

На правах рукописи

Грузинов Андрей Юрьевич

**Фазовые переходы модельных липидных мембран
верхнего слоя кожи: синхротронные исследования**

01.04.07 – Физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Грузинов' (Gruzinov).

Москва – 2014

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Научный руководитель: доктор физико-математических наук
Киселев Михаил Алексеевич

Официальные оппоненты: **Твердислов Всеволод Александрович**,
доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий кафедрой биофизики физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Волков Владимир Владимирович,
кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник,
Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН.

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тульский государственный университет».

Защита состоится «_____» _____ 2014 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 520.009.01 на базе НИЦ «Курчатовский институт», расположенном по адресу: 123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Курчатовский институт».

Автореферат разослан «_____» _____ 2014 г.

Отзывы и замечания по автореферату в двух экземплярах, заверенные печатью, просьба высылать по вышеуказанному адресу на имя ученого секретаря диссертационного совета.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук



А.В. Мерзляков

Общая характеристика работы

Актуальность

Работа посвящена экспериментальному исследованию фазового состояния и фазовых переходов частично упорядоченных модельных липидных наносистем под влиянием внешних условий (температуры и pH раствора) методом дифракции рентгеновского синхротронного излучения. Исследуемая липидная наносистема моделирует нативный матрикс верхнего слоя кожи в избытке воды.

Липидная мембрана по своим свойствам (самосборка) и размерам ($\approx 50 \text{ \AA}$) является классическим нанообъектом. Многофазность липидной матрицы приводит к возникновению межфазных границ в липидной мембране. Это приводит к появлению дислокаций, через которые возможен транспорт веществ.

Многослойная мембрана представляет собой достаточно подвижную систему бислоев, упорядоченных в направлении перпендикулярном бислою. Высокая интенсивность синхротронного излучения позволяет проводить эксперименты в динамике с изменением температуры или гидратации.

Установлено, что основным барьером на пути трансдермального переноса веществ является верхний роговой слой кожи (лат. *stratum corneum* - SC). SC представляет собой слой из плоских ороговевших клеток кожного эпителия, которые помещены в связующую липидную матрицу, через которую идет основной поток веществ через кожу. Функциональные свойства липидной матрицы определяются, главным образом, её структурой.

Исследования с помощью медико-биологических (химических) методов позволяют определить состав компонентов, но не отвечают на вопрос о структуре этой липидной матрицы. Для изучения структуры этой многокомпонентной системы используют модельные мембраны с известным составом.

Большое разнообразие липидных компонент позволяет рассматривать вопросы морфологии, механики и фазового состава липидных бислоев и возможной биологической роли фаз в функционировании естественного барьера SC. Важным является вопрос о том, какие структурные фазы формируются в модельной липидной матрице верхнего слоя кожи и какова их стабильность по отношению к изменениям внешней среды.

Наличие в верхнем слое кожи градиента pH в зависимости от глубины делает важным вопрос о влиянии этого параметра на структуру и свойства липидного барьера. Использование для этого модельных мембран обусловлено сложностью компонентного состава естественного межклеточного матрикса, что требует применения модельных систем для построения достоверных выводов о поведении липидного бислоя. При исследовании подобных сложных систем разумно использовать междисциплинарный подход. Интерес в исследовании верхнего слоя кожи связан прежде всего с вопросами её проницаемости как для полезных молекул (лекарств), так и для защиты самого верхнего слоя кожи от внешних воздействий (дерматология и косметология).

Основным подходом, который будет использоваться в диссертационной работе является использование модельных липидных мембран, которые по своему составу существенно проще нежели нативные, но в которых присутствуют все главные компоненты. Именно поэтому, такие мембраны называют модельными.

В отечественном сегменте науки тематика дифракционных исследований матрицы верхнего слоя кожи развивается сравнительно недавно. Пионерские работы по теме структурных исследований модельных мембран верхнего слоя кожи с помощью дифракции нейтронов впервые были сделаны группой М.А. Киселева из Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна) [1–5] на многослойных ориентированных модельных мембранах SC, при их частичной гидратации. Использование синхротронного излучения позволяет исследовать неориентированные модельные мембраны в избытке воды.

В диссертационной работе рассматривается использование синхротронного излучения для исследования фазового состояния липидной мембраны SC и фазовых переходов под влиянием внешних факторов (рН и температуры). Это может служить физико-химической основой обоснования проницаемости нативной матрицы SC. Таким образом, актуальность работы определяется использованием синхротронного излучения для изучения и определения особенностей фазового состояния модельных липидных систем межклеточного матрикса верхнего слоя кожи при вариации рН и температуры.

Научная новизна

Впервые в России применен метод рентгеновской дифракции на синхротроне для характеристик фазового состояния модельной четырехкомпонентной и пятикомпонентной липидной мембраны межклеточного матрикса верхнего слоя кожи в избытке воды. Обнаружено влияние температуры и рН на фазовый состав и фазовые переходы модельных липидных мембран.

Впервые определены времена рекристаллизации образцов четырехкомпонентной модельной мембраны в зависимости от рН. Показана обратимость основного фазового перехода, происходящего в четырехкомпонентных мембранах при вариации температуры.

Постановка задачи

Межклеточный матрикс верхнего слоя кожи млекопитающих представляет собой сложную многокомпонентную систему, состоящую из разнообразных липидов (церамиды, жирные кислоты, холестерин, производные холестерина). На сегодня известно 11 типов церамидов, входящих в липидный матрикс SC. Несмотря на обширные исследования, которые ведутся по данной тематике, роль каждого церамида в формировании барьерных свойств межклеточного матрикса требует дополнительных исследований.

Липиды способны самоорганизовываться в воде в различные фазы:

- сферические образования - мицеллы и везикулы;

- ламеллярные структуры (плоские слои);
- гексагональная фаза (цилиндрические мицеллы формируют структуру с гексагональной симметрией);
- непрерывные (гироидные) фазы;

Следует отметить, что формируемые структуры имеют кристаллическую упорядоченность по крайней мере в одном из трех направлений, образуя жидкий кристалл. Получать структурную информацию о жидких кристаллах возможно с помощью дифракции рентгеновского излучения. Однако, малые концентрации (1-20%) липидов в исследуемых водных растворах, подвижность молекул в бислое и слабая рассеивающая способность накладывает ограничения на используемую экспериментальную технику. Для получения дифракционных спектров за разумное время требуется использование высокопоточных источников рентгеновского излучения, которыми являются кольцевые ускорители-синхротроны.

Большое количество компонент в нативной матрице SC делает невозможным изучать влияние отдельных компонентов на структуру и роль в обеспечении барьерной функции. Поэтому для исследований используют модельные системы, содержащие ограниченное количество липидных компонент и имеющие известные концентрации. Удобнее всего использовать химически синтезированные липиды с известной степенью чистоты и качества, в отличие от применения липидов, выделяемых из верхнего слоя кожи с использованием хроматографических методов.

Известно, что даже в случае однокомпонентной смеси липиды могут формировать сложные фазовые диаграммы. Это связано с особенностями формы и строения липидов, которые начинают играть роль при помещении липидов в полярный растворитель (воду). В случае многокомпонентных смесей изучение фазовых переходов в таких системах становится сложной научной задачей, требующей совместного теоретического и прикладного подхода.

