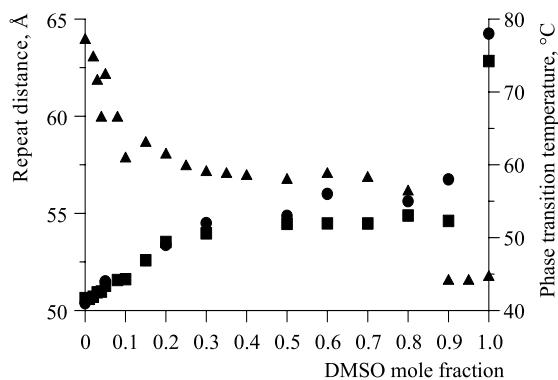


Рис. 35. Зависимость температуры главного фазового перехода T_{ph} и периода повторяемости мембраны ДПФХ от мольной фракции ДМСО. ● — T_{ph} , определенная из дифракции в реальном времени; ■ — T_{ph} , определенная из ДСК; ▲ — период повторяемости многослойной структуры при $T = 20$ °C

На рис. 35 представлены результаты калориметрических и дифракционных исследований фазовых переходов: зависимость температуры главного фазового перехода T_{ph} от концентрации ДМСО и зависимость периода повторяемости мембраны d от концентрации ДМСО при $T = 20^\circ\text{C}$. Значения T_{ph} , полученные из дифракционных и калориметрических экспериментов, находятся в хорошем соответствии. Можно разделить весь диапазон концентраций ДМСО на три области. Первая — область малых концентраций $0,0 \leq X_{\text{DMSO}} \leq 0,3$, в которой происходят существенные изменения в значениях d и T_{ph} . Вторая — область промежуточных концентраций $0,3 \leq X_{\text{DMSO}} \leq 0,8$, в которой значения d и T_{ph} не меняются. Третья — область больших концентраций ДМСО. При приближении концентрации к значению мольной фракции $X_{\text{DMSO}} = 1$ (чистый ДМСО) происходит переход в фазу с маленьким периодом повторяемости $d = (52 \pm 0,8) \text{ \AA}$ и большой температурой фазового перехода $T_{ph} = 75^\circ\text{C}$.

Полученные в [75, 76] результаты синхротронных экспериментов говорят о том, что начиная с $X_{\text{DMSO}} = 0,1$ взаимодействие ДМСО и мембраны меняется. При $X_{\text{DMSO}} \geq 0,1$ мембрана ДПФХ не имеет предперехода и существует прямой фазовый переход из гель-фазы в жидкокристаллическую фазу за счет плавления углеводородных хвостов. При этом фазовый переход из гель- в жидкокристаллическую фазу имеет область сосуществования двух фаз и гистерезис. На рис. 36 показана зависимость периода повторяемости мембраны от температуры для $X_{\text{DMSO}} = 0,2$. Период повторяемости ДПФХ имеет постоянное значение $d = (57,9 \pm 0,3) \text{ \AA}$ при нагревании от комнатной температуры до температуры фазового перехода из гель- в жидкокристаллическую фазу. Жидкокристаллическая фаза образуется при $48,4^\circ\text{C}$ с $d = (51,6 \pm 0,3) \text{ \AA}$ и сосуществует с гель-фазой до температуры $49,4^\circ\text{C}$. При охлаждении от 53°C до комнатной температуры гель-фаза образуется при $47,6^\circ\text{C}$ с $d = (57,9 \pm 0,3) \text{ \AA}$, а жидкокристаллическая фаза исчезает при $47,1^\circ\text{C}$. Сосуществование двух фаз в области фазового перехода связано с сосуществованием в температурном интервале около 1°C развитой поверхности раздела двух фаз, через которую может идти липофильная диффузия веществ. Таким образом, ДМСО является термотропным усилителем липофильной диффузии.

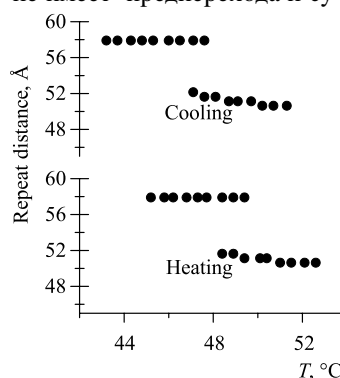


Рис. 36. Зависимость периода повторяемости мембраны ДПФХ при нагревании и охлаждении для $X_{\text{DMSO}} = 0,2$. Скорость изменения температуры $1^\circ\text{C}/\text{мин}$. Время набора спектра 1 мин

При малых концентрациях ДМСО наблюдается уменьшение периода повторяемости мембраны. Период повторяемости мембраны

$$d = d_m + d_w \quad (16)$$

состоит из двух слагаемых: толщины водной прослойки d_w и толщины мембраны d_m . Из представленных дифракционных результатов не ясно, что является причиной уменьшения периода повторяемости — уменьшение толщины водной прослойки d_w или уменьшение толщины липидного бислоя d_m . Для ответа на вопрос о зависимости величины d_m от концентрации ДМСО была выполнена серия экспериментов методом малоуглового рассеяния нейтронов на однослойных липидных везикулах из ДПФХ, приготовленных в смесях тяжелой воды с дейтерированным ДМСО (CD_3SO). Этим наши исследования отличались от работ, основанных только на дифракции рентгеновских лучей [77, 78]. Использовались везикулы, приготовленные экструзией через поры диаметром 2000 и 500 Å. Для везикул, экструдированных через поры диаметром 2000 Å, толщина мембраны определялась в приближении Гинье. Приближение Гинье имеет систематическую ошибку, поэтому толщину мембраны, определенную в этом приближении, мы обозначаем d_G [43]. Как

