

Термотропные фазовые переходы в модельных мембранах верхнего слоя кожи, построенных на основе церамидов 6

© А.Ю. Грузинов¹, М.А. Киселев^{1,2}, Е.В. Ермакова², А.В. Забелин¹

¹ НИЦ „Курчатовский институт“,
Москва, Россия

² Объединенный институт ядерных исследований,
Дубна, Россия

E-mail: angruzinov@gmail.com

Липидный межклеточный матрикс верхнего слоя кожи *stratum corneum* представляет собой многослойную мембрану, состоящую из сложной смеси различных липидов: керамидов, жирных кислот, холестерина и его производных. Основу многослойной мембраны составляет липидный бислой — двухмерный жидкий кристалл. В настоящее время установлено, что основной путь проникновения вещества через кожу протекает именно через липидный матрикс. Сложность реальной биологической системы не позволяет достоверно исследовать ее свойства напрямую, поэтому часто выбирается метод моделирования системы. Методом дифракции рентгеновского синхротронного излучения изучались фазовые переходы в липидной системе, моделирующей по составу нативную липидную матрицу *stratum corneum*.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования „Курчатовский центр синхротронного излучения и нанотехнологий“ в рамках государственного контракта № 16.552.11.7055, а также при поддержке грантов РФФИ № 12-02-00686-а и 12-02-12045-офи_м.

1. Введение

Верхний роговой слой кожи (*stratum corneum*) является главным барьером на пути проникновения веществ (малых молекул) через кожу. Он состоит из отмерших клеток — корнеоцитов и межклеточного матрикса, основу которого составляет многослойная липидная мембрана. В настоящее время установлено, что основной путь трансдермального транспорта веществ лежит именно через межклеточный матрикс [1].

Межклеточный матрикс представляет собой стопку липидных бислоев, которые разделены межмембранным пространством, заполненным молекулами воды. Липидный бислой является жидким кристаллом, который может находиться в различных фазовых состояниях. С точки зрения упорядочения углеводородных хвостов липидный бислой характеризуется тремя фазовыми состояниями: кристаллическая, гель- и жидкая фазы. Вопрос о фазовом состоянии липидной матрицы верхнего слоя кожи является предметом современных исследований [2]. Одним из методов исследования наноструктуры липидных систем является дифракция рентгеновских лучей [3].

Наиболее удобными для исследований являются модельные липидные системы, состоящие из липидов, взятых в известных пропорциях. Специфика биологических образцов требует использования для исследований источников излучения высокой яркости для получения дифракционных картин за разумное время. Такими источниками в настоящее время являются синхротроны, которые все чаще находят применение для решения не только физических, но биологических и медицинских задач [4].

В настоящей работе исследовались фазовые переходы при изменении температуры модельной системы, имитирующей по составу основных компонентов нативный

межклеточный матрикс *stratum corneum* (SC). Измерения проводились на станции „ДИКСИ“ Курчатовского источника синхротронного излучения „Сибирь-2“.

Липиды представляют собой амфифильные молекулы, имеющие две части, различающиеся наличием заряда: полярная „голова“ и неполярный „хвост“. В полярном растворителе (воде) такие молекулы стремятся уменьшить свободную энергию за счет сокращения площади контакта неполярной области молекулы с молекулами воды, образуя таким образом двойной липидный бислой [5].

Наиболее изучены фазовые переходы в мембранах фосфолипидов [6–8]. Для ряда фосфолипидов характерно существование так называемого предперехода перед основным фазовым переходом из „кристаллического“ в жидкое состояние, характеризующееся наличием только ближнего порядка в положениях центров масс молекул. Для кристаллической и гель-фазы характерен дальний порядок. Промежуточную стадию называют риппл-фазой и связывают с образованием доменов гель- и жидкой фазы с характерной длиной ондуляции (волн на поверхности) около 140 Å [9]. Общая для всех фаз слоевая структура при этом сохраняется.

Также для фосфолипидов характерно наличие более сложных морфологических фаз, сопровождающихся пространственными изменениями структуры, таких как гексагональные и кубические фазы. Подобные морфологические фазовые переходы могут происходить при варьировании не только температуры, но и давления, что важно для понимания сохранения биологических функций мембран животных, обитающих на больших глубинах. Детальное их описание приведено в обзоре [10].