Целью диссертационного исследования являлось:

- Определение наноструктуры мембран с составом церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина и церамид 1/ церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина в избытке воды.
- Определение фазовых переходов происходящих в четырехкомпонентных и пятикомпонентных липидных мембранах, моделирующих состав межклеточного матрикса верхнего слоя кожи.
- Определить как изменение температуры и pH растворителя меняет фазовый состав модельных липидных мембран липидной матрицы *stratum corneum* (SC).
- Поиск потенциальных возможностей управления фазовым состоянием модельных липидных мембран липидной матрицы *stratum corneum* (SC) с целью увеличения проницаемости кожи для лекарств.

Для достижения поставленной цели была выполнена следующая экспериментальная работа:

1. Проведены эксперименты по дифракции синхротронного излучения на неориентированных модельных липидных мембранах в избытке воды.
2. Определена зависимость температуры фазового перехода модельной липидной матрицы в зависимости от рН буферного раствора для короткопериодной фазы.
3. Определены условия формирования длиннопериодной фазы в модельной липидной мембране.
4. Определены характерные времена рекристаллизации короткопериодной фазы и их зависимость от рН растворителя.

Научная и практическая значимость работы

В работах [2, 6] была впервые определена наноструктура многослойной модельной мембраны липидной матрицы SC с составом *серамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина* методом дифракции нейтронов. Мембраны приготавливались как ориентированные на кварцевой подложке многослойные структуры. Измерения проводились при частичной гидратации мембраны парами воды. Было установлено явление сверхсильного межмембранного взаимодействия, приводящее к стерическому контакту двух бислоевых мембран. Открытой проблемой остался вопрос о наноструктуре и свойствах этой мембраны в избытке воды. Решение этого вопроса требовало изготовления многослойных везикул в избытке воды и последующего применения рентгеновской синхротронной дифракции.

Исследованиями модельных липидных мембран занимаются несколько групп в разных странах, и большинство работ представлено экспериментальными исследованиями [7–11]. Теоретические расчеты дифракционных спектров и зависимостей параметров липидных бислоев от внешних воздействий рассматривают однокомпонентные системы. В многокомпонентной системе экспериментальное измерение структуры при всех возможных комбинациях параметров сильно затруднено. Теоретическое рассмотрение простых систем позволяет понять, в какой области изменения параметров следует искать интересные экспериментальные свойства [12, 13]. Поэтому выбирались важные для структуры SC параметры - рН и температура в том диапазоне, который больше всего соответствует существующему градиенту рН и температурному диапазону кожи млекопитающих.

Результаты, изложенные в диссертации, могут быть использованы для прояснения вопросов переноса лекарственных веществ через SC. Знание структуры модельной матрицы верхнего слоя кожи позволит понимать процессы, происходящие в нативной матрице при возникновении кожных заболеваний, сопровождающихся нарушением упорядоченности структуры. Также полученные результаты будут полезны при создании легкоусвояемых кремов для косметической промышленности и везикулярных переносчиков лекарств на основе липидов.

Основные результаты

На защиту выносятся следующие основные результаты и положения:

- Определена ламеллярная и латеральная структура двух модельных липидных мембран липидной матрицы stratum corneum (SC) в избытке воды;
- Фазовое состояние четырехкомпонентной липидной мембраны с составом церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина и весовым соотношением компонент 55/25/15/5 зависит от pH. При pH = 9.0 наблюдаются четыре ламеллярные фазы. При pH = 7.2 наблюдаются 3 ламеллярные фазы.
- Увеличение pH воды приводит к уменьшению температуры фазового перехода ($L_c \rightarrow L_\alpha$) липидной мембраны с составом церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина, при этом профили электронной плотности не имеют выраженной зависимости от pH.
- Установлено, что полная гидратация четырехкомпонентной липидной мембраны на основе церамида 6 не приводит к нарушению сверхсильного межмембранного взаимодействия. Липидные бислои четырехкомпонентной модельной мембраны липидной матрицы SC находятся в стерическом контакте при полной гидратации.
- В присутствии длинноцепочечного церамида, достаточным условием формирования длиннопериодной фазы в модельной мембране липидной матрицы SC является наличие избытка воды, низкое значение pH (до 9.0) и низкая температура (до 60°C).
- Время рекристаллизации модельной мембраны липидной матрицы SC на основе церамида 6 нерегулярно зависит от pH раствора и для pH > 7.0 составляет в среднем 21 день. При pH = 5.0 время рекристаллизации минимально и составляет в среднем 4 дня.

Апробация работы. Основные результаты диссертации докладывались на следующих конференциях:

- 11-я Курчатовская молодежная научная школа, Москва, 2013;
- International Soft Matter Conference 2013, Rome;
- RACIRI Summer school 2013: "Advanced Materials Design at X-ray and Neutron Facilities: Soft Matter and Nano Composites" , Saint-Petersburg;
- 47-ая школа ФГБУ «ПИАФ» НИЦ КИ по Физике Конденсированного Состояния, Санкт-Петербург, 2013;
- XXII СОВЕЩАНИЕ по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния - РНИКС 2012, Санкт-Петербург;
- Международная молодежная научная школа «Современная нейтронография», Дубна, 2011, 2012;
- Молодежная научная школа «Проблемы физики твердого тела», Дубна, 2012;
- Annual Summer School "Self Assembly in Soft Matter Systems" , Mittelwihr, 2012;

- Higher European Research Course for Users of Large Experimental Systems HERCULES'2012, Grenoble - Paris - Villigen, 2012
- "Application of Neutrons and Synchrotron Radiation in Engineering Materials Science" , Lauenburg, 2011;
- IV Высшие курсы стран СНГ для молодых ученых, аспирантов и студентов по современным методам исследований наносистем и материалов СИН-НАНО-2011, Москва - Дубна;
- 4th Japan–Russia International Workshop MSSMBS'10 - "Molecular Simulation Studies in Material and Biological Sciences" , Dubna, 2010;
- VII Национальная конференция «Рентгеновское, Синхротронное излучения, Нейтроны и Электроны для исследования наносистем и материалов. Нано-Био-Инфо-Когнитивные технологии» РСНЭ – НБИК 2009, Москва;

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 13 печатных работах, из них 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК [1А, 2А] и 11 тезисов докладов.

Личный вклад автора. Содержание диссертации и основные положения, выносимые на защиту, отражают персональный вклад автора в опубликованные работы. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами.

Автор непосредственно принимал участие в приготовлении образцов, планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации результатов измерений. Предложена методика определения температуры фазового перехода из структурных данных.

Автором создан комплекс программ, который использовался для контроля экспериментов при проведении измерений на синхротронной станции «ДИКСИ» НИЦ «Курчатовский институт».

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы и методики эксперимента, 4 глав, заключения и библиографии. Общий объем диссертации 109 страниц, из них 95 страниц текста, включая 63 рисунка и 8 таблиц. Библиография включает 135 наименований на 14 страницах.

Содержание работы

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель и аргументирована научная новизна исследований, показана практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

В литературном обзоре и методике эксперимента приведено общее описание структурных фазовых переходов в липидных наносистемах, описана роль гидрофобных сил и формы молекулы на фазовые переходы липидов. Перечислены основные липидные фазы. Приведено термодинамическое обоснование влияния рН на температуру фазового перехода.