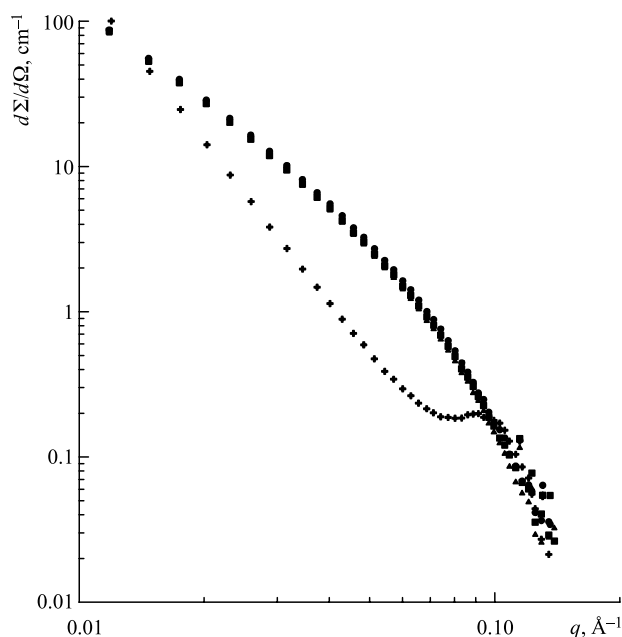


Рис. 37. Спектры малоуглового рассеяния для везикул, экструдированных через поры диаметром 2000 Å, для $X_{\text{DMSO}} = 0,0$ (●), 0,05 (■), 0,10 (▲), 0,20 (+). Измерения проведены при $T = 20^\circ\text{C}$

видно на рис. 37, спектры малоуглового рассеяния для $X_{\text{DMSO}} = 0, 0,05, 0,10$ практически совпадают. Численный расчет толщины мембраны d_G дает следующий результат: $d_G = (49,6 \pm 1,0) \text{ \AA}$ для $X_{\text{DMSO}} = 0$, $d_G = (49,2 \pm 1,0) \text{ \AA}$ для $X_{\text{DMSO}} = 0,05$, $d_G = (50,1 \pm 1,0) \text{ \AA}$ для $X_{\text{DMSO}} = 0,10$. Несмотря на тенденцию к увеличению толщины мембраны, в рамках точности эксперимента, величина d_G не меняется [75].

При $X_{\text{DMSO}} = 0,2$ спектр малоуглового рассеяния существенно изменяется, появляется дифракционный пик в области больших q , что соответствует формированию многослойных везикул с периодом повторяемости $(62,4 \pm 2) \text{ \AA}$, что совпадает с величиной d , определенной в синхротронных экспериментах. Нейтронный малоугловой эксперимент был повторен на везикулах, приготовленных экструзией через поры диаметром 500 \AA . Такие везикулы отличаются большей стабильностью к агрегации в многослойные, что дает возможность измерить кривую малоуглового рассеяния от однослойных везикул с $X_{\text{DMSO}} = 0,15$. Полученные спектры когерентного малоуглового рассеяния представлены на рис. 38. Результаты расчетов величины d_G содержит табл. 3. При увеличении концентрации ДМСО до $X_{\text{DMSO}} = 0,1$ толщина мембраны

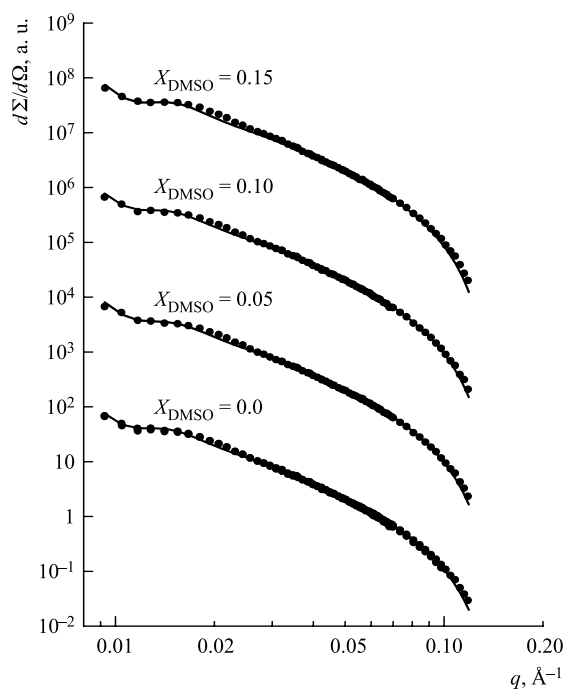


Рис. 38. Спектры малоуглового рассеяния для везикул, экструдированных через поры диаметром 500 \AA , для $X_{\text{DMSO}} = 0,0, 0,05, 0,10, 0,15$. Измерения проведены при $T = 20^\circ\text{C}$. Для наглядности спектры раздвинуты вдоль оси ординат

Таблица 3. Толщина бислоя d_G мембраны ДПФХ в зависимости от концентрации ДМСО при $T = 20^\circ\text{C}$ для везикул, экстрадированных через поры диаметром 500 \AA

X_{DMSO}	0,0	0,05	0,10	0,15
$d_G, \text{ \AA}$	$48,1 \pm 0,9$	$49,5 \pm 1,0$	$50,4 \pm 1,0$	$50,3 \pm 1,0$

увеличивается на $(2,3 \pm 1,9) \text{ \AA}$. Причиной увеличения толщины мембраны является проникновение молекул ДМСО в липидный бислой.

Таким образом, комбинацией рентгеновской синхротронной дифракции и малоуглового рассеяния нейтронов установлено, что в области малых концентраций ДМСО происходит уменьшение толщины водной прослойки между бислоями (см. рис. 18). Так как вода в этой прослойке делится на свободную и связанную, то представляет интерес разобраться с изменением состава свободной и связанной воды при воздействии ДМСО. Для решения этой проблемы использовался метод ДСК при охлаждении [19].