Известно, что 50% верхнего слоя кожи SC составляют отмершие клетки (корнеоциты) [11], остальное составляют липиды. Липиды в свою очередь представлены

в основном церамидами (55%) и жирными кислотами (25%). Также одна из важных составляющих — холестерин (15%) и его производные, основным из которых является сульфат холестерина (~5%). Фазовые переходы липидной матрицы SC изучены слабо. Их исследование ведется в основном на модельных мембранах SC.

Наличие градиента pH в коже также влияет на ее проницаемость. В нормальном здоровом состоянии кожа имеет pH от 5.0 до 6.5 в зависимости от расположения, а также пола и возраста пациента [12–15].

Модельная липидная мембрана SC, построенная на основе церамида 6, с составом церамид 6/пальмитиновая кислота/холестерин/сульфат холестерина и соотношением компонентов 55/25/15/5 исследовалась методом дифракции нейтронов при ее частичной гидратации. Многослойная мембрана приготавливалась на кварцевой подложке и гидратировалась парами воды в камере с фиксированной влажностью. Результаты исследований показали, что при физиологических температурах и частичной гидратации такая мембрана является однофазной с периодом повторяемости 45.6 Å. Помещение мембраны в избыток воды приводит к увеличению периода повторяемости до 46.5 Å [16].

Разрешение нейтронного дифрактометра (точность определения величины вектора рассеяния $\Delta q/q$), использованного в работе [16], составляло 0.01, что на порядок хуже разрешения установок на синхротронных источниках.

Целью настоящей работы является исследование структуры мембраны с составом церамид 6/пальмитиновая кислота/холестерин/сульфат холестерина (соотношение компонентов 55/25/15/5) в избытке воды на дифракционной установке с более высоким разрешением [17].

2. Материалы и методы

2.1. Приготовление образцов. Образцы (многослойные везикулы в избытке воды) для исследований были приготовлены в Лаборатории нейтронной физики Объединенного института ядерных исследований из синтезированных компонентов SC.

Для моделирования липидной матрицы SC были выбраны наиболее важные компоненты в пропорции церамид 6/пальмитиновая кислота/холестерин/сульфат холестерина, равной 55/25/15/5. Компоненты растворялись в смеси метанол/хлороформ и затем смешивались в чашке Петри с последующим выпариванием растворителя (метанол/хлороформ) в течение суток сначала при комнатных условиях, а затем в вакуумном шкафу. Полученная липидная пленка растворялась в избытке деионизированной воды 18 MΩ·cm (MilliQ, Франция), содержащей соответствующие количества буфера Trizma или фосфат-цитратного буфера (Sigma, Германия) для поддержания нужного значения pH.

Образцы центрифугированием (при скорости не более 1000 min⁻¹) помещались в кварцевые капилляры (GLAS, Германия) с толщиной стенок 0.1 mm и диаметром от 2

до 2.4 mm и закрывались несколькими слоями парафильма (Parafilm, США). Затем капилляры помещались во вкладыш специально изготовленного латунного держателя образцов, соединенного с водным термостатом (Fisherbrand). Диапазон температур изменялся от 20 до 90°C.

2.2. Станция „ДИКСИ“. Станция „ДИКСИ“ расположена на канале 1.3а поворотного магнита накопителя электронов „Сибирь-2“ (НИЦ „Курчатовский институт“). Энергия рентгеновского синхротронного излучения фиксирована монохроматором Ge (111) и соответствует длине волны 1.6 Å. Изгибом кристалла монохроматора осуществляется фокусировка пучка в горизонтальной плоскости. Фокусировка пучка в вертикальной плоскости обеспечивается с помощью кварцевого зеркала с контролируемым изгибом. Коллимация и устранение нежелательного фона от пучка, вторично рассеянного на элементах канала, производится тремя танталовыми щелями, расположенными на оптической оси. Каждая щель имеет четыре подвижные створки, управляемые дистанционно.

Рассеянное излучение регистрируется с помощью рентгеночувствительной пластины Imaging Plate. Расстояние образец–детектор в процессе измерений не изменялось и составляло 271 mm. Калибровка геометрии эксперимента велась с помощью стандарта из бегената серебра [18]. Получаемые двумерные картины рассеяния обрабатывались с помощью программы FIT2D (ESRF, Франция).