Представлено описание структуры межклеточного матрикса верхнего слоя кожи - *stratum corneum* (SC) - и липидных фаз в нем. Перечислены основные липидные компоненты, входящие в его состав (церамиды (40-50%), жирные кислоты (15-25%), холестерин (20-25%) и сульфат холестерина (1-5%)). Моделью структуры SC является модель «кирпичной стены», где в качестве «кирпичей» выступают отмершие клетки - корнеоциты, погруженные в липидный матрикс - «цементный раствор». На рисунке 1а показано модельное представление SC. На рисунке 1б показана иллюстрация двух видов упорядоченности, которые наблюдаются в бислоиных липидных мембранах. Приведено описание

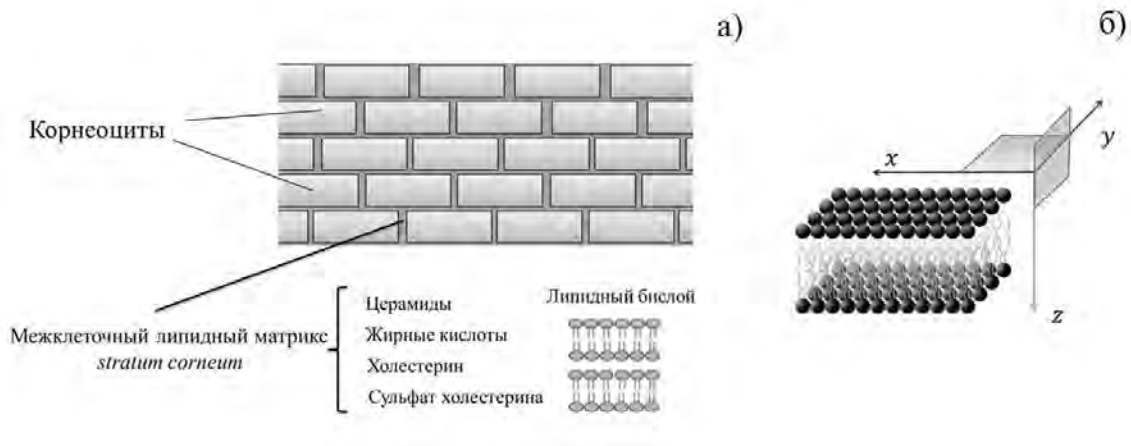


Рис. 1. а) Структура верхнего рогового слоя (SC) кожи (модель «кирпичной стены») [14]; б) Иллюстрация двух видов упорядоченности в липидной мембране. Плоскость (x,y) – латеральное упорядочивание. Направление z – ламеллярное упорядочивание.

структурных липидных фаз - короткопериодной (КПФ) и длиннопериодной (ДПФ) по результатам экспериментов с ориентированными модельными мембранами на кварцевых подложках с использованием дифракции нейтронов и результатов по данным рентгеновской дифракции от неориентированных многослойных везикул (липосом) в избытке воды, составленных из липидов, выделенных из нативного межклеточного матрикса. Указано влияние формируемой липидной структуры на проницаемость кожи для различных веществ.

Также рассматриваются фазовые переходы, обнаруженные в нативном межклеточном матриксе методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Это, прежде всего, плавление углеводородных хвостов при увеличении температуры (переход из L_c -фазы в L_α -фазу). Описываются модельные липидные мембраны, составленные из синтезированных компонент межклеточного матрикса SC и из липидов, выделенных из него химическими методами. Показана важность их применения для изучения структуры и свойств нативного матрикса SC. Приготовление образцов с контролируемым составом позволяет изучать влияние отдельных компонент и внешних факторов. Также приведены сведения об адресной доставке лекарств через межклеточный липидный матрикс SC.

Далее рассматривается применение дифракции синхротронного излучения для исследования фазовых переходов в липидных мембранах. Отмечена взаимодополняемость

методов дифракции синхротронного излучения и дифракции нейтронов. Показана важность применения высокоинтенсивных источников синхротронного излучения для исследования свойств частично упорядоченных сред. Приведены сведения об основных свойствах синхротронного излучения и порошковой дифракции для исследования липидных наноструктур. Описан подход к решению фазовой проблемы в случае симметричных бислоев и приведена методика определения фурье-профиля электронной плотности в направлении нормали к бислою.

Далее сделано описание экспериментальной части исследования. Описана методика приготовления образцов, использовавшихся в проведенных экспериментах, представлено описание станции ДИКСИ Курчатовского источника синхротронного излучения, на которой были получены все экспериментальные данные. Приведено описание методики обработки и оценки погрешности определяемых структурных параметров.

В первой главе описаны термотропные фазовые переходы в модельных мембранах верхнего слоя кожи, построенных на основе церамида 6, которые имеют состав, близкий к нативному матриксу: церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина = 55/25/15/5 (вес. %), а также фазовые переходы отдельных компонент в сухом состоянии и избытке воды.

Результаты исследования показали, что однокомпонентные липидные мембраны, составленные из отдельных компонент липидной мембраны, имеют близкие периоды повторяемости. На рисунке 2 показано сравнение дифракционных спектров для сухих и гидратированных компонент модельной липидной матрицы.

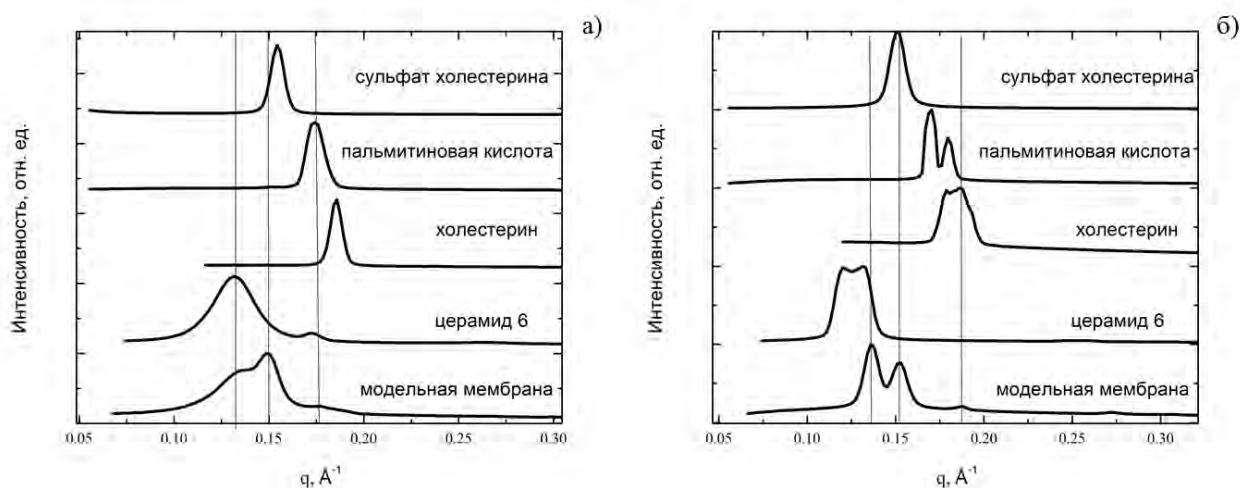


Рис. 2. Сравнение дифракционных спектров компонент и модельной липидной мембраны при 25°C. а) В сухом состоянии; б) В гидратированном состоянии. Спектр четырехкомпонентной модельной мембраны приведен при рН=7.2. Для наглядности спектры смещены друг относительно друга и нормированы.

В сухом состоянии четырехкомпонентная модельная мембрана имеет две ламеллярные фазы с периодами повторяемости $45.86 \pm 0.33 \text{ \AA}$ и $41.89 \pm 0.28 \text{ \AA}$. В гидратированном

состоянии разделение пиков ламеллярной фазы сильнее. Периоды повторяемости в гидратированном состоянии двух ламеллярных фаз составляют $46.20 \pm 0.32 \text{ \AA}$ и $41.34 \pm 0.27 \text{ \AA}$.