На рис. 39 представлены калориметрические кривые ($X_{\text{DMSO}} = 0,0, 0,01, 0,03, 0,05, 0,08, 0,1, 0,15$) для двойной системы ДМСО/вода при охлаждении от 20 до -130°C со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. Для двойной системы ДМСО/вода существует только один экзотермический переход в измеренном диапазоне

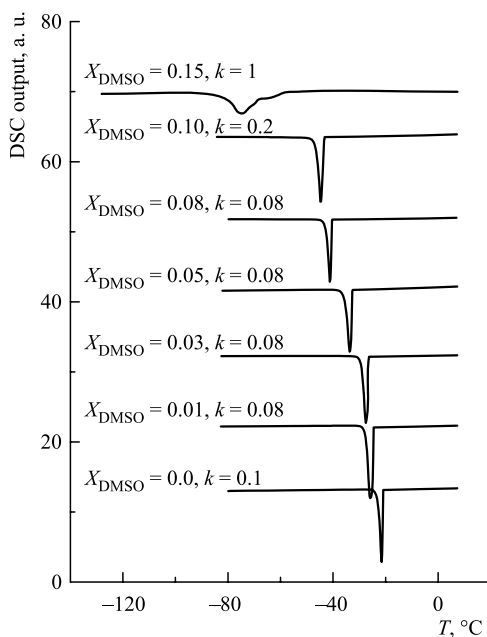


Рис. 39. Сигнал ДСК, записанный при охлаждении системы ДМСО/вода от 20 до -130°C со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. Калориметрические кривые нарисованы в различном масштабе (масштабные коэффициенты k представлены на рисунке). Экзотермические фазовые переходы при $X_{\text{DMSO}} \leq 0,1$ соответствуют кристаллизации воды. Фазовый переход при $X_{\text{DMSO}} = 0,15$ соответствует образованию двухфазной системы: лед и эвтектика

температур. В интервале концентраций $0,0 \leq X_{\text{DMSO}} \leq 0,1$ ширина калориметрического пика достаточно мала, что позволяет точно определять температуру кристаллизации воды по точке пересечения начальной линейной части ДСК-кривой с базовой линией. Для более высокой концентрации $X_{\text{DMSO}} = 0,15$ переход становится широким и с меньшей величиной энтальпии. На рис. 39 величина сигнала ДСК для разных концентраций ДМСО умножена на масштабные коэффициенты k , которые введены для удобства изображения. Фазовый переход для растворов с $X_{\text{DMSO}} \leq 0,10$ соответствует созданию из однофазного идеального раствора двухфазной системы, состоящей из льда и жидкого раствора ДМСО/вода. Температура образования эвтектики для системы ДМСО/вода равна $-(63 \pm 1)^\circ\text{C}$. Экзотермический переход в растворе с $X_{\text{DMSO}} = 0,15$ при $T = -74,5^\circ\text{C}$ соответствует формированию льда и твердого $\text{DMSO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ гидрата.

На рис. 40 представлены калориметрические кривые для изучаемой тройной системы ДПФХ/ДМСО/вода ($X_{\text{DMSO}} = 0,0, 0,01, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,1$), полученные при тех же условиях, что и для двойной системы ДМСО/вода. При охлаждении от 20 до -130°C наблюдается два экзотермических фазовых перехода. Первый фазовый переход имеет температуру, близкую к температуре экзотермического фазового перехода используемого растворителя, и определяется формированием льда в избытке растворителя,

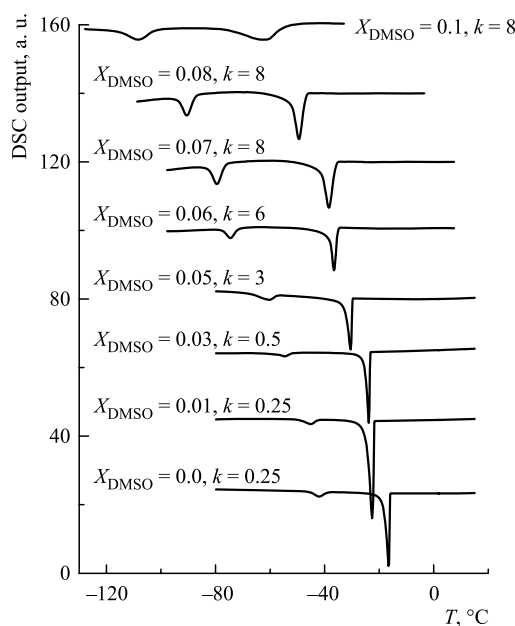


Рис. 40. Сигнал ДСК, записанный при охлаждении системы ДПФХ/ДМСО/вода при тех же условиях, что и на рис. 39. Первый переход соответствует формированию льда в объеме растворителя, второй фазовый переход соответствует стеклованию раствора в межмембранном пространстве. Фазовые переходы при $X_{\text{DMSO}} = 0,1$ близки по величине и трудно регистрируемы по причине малости сигнала ДСК

окружающего липосомы ДПФХ. При дальнейшем охлаждении происходит второй экзотермический фазовый переход, природа которого связана со стеклованием растворителя в межмембранном пространстве [19]. Масштабный множитель k на рис. 40 вводится по тем же причинам, что и на рис. 39. Важным на рис. 40 является отношение амплитуд первого и второго экзотермического пика. Эта величина уменьшается при увеличении концентрации ДМСО, что соответствует изменению баланса между энергией, выделяемой при кристаллизации воды в объеме растворителя, и энергией структурного перехода, происходящего в межмембранном пространстве. В соответствии с нашими результатами и фазовой диаграммой системы ДМСО/вода [79] при увеличении концентрации ДМСО количество льда, образуемого в окружающем липосомы растворителе, уменьшается по сравнению с количеством «замерзшего» растворителя в межмембранном пространстве. Для $X_{\text{DMSO}} \geq 0,06$ второй фазовый переход является переходом межмембранного растворителя в эвтектическое состояние.