2.3. Определение периода повторяемости. На рис. 1 представлена последовательность дифракционных спектров, записанных при рассеянии рентгеновских лучей от неориентированных многослойных липидных везикул SC при различных температурах. Здесь q — модуль вектора рассеяния,

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta)}{\lambda}, \quad (1)$$

где λ — длина волны падающего излучения, 2θ — угол рассеяния.

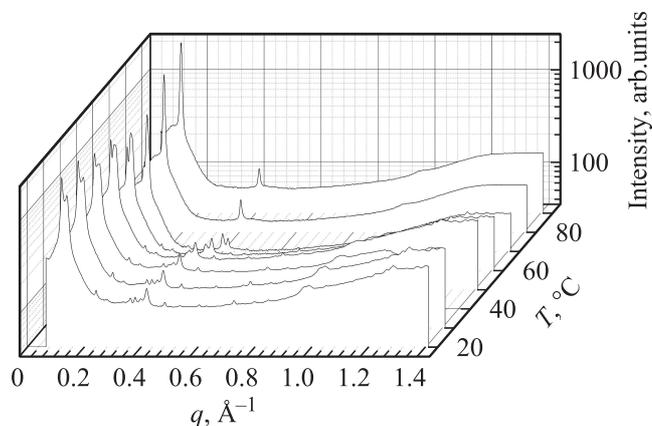


Рис. 1. Дифракционные спектры от модельной мембраны SC с pH = 9.0 при варьировании температуры. q — модуль вектора рассеяния.

Исходя из эквидистантности положения дифракционных пиков на шкале q (обратное пространство) нескольких порядков отражения в области малых углов было определено, что в образце есть только ламеллярная фаза. Период повторяемости модельной мембраны SC определялся по формуле

$$d = \frac{2\pi}{\Delta q}, \quad (2)$$

где Δq — относительное расстояние в обратном пространстве между двумя последовательными пиками ламеллярной фазы. Также определялась ошибка регистрации модуля вектора рассеяния

$$\frac{\Delta q}{q} = \sqrt{\left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\theta}{\theta}\right)^2}. \quad (3)$$

Для германиевого монохроматора $\Delta\lambda/\lambda \approx 10^{-3}$. Из линейных размеров установки и размеров пикселя изображения следует значение углового разрешения $\Delta\theta/\theta \approx 10^{-4}$. Таким образом, $\Delta q/q \approx 10^{-3}$. Это определяет разрешение эксперимента. Из выражения (2) также следует, что $\Delta q/q = \Delta d/d$, что дает относительную погрешность определения периода повторяемости.

3. Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены дифракционные спектры при варьировании температуры для модельной липидной мембраны с рН = 9.0. Для системы с рН = 9.0 наблюдается четыре фазы (фазы A, B, C, D) с различными периодами повторяемости многослойной мембраны.

Для выделения различных фаз первый порядок отражения аппроксимирован гауссианами. На рис. 2 показана подгонка интенсивности отражения первого порядка при 20°C четырьмя гауссианами. Фазы A–D соответствуют порядку уменьшения межплоскостных расстояний. Фазы A и D являются мажорными, так как имеют максимальную интенсивность рассеяния. Фазы B и C являются минорными, так как имеют минимальную интенсивность рассеяния. Аналогичные расчеты проводились для других спектров.

Полученные из анализа, представленного на рис. 2, значения периодов повторяемости фаз A, B, C, D хорошо совпадают с положениями пиков третьего порядка отражения для этих фаз, которые лучше разрешены при больших значениях q (рис. 1).

На рис. 3 показано изменение межплоскостных расстояний (периода повторяемости d) при увеличении температуры. При температуре выше 70°C система становится однородной с сохранением единственной минорной фазы ($d = 41.4 \text{ \AA}$). Кристаллическое состояние с упорядоченной упаковкой углеводородных хвостов ($q \sim 1.1 \text{ \AA}^{-1}$) переходит в жидкокристаллическую фазу.