В сухом состоянии периоды повторяемости двух фаз модельной липидной мембраны близки к периодам повторяемости чистого церамида 6 и сульфата холестерина. В гидратированном состоянии периоды повторяемости двух фаз модельной липидной мембраны также близки к периодам повторяемости чистого церамида 6 и сульфата холестерина.

Таким образом смешивание компонент и последующая полная гидратация приводит к образованию новой структуры липидного бислоя модельной мембраны, отличной от структуры каждого из отдельных компонент.

На рисунке 3 показаны зависимости периодов повторяемости модельной мембраны SC при двух значениях pH при изменении температуры. Фазы A и D являются мажорными, так как имеют максимальную интенсивность рассеяния. Фазы B и C являются минорными, так как имеют минимальную интенсивность рассеяния.

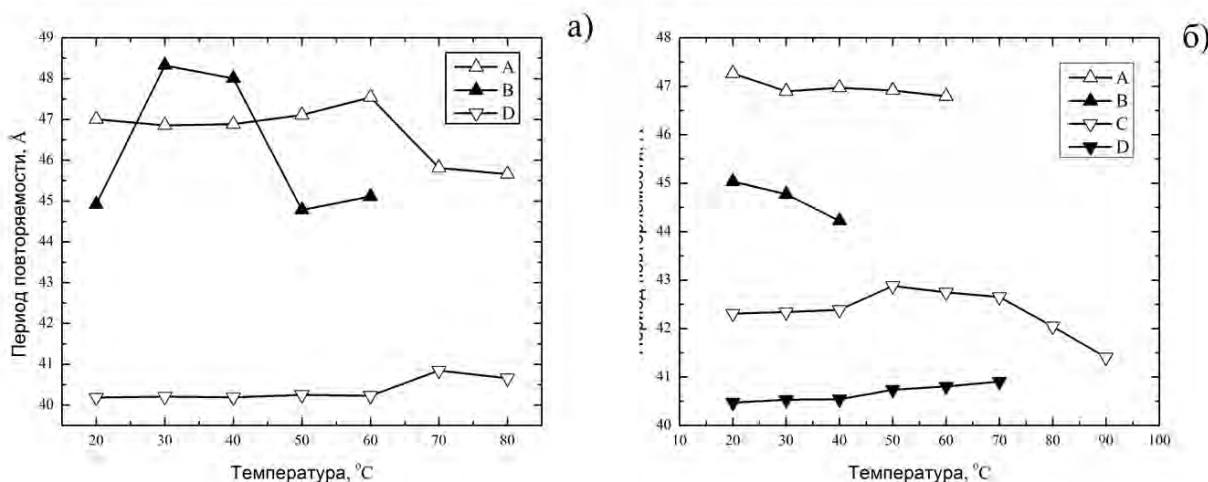


Рис. 3. Зависимость периода повторяемости четырехкомпонентной модельной мембраны SC от температуры: а) pH=7.2; б) pH = 9.0. Погрешности имеют размер порядка точки.

Фазовое состояние четырехкомпонентной липидной мембраны с составом церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина и весовым соотношением компонент 55/25/15/5 зависит от pH. При pH = 9.0 наблюдаются четыре ламеллярные фазы. При pH = 7.2 наблюдаются 3 ламеллярные фазы. Результаты первой главы опубликованы в работе [1A].

Во второй главе представлены результаты исследования влияния pH на фазовое состояние модельных мембран верхнего слоя кожи на основе церамида 6 состава церамид 6/холестерин/пальмитиновая кислота/сульфат холестерина = 55/25/15/5 (вес. %) при разных значениях pH.

Исследование влияния pH ранее было осложнено тем, что ориентированные мембраны наносятся на кварцевые подложки, и приготовить мембрану в избытке воды (с заданным pH) невозможно. Однако модельные липидные мембраны в избытке воды характеризуются слабой упорядоченностью и необходимостью использования высокоинтенсивных

источников излучения. Целью представленных экспериментов было исследование поведения короткопериодной фазы модельной липидной мембраны SC в избытке воды при различном значении pH буферного раствора.

Обнаружено изменение периода повторяемости модельной липидной мембраны для двух ламеллярных фаз, обозначенных латинскими буквами А и В. В области 70°C наблюдается увеличение периода повторяемости, которое можно связать с ростом флуктуаций и окончательным встраиванием молекул церамида 6 и холестерина в липидную мембрану с образованием однородного липидного бислоя. Фаза А, которая по периоду повторяемости близка к ламеллярной фазе чистого церамида 6 [15] не наблюдается выше 70-75°C.

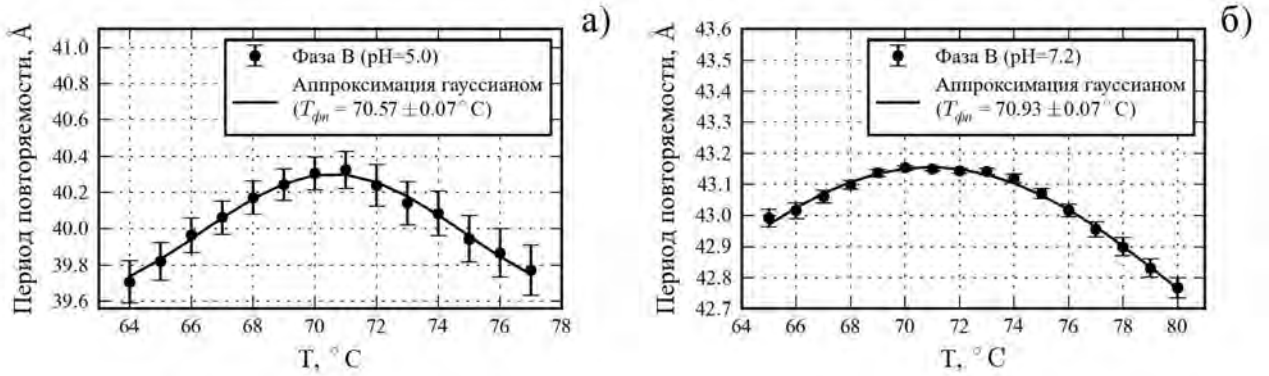


Рис. 4. Зависимость периода повторяемости модельной мембраны в области ФП при $T=70^\circ\text{C}$ для модельной мембраны SC с а) pH=5.0 и б) pH=7.2.

Температура фазового перехода определялась по положению максимума периода повторяемости мембраны d . Для этого дополнительно проводилось температурное сканирование с шагом в 1°C (рисунок 4).

Для определения максимума было предложено использовалось описание экспериментальной зависимости $d(T)$ гауссианом. Рассмотрим изменение периода повторяемости за счет внешнего воздействия. Относительное изменение периода повторяемости из-за увеличения температуры по предположению прямо пропорционально близости температуры T к температуре фазового перехода T_c .

$$\frac{\Delta d}{d} = \alpha(T - T_c) \cdot \Delta T \quad (1)$$

$$T \rightarrow T_c, d \rightarrow d_{max} \quad (2)$$

$$T \ll T_c, d \rightarrow d_0. \quad (3)$$

Разделим переменные и проинтегрируем обе части равенства. Тогда с учетом граничных условий (2) и (3) получим следующее выражение.

$$d = d_0 + d_{max} \cdot \exp(-\alpha(T - T_c)^2) \quad (4)$$

где d_0 - период повторяемости бислоя в равновесном состоянии, d_{max} - максимальный период повторяемости бислоя, достигаемый при критической температуре T_c (температуре

фазового перехода), α - коэффициент пропорциональности, определяемый при сравнении модели с экспериментальными данными. График этого уравнения имеет форму кривой Гаусса. Фактор χ^2 , определяющий степень удаления экспериментальных точек от рассчитанной кривой близок к 1, что говорит о разумном выборе фиттирующей функции.