Количественной характеристикой изучаемой тройной системы является температура плавления льда, которая определялась при нагревании системы. Температура плавления была выбрана как численная характеристика фазового перехода, так как эта температура соответствует концу процесса плавления, когда композиция жидкости (молярная фракция ДМСО) тройной системы соответствует композиции системы без льда. На рис. 41 представлены зависимости температуры плавления от молярной 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

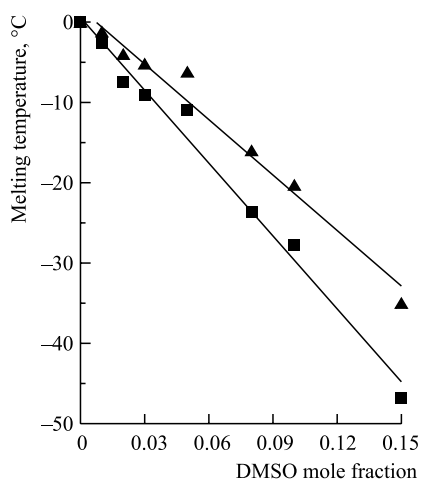


Рис. 41. Зависимость температуры плавления льда от молярной фракции ДМСО для тройной системы ДПФХ/ДМСО/вода (■) и для двойной системы ДМСО/вода (▲). Температура плавления определялась как offset-температура на кривой ДСК. Экспериментальная зависимость хорошо описывается линейной функцией

ДМСО в окружающем липосомы растворителе отличается от концентрации ДМСО в растворителе, используемом при приготовлении образцов. Изменение концентрации обусловлено тем, что часть молекул воды в тройной системе ДПФХ/ДМСО/вода имеет водородные связи с полярными головками молекул. Эта связанная вода не смешивается с ДМСО. Реальная концентрация ДМСО в объеме растворителя X'_{DMSO} тройной системы выше концентрации X_{DMSO} в двойной системе ДМСО/вода. Представляет интерес определить количество молекул воды, приходящееся на одну молекулу ДПФХ, которое не смешивается с молекулами ДМСО. Описание зависимости температуры плавления льда от концентрации ДМСО линейной функцией (рис. 41) дает для двойной системы уравнение

$$T_{\text{bin}}(X_{\text{DMSO}}) = -230,3X_{\text{DMSO}} + 1,7 \quad (17)$$

и для тройной системы уравнение

$$T_{\text{ter}}(X_{\text{DMSO}}) = -302,4X_{\text{DMSO}} + 0,58. \quad (18)$$

Используя условие равенства температур плавления

$$T_{\text{bin}}(X_{\text{DMSO}}) = T_{\text{ter}}(X'_{\text{DMSO}}) \quad (19)$$

и учитывая условия приготовления образцов

$$\frac{N_{\text{DMSO}} + N_w}{N_{\text{lip}}} = 40,8, \quad (20)$$

можно вычислить, что $(10 \pm 2,6)$ молекул H_2O никогда не смешиваются с молекулами ДМСО и что

$$X'_{\text{DMSO}} = 1,32X_{\text{DMSO}}. \quad (21)$$

Полученная величина «несмешиваемых» молекул воды совпадает с хорошо известным количеством молекул воды, связанных с полярной головкой одной молекулы ДПФХ, определенным из калориметрических измерений и равным 10–11 молекул [19]. Таким образом, связанная вода имеет два важных свойства. Первое — она не замерзает при первом экзотермическом переходе [19]. Второе свойство связанной воды вытекает из представленных результатов — молекулы связанной воды не смешиваются с молекулами ДМСО.

«Несмешиваемость» молекул связанной воды с молекулами ДМСО доказывает, что молекулы ДМСО проникают только в область свободной воды. При этом существенно уменьшается толщина межмембранного пространства. Это явление было названо ДМСО-индуцированной дегидратацией межмембранного пространства [75].

В работе [75] был сделан расчет уменьшения количества молекул свободной воды в межмембранном пространстве под действием ДМСО. Расчет основывался на экспериментальном факте о «несмешиваемости» молекул ДМСО со связанной водой в межмембранном пространстве и на предположении о том, что концентрации ДМСО в объемном растворе и внутри межмембранного пространства равны. Результаты проведенных расчетов показали, что количество молекул свободной воды на одну молекулу ДПФХ уменьшается с 6,4 при $X_{\text{DMSO}} = 0,0$ до 0 при $X_{\text{DMSO}} = 0,14$.

Используемые в расчетах толщины мембраны ДПФХ в воде и в присутствии ДМСО были получены из приближения Гинье при анализе спектров МУРН. Результаты исследований, выполненных в 2005 г., говорят о том, что приближение Гинье дает заниженное значение толщины мембраны [43]. В будущем, по мере развития экспериментальных установок и методов анализа малоугловых спектров, численные значения толщины мембраны ДПФХ и величины гидратации липидного бислоя, видимо, будут уточнены, что может привести к некому количественному изменению параметров ДМСО-индуцированной дегидратации. Однако качественно явление не изменится. Принципиально важными в ДМСО-индуцированной дегидратации являются три экспериментальных факта. Первое — уменьшение периода повторяемости мембраны при увеличении концентрации ДМСО. Второе — увеличение толщины мембраны при увеличении концентрации ДМСО. Третье — «несмешиваемость» молекул связанной воды с молекулами ДМСО.