Для многослойных везикул SC, находящихся в избытке воды с рН = 7.2, общее поведение является аналогичным (рис. 4). На рис. 5 показано изменение периода

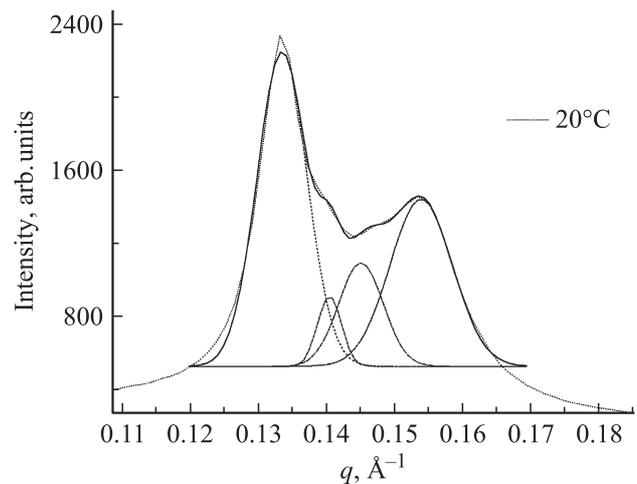


Рис. 2. Описание интенсивности дифракционного отражения первого порядка четырьмя гауссианами для модельной мембраны SC, находящейся в избытке воды с рН = 9.0.

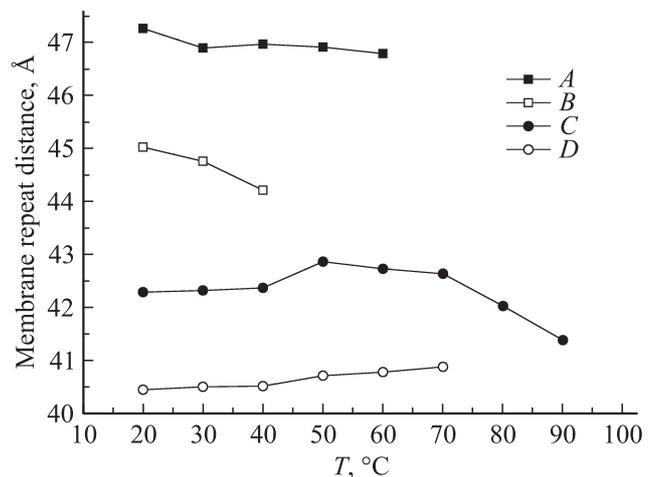


Рис. 3. Зависимость периода повторяемости модельной мембраны SC для четырехфазной системы (рН = 9.0) от температуры.

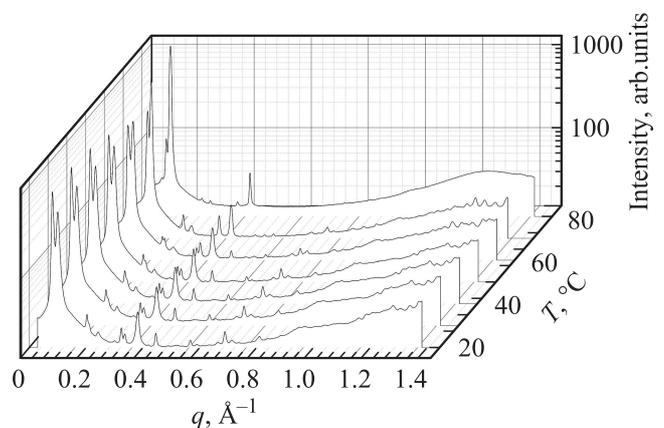


Рис. 4. Дифракционные спектры от модельной мембраны SC, находящейся в избытке воды (рН = 7.2) при варьировании температуры.

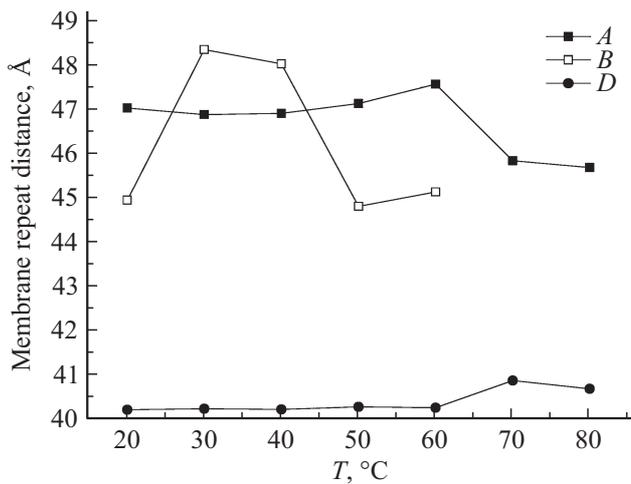


Рис. 5. Зависимость периода повторяемости модельной мембраны SC для трехфазной системы ($\text{pH} = 7.2$) от температуры.