При этом не следует гауссову функцию рассматривать как закон, которому подчиняется межплоскостное расстояние в мембране при фазовом переходе. В данном контексте его следует рассматривать как удобный инструмент для определения параметров экспериментальной зависимости. Абсцисса максимума гауссовой функции определяла температуру фазового перехода.

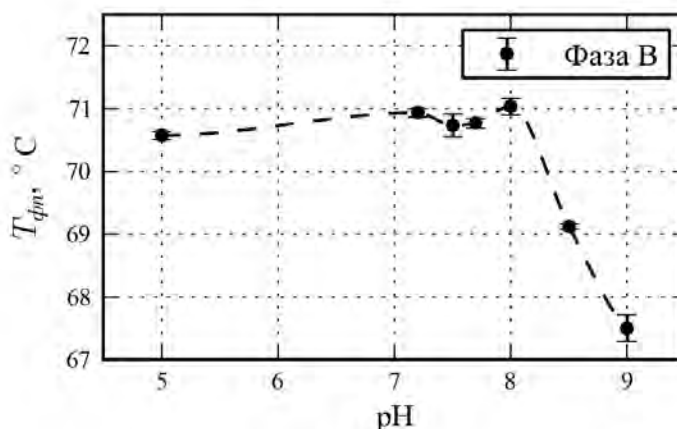


Рис. 5. Зависимость температуры фазового перехода от pH.

На рисунке 5 показана зависимость температуры фазового перехода (ФП) от pH для фазы В. Модельная мембрана SC демонстрирует более слабую зависимость температуры ФП от pH чем аналогичные зависимости для простых однокомпонентных смесей липидов [16]. В области $pH \leq 8$ температура фазового перехода четырехкомпонентной модельной мембраны SC изменяется слабо. В области $pH \geq 8$ температура фазового перехода начинает резко уменьшаться. Проанализированные спектры широкоугольной дифракции демонстрируют практически одинаковое значение корреляционной длины и среднего межмолекулярного расстояния в липидном бислое при температуре 85°C (выше температуры фазового перехода). Зависимость температуры ФП от pH можно связать с появлением дополнительного вклада в свободную энергию ΔG за счет изменения поверхностного потенциала мембраны. Для однокомпонентных систем этот процесс подробно обсуждается в [16]. В случае многокомпонентных систем возможно сделать только общее заключение о схожести поведения зависимости $T_{fm}(pH)$, которое наблюдалась в наших экспериментах (рисунок 5).

На рисунке 6 показано изменение профилей электронной плотности для серии образцов с разным pH раствора для фазы А и В. Видно, что изменение pH практически не оказывает влияния на структуру липидного бислоя четырехкомпонентной модельной липидной мембраны при 25°C. Пространственное разрешение такого фурье-синтеза $\approx 8.8 \text{ \AA}$.

Аппроксимация полученных профилей суммой гауссовых функций с центрами рас-

пределения соответствующими положениям полярных голов, CH_2 - групп и CH_3 - групп позволяют получить детальную информацию о структуре бислоя. Период повторяемости липидной мембраны для фазы А ($d = 46.13 \text{ \AA}$) и фазы В ($d = 41.36 \text{ \AA}$) почти равен толщине бислоя, определенной по положениям максимумов электронной плотности, соответствующих положениям полярных голов липидов ($d = 46.17 \text{ \AA}$ и $d = 46.39 \text{ \AA}$ соответственно). Этот результат хорошо согласуется с ранее полученными данными о наличии сверхсильного межмембранного взаимодействия между бислоями при частичной гидратации, полученные методом дифракции нейтронов [2].

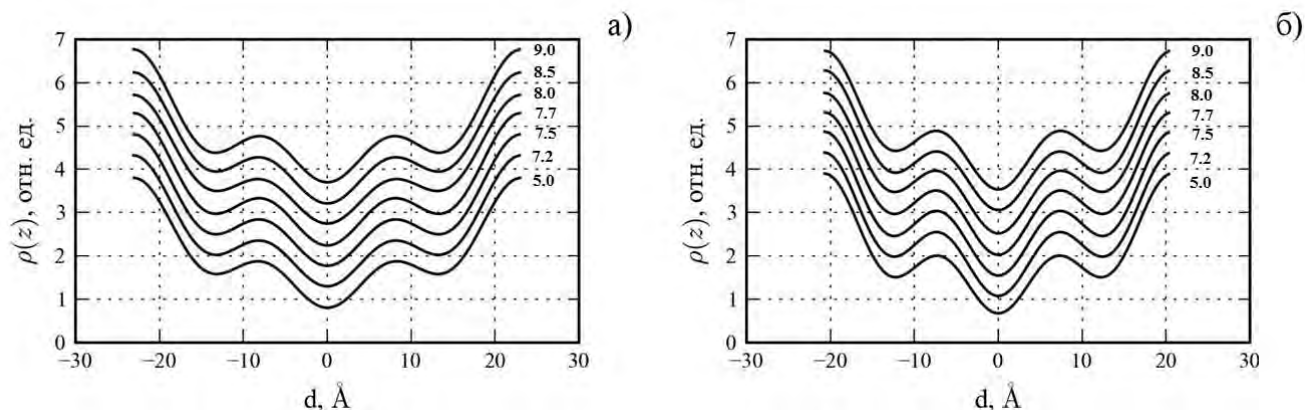


Рис. 6. Рассчитанные фурье-профили распределения электронной плотности. Значения рН обозначены рядом с графиками. а) Короткопериодная фаза А; б) Короткопериодная фаза В.

Таким образом, увеличение рН воды приводит к уменьшению температуры фазового перехода ($L_c \rightarrow L_\alpha$) липидной мембраны с составом *церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина*, при этом профили электронной плотности не имеют выраженной зависимости от рН.

Установлено, что полная гидратация четырехкомпонентной липидной мембраны на основе *церамида 6* не приводит к нарушению сверхсильного межмембранного взаимодействия. Липидные бислои четырехкомпонентной модельной мембраны липидной матрицы SC находятся в стерическом контакте при полной гидратации.

В третьей главе рассмотрены условия, способствующие формированию длиннопериодной фазы (ДПФ) в модельных мембранах *stratum corneum*. Исследования ориентированных и частично гидратированных мембран (состав: *церамид 1/ церамид 6/ холестерин/ жирная кислота*) методом дифракции нейтронов продемонстрировали, что наличие *церамида 1* само по себе не приводит к возникновению ДПФ [6]. Мембраны, ориентированные на кварцевых ложках, имеют период повторяемости не более 50 \AA , что соответствует формированию короткопериодной фазы (КПФ). Таким образом, наличие в составе модельной мембраны SC *церамида 1* является необходимым, но не достаточным условием образования ДПФ.