ДМСО-индуцированная дегидратация межмембранного пространства увеличивает температуру главного фазового перехода от $T_{\text{ph}} = (41,7 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ при $X_{\text{DMSO}} = 0,0$ до $T_{\text{ph}} = (50,6 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ при $X_{\text{DMSO}} = 0,3$ (см. рис. 35). Важно отметить, что молекулы ДМСО и воды образуют водородные связи при отношении их количества 1/2 ($X_{\text{DMSO}} = 0,33$) или 1/3 ($X_{\text{DMSO}} = 0,25$). Исходя из этого наблюдаемые экспериментально свойства тройной системы при $X_{\text{DMSO}} \geq 0,3$ могут быть объяснены на основе представления о том, что существует сильная связь между молекулами воды и ДМСО в объемном растворе. Таким образом, при $0,3 \leq X_{\text{DMSO}} \leq 0,8$ только связанная вода существует в тройной системе ДПФХ/ДМСО/вода. В этом интервале период повторяемости $d = 57 \text{ \AA}$ и температура фазового перехода $T_{\text{ph}} \approx 52^\circ\text{C}$ являются постоянными величинами.

Явление ДМСО-индуцированной дегидратации межмембранного пространства сводится к следующей простой модели. С увеличением концентрации ДМСО в объемном растворе тройной системы ДПФХ/ДМСО/вода уменьшается количество молекул свободной воды. При этом водородные связи между полярными головками липида и молекулами свободной воды, находящейся в межмембранном пространстве, оказываются более слабыми, чем взаимодействие между молекулами воды и ДМСО в объемном растворе. В результате, свободная вода выходит из межмембранного пространства в объемный рас-

твор, где образует водородные связи с молекулами ДМСО. Большинство биологических систем содержит свободную и связанную воду. Таким образом, не исключено, что описанное явление ДМСО-индуцированной дегидратации может представлять интерес для понимания свойств других биологических объектов.

8. ВЫВОДЫ

Современным мировым стандартом для исследования наносистем является наличие нейтронного и синхротронного центров, расположенных в одном районе. В обзоре представлены результаты исследований липидных наноструктур, выполненные в различных нейтронных и синхротронных центрах Европы.

ЛНФ ОИЯИ обладает реактором ИБР-2, позволяющим проводить исследования биологических и фармацевтических наноструктур методом времени пролета медленных нейтронов. В федеральном научном центре «Курчатовский институт» работает синхротронный источник, оборудованный комплексом различных спектрометров для исследования наноструктур. Наличие в Московской области двух современных источников является экспериментальной базой исследований по нанофизике. Биологические объекты (такие как белки, мембраны, вирусы, мицеллы, везикулы) и переносчики лекарств по своей природе являются нанообъектами. Физические принципы устройства и функционирования таких наноструктур весьма далеки от их полного понимания.

Описанные выше методы исследования и результаты являются началом работы по исследованию роли отдельных керамидов в формировании диффузионных свойств кожи. Дифракция нейтронов и рентгеновских лучей в реальном времени должна сыграть существенную роль в решении этой задачи. Наличие в ОИЯИ импульсного реактора ИБР-2 делает Лабораторию нейтронной физики весьма перспективной для решения современных задач биофармакологии. Создание на реакторе ИБР-2 новой установки малоуглового рассеяния позволит начать, на основе описанных в обзоре методов, исследования нанолекарств и липидных транспортных систем. Создание спин-эхо спектрометра для измерения квазиупругого рассеяния позволит исследовать упругие свойства переносчиков лекарств через кожу. Наконец, создание коллабораций типа нейтронный центр – синхротронный центр – фармацевтическая промышленность выглядит сегодня как объективная необходимость для конкурентной работы на мировом рынке лекарств.

Благодарности. Автор выражает благодарность А. М. Балагурову и Е. В. Ермаковой за обсуждение рукописи и сделанные замечания. Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант 10-04-91330, с использованием оборудования ЦКП «Курчатовский центр синхротронного излучения и нанотехнологий» в рамках госконтракта 16.552.11.7003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997.
2. Барсуков Л. И. Липосомы // Соросовский образовательный журн. 1988. Т. 10. С. 2–9.
3. Neubert R. H. H., Wohlrab W. A., Marsch W. C. Dermatopharmazie. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001.
4. Mizutani Y. et al. Ceramide Biosynthesis in Keratinocyte and Its Role in Skin Function // Biochimie. 2009. V. 91. P. 784–790.
5. Ипатова О. М. Фосфолипиды: механизм действия и применения в клинике. М.: ГУ НИИ Биомедхим. РАМН, 2005.
6. Rossof M. Vesicles. Marcel Dekker Inc., 1996.
7. Твердолов В. А., Тихонов А. Н., Яковенко Л. В. Физические механизмы функционирования биологических мембран. М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1987.
8. Holte L. L., Gawrisch K. Determining Ethanol Distribution in Phospholipid Multilayers with MAS-NOESY Spectra // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 4669–4674.
9. Huster D. et al. Water Permeability of Polyunsaturated Lipid Membranes Measured by ^{17}O NMR // Biophys. J. 1997. V. 73. P. 855–864.
10. Дубачев Г. Э. и др. Электронно-микроскопическое исследование переходных структур при термоиндуцируемой трансформации мицеллы-везикулы в системе димиристоилфосфатидилхолин–холат натрия // Биол. мембраны. 1996. Т. 13. С. 100–109.
11. Hallett F. R. et al. Determination of Vesicle Size Distribution by Freeze-Fraction Electron Microscopy // J. of Electron Microscopy Techn. 1991. V. 17. P. 459–466.
12. Hallet F. R., Watton J., Krygsmann P. Vesicle Sizing. Number Distributions by Dynamic Light Scattering // Biophys. J. 1991. V. 59. P. 357–362.
13. Hunter D. G., Frisken B. J. Effect of Extrusion Pressure and Lipid Properties on the Size and Polydispersity of Lipid Vesicles // Biophys. J. 1998. V. 74. P. 2996–3002.
14. MacDonald R. C. et al. Small-Volume Extrusion Apparatus for Preparation of Large, Unilamellar Vesicles // Biochim. et Biophys. Acta. 1991. V. 1061. P. 297–303.
15. Mancheno J. M. et al. Kinetic Study of the Aggregation and Lipid Mixing Produced by α -Sarcin on Phosphatidylglycerol and Phosphatidylserine Vesicles: Stopped-Flow Light Scattering and Fluorescence Energy Transfer Measurements // Biophys. J. 1994. V. 67. P. 1117–1125.
16. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980.
17. Lesieur S. et al. Study of Size Distribution and Stability of Liposomes by High Performance Gel Exclusion Chromatography // Chemistry and Physics of Lipids. 1993. V. 64. P. 57–82.
18. Lin M. Y. et al. Simultaneous Measurement of Viscosity and Structure for Rod-Like Micelle Solution // Physica B. 1998. V. 241–243. P. 990–992.
19. Crabielle-Madelmont C., Perron R. Calorimetric Studies on Phospholipids-Water Systems: I. DL-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)-Water System // J. of Colloid and Interface Sci. 1983. V. 95. P. 471–482.