повторяемости мембраны в зависимости от температуры при $\text{pH} = 7.2$.

Видны флуктуации периода повторяемости минорной фазы *B* в области физиологических температур (рис. 5). Многофазность мембраны уменьшается с ростом температуры: при 60°C исчезает минорная фаза *B*.

При $\text{pH} = 7.2$ не происходит перехода мембраны в однофазное состояние до температуры 80°C . Минорная фаза *C*, имеющая место при высоком pH , при $\text{pH} = 7.2$ не наблюдается.

4. Заключение

Исследования на синхротронном источнике позволили установить, что модельная мембрана межклеточного матрикса *stratum corneum*, построенная на основе керамида 6, в избытке воды обладает сложной многофазной структурой, зависящей от температуры и pH растворителя. Ламеллярная трехфазность системы при низком значении $\text{pH} = 7.2$ заменяется на четырехфазную при увеличении pH до 9. При $\text{pH} = 7.2$ система является более устойчивой относительно увеличения температуры. При температуре 80°C мембрана с $\text{pH} = 7.2$ является двухфазной, а мембрана с $\text{pH} = 9.0$ переходит в однофазное состояние.

Список литературы

- [1] E. Mckie, G.M. Golden, J.E. McKie, R.O. Potts. *J. Pharm. Sci.* **76**, 25 (1987).
- [2] K.R. Feingold. *J. Lipid Res.* **50**, 41 (2009).
- [3] М.А. Киселев. *ЭЧАЯ* **42**, 578 (2011).
- [4] P. Suortti, W. Thomlinson. *Phys. Med. Biol.* **48**, R1 (2003).
- [5] C. Tanford. *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*. 2nd ed. John Wiley & Sons, (1980). 233 p.
- [6] N. Kucerka, Y. Liu, N. Chu, H.I. Petrache, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle. *Biophys. J.* **88**, 2626 (2005).
- [7] H. Mantsch, R. McElhane. *Chem. Phys. Lipids* **57**, 213 (1991).
- [8] D. Marsh. *Chem. Phys. Lipids* **57**, 109 (1991).
- [9] A.H. de Vries, S. Yefimov, A.E. Mark, S.J. Marrink. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**, 5392 (2005).
- [10] R. Winter. *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 160 (2002).
- [11] K.C. Madison. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 231 (2003).
- [12] A.V. Rawlings. *Int. J. Cosmet. Sci.* **28**, 79 (2006).
- [13] M. Denda, J. Koyama, J. Hori, I. Horii, M. Takahashi, M. Hara, H. Tagami. *Archiv. Dermatol. Res.* **285**, 415 (1993).
- [14] J. Rogers, C. Harding, A. Mayo, J. Banks, A. Rawlings. *Archiv. Dermatol. Res.* **288**, 765 (1996).
- [15] M.J. Behne, N.P. Barry, K.M. Hanson, I. Aronchik, R.W. Clegg, E. Gratton, K. Feingold, W.M. Holleran, P.M. Elias, T.M. Mauro. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 998 (2003).
- [16] M.A. Kiselev, N.Y. Ryabova, A.M. Balagurov, S. Dante, T. Hauss, J. Zbytovska, S. Wartewig, R.H.H. Neubert. *Eup. Biophys. J.* **34**, 1030 (2005).
- [17] М.А. Киселев, Е.В. Ермакова, Н.Ю. Рябова, О.В. Найда, А.В. Забелин, Д.К. Погорельный, В.Н. Корнеев, А.М. Балагуров. *Кристаллография* **55**, 503 (2010).
- [18] T.C. Huang, H. Toraya, T.N. Blanton, Y. Wu. *J. Appl. Cryst.* **26**, 180 (1993).