Показано, что структура мембраны с составом *церамид 1/ церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина = Cer1/ Cer6/ Ch/ PA/ ChS* при рН=7.2

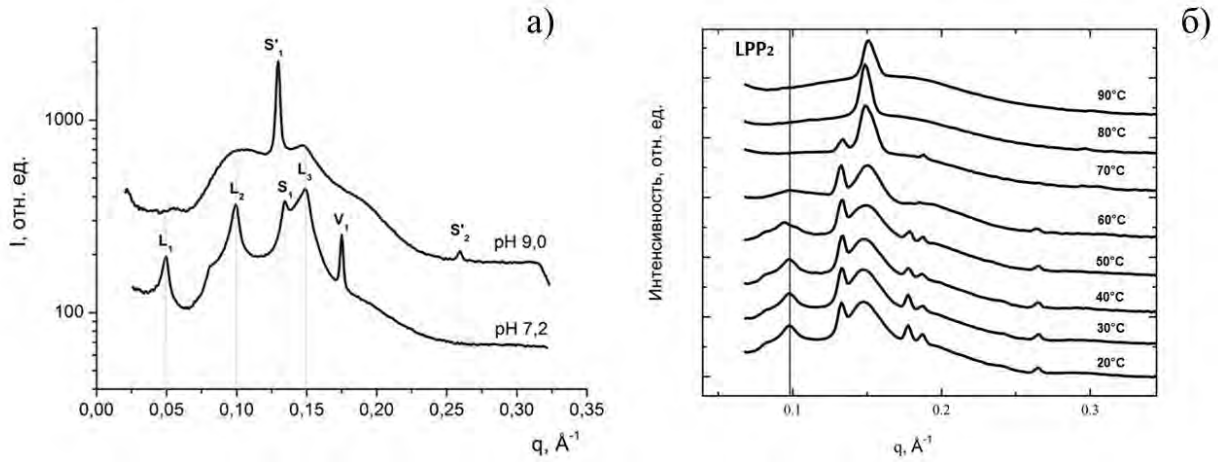


Рис. 7. а) Малоугловая ламеллярная дифракция от многослойных везикул Cer1/Cer6/Ch/PA/ChS с соотношением компонент 30/30/20/15/5 (вес. %) в избытке воды с рН=7.2 и рН=9.0. Комнатная температура. б) Дифрактограммы от многослойных везикул Cer1/Cer6/Ch/PA/ChS с соотношением компонент 30/30/20/15/5 (вес. %) в избытке воды с рН = 7.2 при изменении температуры в диапазоне 20-90°C.

состоит из двух короткопериодных фаз с периодами повторяемости $d = 47 \text{ \AA}$ и $d = 35.7 \text{ \AA}$, а также длиннопериодной фазы с $d = 127 \text{ \AA}$. При увеличении рН до 9.0 происходит разрушение длиннопериодной фазы, а короткопериодная фаза сохраняется с $d = 48.3 \text{ \AA}$. Модельная мембрана SC, содержащая длинноцепочечный церамид 1, в избытке воды с рН=7.2 и рН=9.0 находится в кристаллической L_c фазе (рисунок 7а).

Длиннопериодная фаза сохраняется при температуре ниже 60°C. На рисунке 7б показаны дифракционные спектры малоугловой ламеллярной дифракции от многослойных везикул с обозначенным выше составом, которые подтверждают это положение.

В присутствии длинноцепочечного церамида, достаточным условием формирования длиннопериодной фазы в модельной мембране липидной матрицы SC является наличие избытка воды, низкое значение рН (до 9.0) и низкая температура (до 60°C). Результаты, представленные в третьей главе, опубликованы в работе [2А].

В четвертой главе рассмотрена рекристаллизация модельных мембран верхнего слоя кожи на основе церамида 6. При использовании модельных мембран для исследования нативного матрикса важно рассмотреть их устойчивость и обратимость структурных переходов при температурном воздействии, так как кожа должна поддерживать свои барьерные свойства в широком диапазоне температур.

Использование модельных мембран требует выяснения вопроса о стабильности структуры модельных липидных мембран липидного матрикса верхнего слоя кожи. В данной главе рассматриваются образцы с составом церамид 6/холестерин/пальмитиновая кислота/сульфат холестерина = 55/25/15/5 (вес. %).

Степень кристалличности образца можно характеризовать как отношение рассеяния кристаллической фазы к общему рассеянию от аморфных и кристаллических обла-

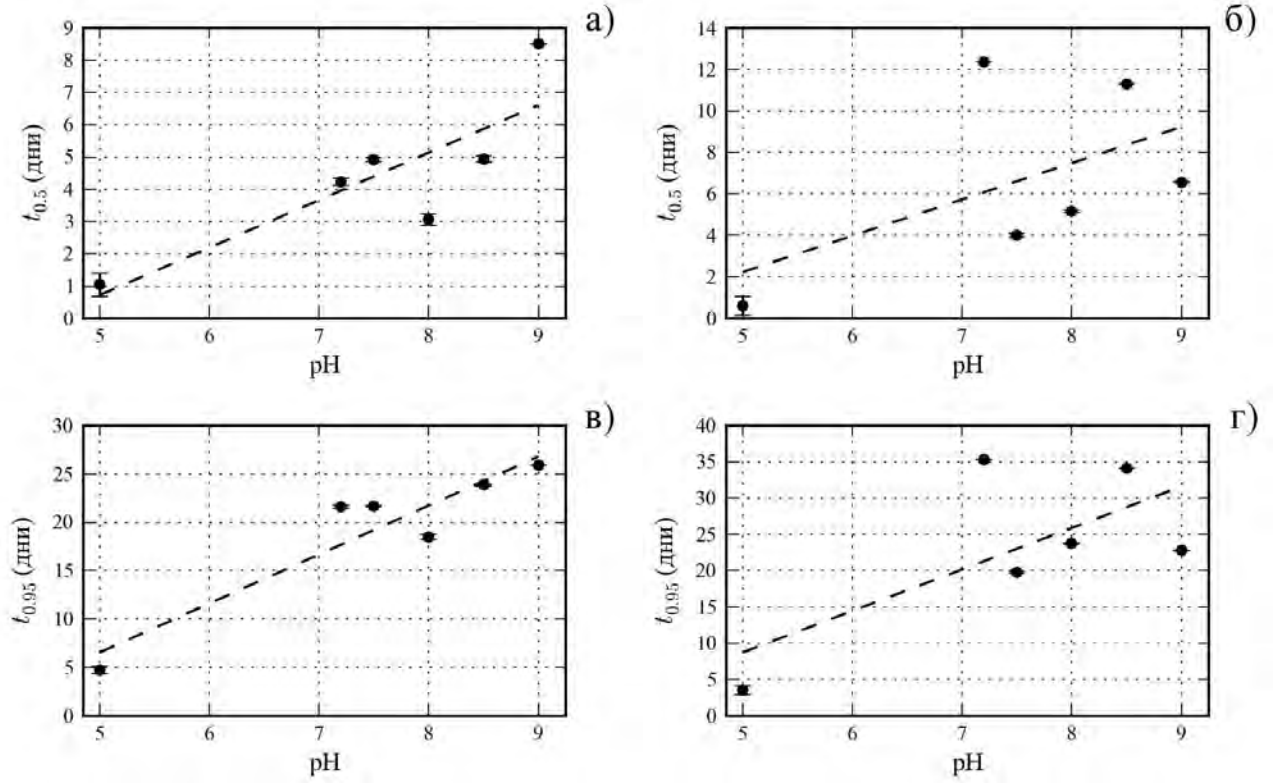


Рис. 8. Время рекристаллизации в зависимости от pH раствора. а) Время $t_{0.5}$ для ламеллярной рекристаллизации; б) Время $t_{0.5}$ для латеральной рекристаллизации; в) Время $t_{0.95}$ для ламеллярной рекристаллизации; г) Время $t_{0.95}$ для латеральной рекристаллизации; стей [17].