20. *Crabielle-Madelmont C., Perron R.* Calorimetric Studies on Phospholipids-Water Systems: II. Study of Water Behaviour // *Ibid.* P. 483–493.
21. *Heerklotz H., Seelig J.* Titration Calorimetry of Surfactant-Membrane Partitioning and Membrane Solubilization // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2000. V. 1508. P. 69–85.
22. *Kirchhoff W. H., Levin I. W.* Description of the Thermotropic Behaviour of the Membrane Bilayers in the Terms of Raman Spectral Parameters: A Two-State Model // *J. Res. of the Nat. Bureau of Standards.* 1987. V. 92. P. 113–127.
23. *Shashkov S. N. et al.* 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.* 1999. V. 271. P. 184–191.
24. *Augsten Ch. et al.* A Detailed Analysis of Biodegradable Nanospheres by Different Techniques. A Combined Approach to Detect Particle Sizes and Size Distributions // *J. of Pharmaceut. and Biomed. Analysis.* 2008. V. 47. P. 95–102.
25. *Smondyrev A. M., Berkowitz M. L.* Molecular Dynamic Simulation of DPPC Bilayer in DMSO // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 2472–2478.
26. *Schoenborn B. P., Nunes A. C.* Neutron Scattering // *Ann. Rev. of Biophysics and Bioengineering.* 1972. V. 1. P. 529–551.
27. *Schoenborn B. P.* Neutron Scattering for the Analysis of Membranes // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1976. V. 457. P. 41–55.
28. *Worcester D. L.* Neutron Diffraction Studies of Biological Membranes and Membrane Components // *Brookhaven Symp. Biol.* 1976. V. 27. P. III-37–III-57.
29. *Franks N. P., Lieb W. R.* The Structure of Lipid Bilayers and the Effects of General Anaesthetics // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 133. P. 469–500.
30. *Harroun T. A., Katsaras J., Wassall S. R.* Cholesterol Hydroxyl Group Is Found to Reside in the Center of a Polyunsaturated Lipid Membrane // *Biochemistry.* 2006. V. 45. P. 1227–1233.
31. *Seul M., Sammon M. J.* Preparation of Surfactant Multilayer Films on Solid Substrates by Deposition from Organic Solution // *Thin Solid Films.* 1990. V. 185. P. 287–305.
32. *Nagle J. F., Tristram-Nagle S.* Structure of Lipid Bilayers // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2000. V. 1469. P. 159–195.
33. *Schalke M. et al.* Submolecular Organization of DMPA in Surface Monolayers: Beyond the Two-Layer Model // *Ibid.* V. 1464. P. 113–126.
34. *Dyck M. et al.* Adsorption of Small Molecules on Lipid Surface Monolayers // *Lecture Notes in Physics: Molecules in Interaction with Surfaces and Interfaces.* N. Y., 2004. V. 634. P. 429–437.
35. *Kiselev M. A. et al.* New Insights into Structure and Hydration of Stratum Corneum Lipid Model Membrane by Neutron Diffraction // *Eur. Biophys. J.* 2005. V. 34. P. 1030–1040.
36. *Zbytovska J. et al.* The Effects of Transdermal Permeation Enhancers on Thermotropic Phase Behaviour of a Stratum Corneum Lipid Model // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2009. V. 351. P. 30–37.
37. *Киселев М. А. и др.* Структурные исследования липидных мембран на синхротронном источнике СИБИРЬ-2 // *Кристаллография.* 2010. Т. 55. С. 500–506.

38. *Arriaga L.R. et al.* Stiffening Effect of Cholesterol on Disordered Lipid Phases: A Combined Neutron Spin Echo + Dynamic Light Scattering Analysis of the Bending Elasticity of Large Unilamellar Vesicles // *Biophys. J.* 2009. V. 96. P. 3629–3637.
39. *Lesieur P. et al.* Temperature Induced Micelle to Vesicle Transition: Kinetic Effects in the DMPC/NaC System // *J. Appl. Crystallography.* 2000. V. 33. P. 623–627.
40. *Kiselev M.A. et al.* Model of Separated Form Factors for Unilamellar Vesicles // *Appl. Phys. A.* 2002. V. 74. Suppl. P. S1654–S1656.
41. *Kiselev M.A. et al.* Does Sucrose Influence the Properties of DMPC Vesicles? // *Chemistry and Physics of Lipids.* 2003. V. 123. P. 31–44.
42. *Киселев М.А. и др.* Исследования структурного фактора однослойных везикул димиристоилфосфатидилхолина методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования.* 2003. Т. 11. С. 20–24.
43. *Kiselev M.A. et al.* What Can We Learn about the Lipid Vesicle Structure from the Small Angle Neutron Scattering Experiment? // *Eur. Biophys. J.* 2006. V. 35. P. 477–493.
44. *Kiselev M.A. et al.* Water Distribution Function across the Curved Lipid Bilayer: SANS Study // *Chem. Phys.* 2008. V. 345. P. 185–190.
45. *Свергун Д.И., Фейгин Л.А.* Малоугловое рассеяние нейтронов и рентгеновских лучей. М.: Наука, 1986.
46. *Hallet F.R., Watton J., Krygsman P.* Vesicle Sizing. Number Distributions by Dynamic Light Scattering // *Biophys. J.* 1991. V. 59. P. 357–362.
47. *Schmiedel H. et al.* Determination of Structural Parameters and Hydration of Unilamellar POPC/C₁₂E₄ Vesicles at High Water Excess from Neutron Scattering Curves Using a Novel Method of Evaluation // *J. Phys. Chemistry B.* 2001. V. 105. P. 111–117.
48. *Kiselev M.A. et al.* DMSO-Induced Dehydration of DPPC Membranes Studied by X-Ray Diffraction, Small-Angle Neutron Scattering and Calorimetry // *J. Alloys and Compounds.* 1999. V. 286. P. 195–202.
49. *Kiselev M.A. et al.* Ice Formation in Model Biological Membranes in the Presence of Cryoprotectors // *Nucl. Instr. Meth. A.* 2000. V. 448. P. 255–260.
50. *Kiselev M.A. et al.* Properties of Ternary Phospholipid/Dimethyl Sulfoxide/Water Systems at Low Temperatures // *Chemistry and Physics of Lipids.* 2005. V. 133. P. 181–193.
51. *Рябова Н.Ю. и др.* Исследование структуры многослойных липидных мембран методом дифракции нейтронов в реальном времени // *Физика твердого тела.* 2010. Т. 52. С. 984–991.
52. *Kessner D. et al.* Localisation of Partially Deuterated Cholesterol in Quaternary SC Lipid Model Membranes. A Neutron Diffraction Study // *Eur. Biophys. J.* 2008. V. 37. P. 1051–1057.
53. *Ruettinger A. et al.* Fatty Acid Interdigitation in the Stratum Corneum Model Membranes: A Neutron Diffraction Study // *Eur. Biophys. J.* 2008. V. 37. P. 759–771.
54. *Schroeter A. et al.* Evidence of Free Fatty Acid Interdigitation in Stratum Corneum Model Membranes Based on Ceramide [AP] by Deuterium Labeling // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2009. V. 1788. P. 2194–2203.

55. *Kessner D. et al.* Arrangement of Ceramide[EOS] in a Stratum Corneum Lipid Model Matrix — New Aspects Revealed by Neutron Diffraction Studies // *Eur. Biophys. J.* 2008. V. 37. P. 989–999.
56. *Schroeter A. et al.* Basic Nanostructure of CER[EOS]/CER[AP]/CHOL/FFA Multilamellar Membranes. A Neutron Diffraction Study // *Biophys. J.* 2009. V. 97. P. 1104–1114.
57. *Ryabova N. Y. et al.* Investigation of Stratum Corneum Lipid Model Membranes with Free Fatty Acid Composition by Neutron Diffraction // *Eur. Biophys. J.* Published online 15 Dec. 2009, DOI: 10.1007/s00249-009-0569-z
58. *Киселев М. А.* Конформация молекул церамида-6 и chain-flip переходы в липидной матрице верхнего слоя кожи — stratum corneum // *Кристаллография.* 2007. Т. 52. С. 549–553.
59. *Antonov V. F. et al.* Soft Perforation of Planar Bilayer Lipid Membranes of Dipalmitoylphosphatidylcholine at the Temperature of the Phase Transition from the Liquid Crystalline to the Gel State // *Eur. Biophys. J.* 2005. V. 34. P. 155–162.
60. *Gawrisch K. et al.* Hydration of POPC Bilayers Studied by 1H-PFG-MAS-NOESY and Neutron Diffraction // *Eur. Biophys. J.* 2007. V. 36. P. 281–291.
61. *Ермакова Е. В. и др.* Условия образования длиннопериодной фазы в модельных мембранах верхнего слоя кожи stratum corneum // Тез. докл. VII нац. конф. «Рентгеновское, синхротронное излучения, нейтроны и электроны для исследования наносистем и материалов. Нано-био-инфо-когнитивные технологии». М.: ИК РАН-РНЦ КИ, 2009. С. 75.
62. *Speyer J. B. et al.* Magnetic Orientation of Sphingomyelin-Lecithin Bilayers // *Biophys. J.* 1987. V. 51. P. 687–691.
63. *Kiselev M. A. et al.* DMPC Vesicles and Mixed DMPC/C₁₂E₈ Micelles Orientation in Strong Magnetic Fields // *Appl. Phys. A.* 2002. V. 74. P. S1239–S1241.
64. *Kiselev M. A. et al.* Orientation of the DMPC Unilamellar Vesicle System in the Magnetic Field: SANS Study // *Chem. Phys.* 2008. V. 345. P. 181–184.
65. *Cevc G., Schatzlein A., Richardsen H.* Ultradeformable Lipid Vesicles Can Penetrate the Skin and Other Semi-Permeable Barriers Unfragmented. Evidence from Double Label SLSM Experiments and Direct Size Measurements // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2002. V. 1564. P. 21–30.
66. *Ollivon M. et al.* Vesicle Reconstitution from Lipid-Detergent Mixed Micelles // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2000. V. 1508. P. 34–50.
67. *Hjelm R. P., Thyagarajan P., Alkan-Onyuksel H. J.* Organization of Phosphatidylcholine and Bile Salt in Rodlike Mixed Micelles // *Phys. Chem.* 1992. V. 96. P. 8653–8661.
68. *Gutberlet T. et al.* SANS Study of Mixed POPC/C₁₂E_n Aggregates // *Physica B.* 2000. V. 381–383. P. 276–278.
69. *Weiss T. M. et al.* Dynamics of the Self-Assembly of Unilamellar Vesicles // *Phys. Rev. Lett.* 2005. V. 94. P. 038303.
70. *Miguel M. G. et al.* Temperature Dependence of the Vesicle-Micelle Transition of Egg Phosphatidylcholine and Octyl Glucoside // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 8921–8928.