Интенсивность рассеяния от исследуемого образца I_s является суммой интенсивностей от кристаллической и аморфной фаз ($I_s = I_{am} + I_c$), поэтому то же самое можно записать через интенсивность рассеяния от аморфной фазы I_{am} .

$$\chi_c = 1 - \frac{\int_0^\infty I_{am}(q) dq}{\int_0^\infty I(q) dq} \quad (5)$$

где q - величина модуля вектора рассеяния. - длина волны падающего излучения.

В обобщенном смысле можно рассматривать любое характерное состояние образца в метастабильном состоянии после воздействия на этот образец извне как базовое I_{ref} «аморфное» состояние, и рассматривать эволюцию системы во времени относительно этой базовой фазы, то есть $I_{ref} = I_{am}$.

Для описания кинетики рекристаллизации часто используют зависимость, описываемую уравнением Авраами-Колмогорова [18] в форме

$$\chi_c = 1 - \exp(-kt^n) \quad (6)$$

Рассчитанные из уравнения Авраами-Колмогорова (6) характерные времена процессов $t_{0.5}$ и $t_{0.95}$, равные временам которые требуются для превращения в кристаллическую фазу 50

и 95% (вес.) образца составляют соответственно:

$$t_{0.5} = \left(\frac{\ln 2}{k} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (7)$$

$$t_{0.95} = \left(\frac{\ln 20}{k} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (8)$$

Липидные мембраны характеризуются наличием двух разных по масштабам видов упорядоченности, поэтому следует их рассмотреть по отдельности. Границы отдельной области на шкале q обозначим через q_1 и q_2 . Тогда формулу (5) можно переписать в виде

$$\chi_c = 1 - \frac{\int_{q_1}^{q_2} I_{ref}(q) dq}{\int_{q_1}^{q_2} I_s(q) dq} \quad (9)$$

где I_{ref} - интенсивность рассеяния от образца, выбранного в качестве базового, относительно которого рассматривается эволюция системы (I_s). В случае изучения рекристаллизации за базовую выбирается аморфная фаза ($I_{ref} = I_{am}$).

Степень кристалличности χ_c определялась по спектрам дифракции по формуле 9. Полученная зависимость $\chi_c(t)$ аппроксимировалась линейной регрессией в координатах $(\ln(-\ln(1-\chi_c)), \ln t)$. Характерное время превращения образцов (рекристаллизации) определялось по формулам (7) и (8).

В состоянии равновесия четырехкомпонентная липидная система является жидким кристаллом, состоящим из повторяющихся бислоев липидов. На спектрах рассеяния рентгеновского излучения наблюдаются серии дифракционных пиков, что говорит о наличии дальнего порядка как в плоскости бислоев, так и в перпендикулярном направлении. Дальний порядок разрушается в обоих направлениях при нагревании выше температуры плавления углеводородных хвостов.

На рисунке 8 показаны зависимости времен рекристаллизации $t_{0.5}$ (50% рекристаллизации) и $t_{0.95}$ (95% рекристаллизации) от pH растворителя для ламеллярной (в направлении нормали к бислою) и латеральной (в плоскости бислоя) областей и аппроксимация этих зависимостей линейной функцией. Для ламеллярной дифракции (8а и 8в) заметен линейный рост обоих времен рекристаллизации с ростом pH. Для латеральной области (8б и 8г) сильной линейной зависимости времени рекристаллизации углеводородных хвостов от pH не наблюдается. Из этого можно сделать вывод об относительной независимости времени упорядочивания углеводородных хвостов в зависимости от pH.

Рассматриваемая модельная липидная мембрана *stratum corneum* на основе церамида 6 является обратимым объектом в термотропных процессах и может быть использована для изучения влияния веществ, увеличивающих проницаемость верхнего слоя кожи и диффузии лекарств. Время рекристаллизации модельной мембраны липидной матрицы SC на основе церамида 6 нерегулярно зависит от pH раствора и для $\text{pH} > 7.0$ составляет в среднем 21 день. При $\text{pH} = 5.0$ время рекристаллизации минимально и составляет в среднем 4 дня.

В заключении представлены краткие результаты и выводы работы.

1. Определена ламеллярная и латеральная структура двух модельных липидных мембран липидной матрицы *stratum corneum* (SC) в избытке воды;

2. Фазовое состояние четырехкомпонентной липидной мембраны с составом церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина и весовым соотношением компонент 55/25/15/5 зависит от pH. При pH = 9.0 наблюдаются четыре ламеллярные фазы. При pH = 7.2 наблюдаются 3 ламеллярные фазы.
3. Увеличение pH воды приводит к уменьшению температуры фазового перехода ($L_c \rightarrow L_\alpha$) липидной мембраны с составом церамид 6/ холестерин/ пальмитиновая кислота/ сульфат холестерина, при этом профили электронной плотности не имеют выраженной зависимости от pH.
4. Установлено, что полная гидратация четырехкомпонентной липидной мембраны на основе церамида 6 не приводит к нарушению сверхсильного межмембранного взаимодействия. Липидные бислои четырехкомпонентной модельной мембраны липидной матрицы SC находятся в стерическом контакте при полной гидратации.
5. В присутствии длинноцепочечного церамида, достаточным условием формирования длиннопериодной фазы в модельной мембране липидной матрицы SC является наличие избытка воды, низкое значение pH (до 9.0) и низкая температура (до 60°C).
6. Время рекристаллизации модельной мембраны липидной матрицы SC на основе церамида 6 нерегулярно зависит от pH раствора и для pH > 7.0 составляет в среднем 21 день. При pH = 5.0 время рекристаллизации минимально и составляет в среднем 4 дня.

Многофазность подразумевает наличие фазовых границ в липидном бислое. Фазовые границы образуют локальные нарушения структуры бислоя, которые облегчают его проницаемость. Наличие сильного межмембранного взаимодействия между липидными бислоями позволяет предположить, что доставка веществ может происходить преимущественно по липофильному пути. Исследование различных факторов, влияющих на проницаемость межклеточного матрикса верхнего слоя кожи, позволит создавать эффективные трансдермальные переносчики веществ.

Список публикаций по теме диссертации

- 1А. Грузинов А. Ю., Киселев М. А., Ермакова Е. В., Забелин А. В. Термотропные фазовые переходы в модельных мембранах верхнего слоя кожи, построенных на основе церамида 6 // Физика твердого тела. 2014. Т. 56, № 1. С. 134–137.
- 2А. Киселев М. А., Ермакова Е. В., Грузинов А. Ю., Забелин А. В. Формирование длиннопериодной фазы в модельных мембранах верхнего слоя кожи (stratum corneum) // Кристаллография. 2014. Т. 59, № 1. С. 123–128.
- 3А. Грузинов А. Ю., Ермакова Е. В., Забелин А. В., Киселев М. А. Синхротронные исследования фазовых переходов модельных липидных мембран верхнего слоя кожи