71. *Polozova A. I. et al.* Temperature-Induced Micellar-Lamellar Transformation in Binary Mixtures of Saturated Phosphatidylcholines with Sodium Cholate // *FEBS Lett.* 1995. V. 385. P. 17–22.
72. *Otten D., Lobbecke L., Beyer K.* Stages of the Bilayer-Micelle Transition in the System Phosphatidylcholine-C₁₂E₈ as Studied by Deuterium- and Phosphorous-NMR, Light Scattering, and Calorimetry // *Biophys. J.* 1995. V. 68. P. 584–597.
73. *Kiselev M. A. et al.* Membrane Self-Assembly in Mixed DMPC/NaC Systems by SANS // *Chem. Phys.* 2008. V. 345. P. 173–180.
74. *Garidel P. et al.* Thermodynamic Characterization of Bile Salt Aggregation as a Function of Temperature and Ionic Strength Using Isothermal Titration Calorimetry // *Langmuir.* 2000. V. 16. P. 5267–5275.
75. *Kiselev M. A. et al.* DMSO-Induced Dehydration of DPPC Membranes Studied by X-Ray Diffraction, Small-Angle Neutron Scattering and Calorimetry // *J. Alloys and Compounds.* 1999. V. 286. P. 195–202.
76. *Киселев М. А.* Комбинированное применение нейтронного и синхротронного излучения для исследования влияния диметилсульфоксида на структуру и свойства везикул из дипальмитоилфосфатидилхолина // *Кристаллография.* 2007. Т. 52. С. 554–559.
77. *Yu Z. W., Quinn P. J.* Phase Stability of Phosphatidylcholines in Dimethylsulfoxide Solutions // *Biophys. J.* 1995. V. 69. P. 1456–1463.
78. *Tristram-Nagle S. et al.* DMSO Produces a New Subgel Phase in DPPC: DSC and X-Ray Diffraction Study // *Biochem. et Biophys. Acta.* 1998. V. 1369. P. 19–33.
79. *Rasmussen D. H., MacKenzie A. P.* Phase Diagram for the System Water–Dimethylsulfoxide // *Nature.* 1968. V. 220. P. 1315–1317.
80. *Kiselev M. A. et al.* A Sucrose Solutions Application to the Study of Model Biological Membranes // *Nucl. Instr. Meth. A.* 2001. V. 470. P. 409–416.
81. *Kiselev M. A. et al.* Sucrose Solutions as Prospective Medium to Study the Vesicle Structure: SAXS and SANS Study // *J. Alloys and Compounds.* 2001. V. 328. P. 71–76.
82. *Kiselev M. A. et al.* Influence of Trehalose on the Structure of Unilamellar DMPC Vesicles // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. and Engin. Aspects.* 2005. V. 256. P. 1–7.
83. *Ананьев В. Д. и др.* ИБР-2 — импульсный реактор периодического действия для нейтронных исследований. Препринт ОИЯИ Р3-10888. Дубна, 1977.
84. *Балагуров А. М. и др.* Нейтронный дифрактометр на импульсном реакторе ИБР-2. Конструкция и параметры. Сообщение ОИЯИ 3-84-291. Дубна, 1984.
85. *Балагуров А. М., Горделий В. И., Ягужинский Л. С.* Исследование кинетики сорбции и десорбции воды липидными мембранами методом дифракции нейтронов // *Биофизика.* 1986. Т. 31. С. 1004–1010.
86. *Горделий В. И., Исламов А. Х., Сырых А. Г.* Определение флуктуаций периода повторяемости липидных и биологических мембран методом дифракции нейтронов по времени пролета // *Биол. мембраны.* 1992. Т. 9. С. 193–200.
87. *Василенко И. А. и др.* Структурная организация фосфолипидов в неводных полярных растворителях // *Биол. мембраны.* 1988. Т. 5. С. 428–438.

88. *Gordeliy V. I., Kiselev M. A.* Definition of Lipid Membrane Structural Parameters from Neutronographic Experiments with the Help of the Strip Function Model // *Biophys. J.* 1995. V. 69. P. 1424–1428.
89. *Gordeliy V. I. et al.* Detection of Structural Defects in Phosphatidylcholine Membranes by Small-Angle Neutron Scattering. The Cluster Model of a Lipid Bilayer // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1991. V. 1061. P. 39–48.
90. *Matsuki H. et al.* Effect of Deuterium Oxide on the Thermodynamic Quantities Associated with Phase Transitions of Phosphatidylcholine Bilayer Membranes // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2005. V. 1712. P. 92–100.