- при разных рН // 11-я Курчатовская молодежная научная школа, 12-15 ноября 2013 г.: Сборник аннотаций. Москва: 2013. С. 105.
- 4A. Gruzinov A., Kiselev M., Ermakova E., Zabelin A. SAXS/WAXS diffraction study of phase transition in model lipid membranes of stratum corneum using synchrotron radiation // International Soft Matter Conference 2013, September 15-19 – Rome, Italy: Book of Poster Abstracts / Ed. by L. Rovigatti. Rome: 2013. P. 184.
- 5A. Gruzinov A. Y., Kiselev M. A., Ermakova E. V., Zabelin A. V. Thermotropic phase transitions in model lipid membranes based on ceramide 6: pH influence // RACIRI Summer school 2013: "Advanced Materials Design at X-ray and Neutron Facilities: Soft Matter and Nano Composites" Book of Abstract / Ed. by N. Grigoryeva. Saint-Petersburg: Publishing house "SOLO" 2013. P. 43.
- 6A. Грузинов А. Ю., Орелович О. Л., Ермакова Е. В. и др. Исследование фазового состояния модельных липидных мембран на основе церамида 6 на синхротроне // 47-ая школа ФГБУ «ПИАФ» НИЦ КИ по Физике Конденсированного Состояния, 11-16 марта 2013/Тезисы докладов. Гатчина: 2013. С. 57.
- 7A. Грузинов А. Ю., Орелович О. Л., Ермакова Е. В. и др. Исследование модельных липидных мембран на основе церамида 6 с помощью дифракции синхротронного излучения // XXII СОВЕЩАНИЕ по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния - РНИКС 2012, 15-19 октября 2012: Сборник тезисов. Гатчина: 2012. С. 31.
- 8A. Грузинов А. Ю., Орелович О. Л., Ермакова Е. В. и др. Фазовое состояние модельных липидных мембран верхнего слоя кожи на основе церамида 6 // Международная молодежная научная школа «Современная нейтронография» , 24-28 сентября 2012 г.: Тезисы докладов. Дубна: 2012. С. 17.
- 9A. Gruzinov A. Y., Orelovich O. L., Ermakova E. V. et al. Thermotropic phases study in stratum corneum lipid models containing ceramide using synchrotron radiation // Annual Summer School "Self Assembly in Soft Matter Systems" July 8-13 , 2012: Book of Abstracts. Mittelwihr: 2012. P. 36.
- 10A. Грузинов А. Ю., Орелович О. Л., Ермакова Е. В., Киселев М. А. Исследование модельных липидных мембран на основе церамида 6 с помощью дифракции синхротронного излучения // Международная молодежная научная школа «Современная нейтронография», 31 октября-4 ноября 2011 г.: Тезисы докладов. Дубна: 2011. С. 32.
- 11A. Kiselev M., Ermakova E., Gruzinov A. et al. Nanostructure of the Model Stratum Corneum Membranes // Book of Abstract of the 4th Japan–Russia International Workshop MSSMBS'10 - "Molecular Simulation Studies in Material and Biological Sciences" / Ed. by K. T. Kholmurodov. Dubna: 2010. Pp. 35–36.
- 12A. Грузинов А. Ю., Орелович О. Л., Ермакова Е. В., Киселев М. А. Исследование кристаллизации липидных мембран, построенных на основе церамида 6 // VII Национальная конференция «Рентгеновское, Синхротронное излучения, Нейтроны и Электроны для исследования наносистем и материалов. Нано-Био-Инфо-Когнитив-

ные технологии» РСНЭ – НБИК 2009, 16-21 ноября 2009: Тезисы докладов. Москва: ИК РАН - РНЦ КИ, 2009. С. 71.

- 13А. Ермакова Е. В., Грузинов А. Ю., Найда О. В. и др. Условия образования длиннопериодной фазы в модельных мембранах верхнего слоя кожи *stratum corneum* // VII Национальная конференция «Рентгеновское, Синхротронное излучения, Нейтроны и Электроны для исследования наносистем и материалов. Нано-Био-Инфо-Когнитивные технологии» РСНЭ – НБИК 2009, 16-21 ноября 2009: Тезисы докладов. Москва: ИК РАН - РНЦ КИ, 2009. С. 75.

Цитируемая литература

- Gordeliy V. I., Kiselev M. A. Definition of lipid membrane structural parameters from neutronographic experiments with the help of the strip function model. // *Biophysical journal*. 1995. Vol. 69, no. 4. Pp. 1424–8.
- Kiselev M. A., Ryabova N. Y., Balagurov A. M. et al. New insights into the structure and hydration of a *stratum corneum* lipid model membrane by neutron diffraction. // *European biophysics journal : EBJ*. 2005. Vol. 34, no. 8. Pp. 1030–40.
- Kiselev M. A., Gutberlet T., Lesieur P. et al. Properties of ternary phospholipid/dimethyl sulfoxide/water systems at low temperatures. // *Chemistry and physics of lipids*. 2005. Vol. 133, no. 2. Pp. 181–93.
- Kiselev M. A. Conformation of ceramide 6 molecules and chain-flip transitions in the lipid matrix of the outermost layer of mammalian skin, the *stratum corneum* // *Crystallography Reports*. 2007. Vol. 52, no. 3. Pp. 525–528.
- Ryabova N. Y., Kiselev M. A., Balagurov A. M. Transition processes in *stratum corneum* model lipid membranes with a mixture of free fatty acids // *Biophysics*. 2009. Vol. 54, no. 5. Pp. 598–606.
- Schröter A., Kessner D., Kiselev M. A. et al. Basic nanostructure of *stratum corneum* lipid matrices based on ceramides [EOS] and [AP]: a neutron diffraction study. // *Biophysical journal*. 2009. Vol. 97, no. 4. Pp. 1104–14.
- Tristram-Nagle S., Liu Y., Legleiter J., Nagle J. J. F. Structure of gel phase DMPC determined by X-ray diffraction. // *Biophysical journal*. 2002. Vol. 83, no. 6. Pp. 3324–35.
- Bouwstra J., Honeywell-Nguyen P. Skin structure and mode of action of vesicles // *Advanced drug delivery reviews*. 2002. Vol. 54 Suppl 1. Pp. S41–55.
- Wartewig S., Neubert R. H. H. Properties of ceramides and their impact on the *stratum corneum* structure: a review. Part 1: ceramides. // *Skin pharmacology and physiology*. 2007. Vol. 20, no. 5. Pp. 220–9.
- Киселев М. А. Методы исследования липидных наноструктур на нейтронных и синхротронных источниках // *ЭЧАЯ*. 2011. № 42. С. 578–635.
- Bagatolli L. To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. // *Biochimica et biophysica acta*. 2006. Vol. 1758, no. 10. Pp. 1541–56.

12. Nagle J. F., Tristram-Nagle S. Structure of lipid bilayers // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 2000. Vol. 1469, no. 3. Pp. 159–195.
13. Mouritsen O. G. Theoretical models of phospholipid phase transitions. // *Chemistry and physics of lipids*. 1991. Vol. 57, no. 2-3. Pp. 179–94.
14. Elias P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. // *The Journal of investigative dermatology*. 1983. Vol. 80, no. 1 Suppl. Pp. 44s–9s.
15. Raudenkolb S., Wartewig S., Neubert R. H. H. Polymorphism of ceramide 6: a vibrational spectroscopic and X-ray powder diffraction investigation of the diastereomers of N-(alpha-hydroxyoctadecanoyl)-phytosphingosine. // *Chemistry and physics of lipids*. 2005. Vol. 133, no. 1. Pp. 89–102.
16. Träuble H., Teubner M., Woolley P., Eibl H. Electrostatic interactions at charged lipid membranes // *Biophysical Chemistry*. 1976. Vol. 4, no. 4. Pp. 319–342.
17. Рабек Я. Экспериментальные методы в химии полимеров. Москва: Мир, 1983.
18. Вест А. Химия твердого тела. Теория и приложения. Москва: Мир, 1988.