

# Исследование структуры многослойных липидных мембран методом дифракции нейтронов в реальном времени

© Н.Ю. Рябова<sup>\*,\*\*</sup>, М.А. Киселев<sup>\*</sup>, А.И. Бескровный<sup>\*</sup>, А.М. Балагуров<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Объединенный институт ядерных исследований,  
Дубна, Московская обл., Россия

<sup>\*\*</sup> Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцына  
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

E-mail: rny03@nf.jinr.ru

Представлены результаты нейтронных дифракционных экспериментов по изучению структурных изменений в многослойных липидных мембранах в зависимости от степени гидратации. Эксперименты выполнены на импульсном реакторе ИБР-2 (Дубна, ОИЯИ) на дифрактометре по времени пролета с многослойной мембраной дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), ориентированной на кварцевой подложке. Структурные параметры определялись по одновременно измеряемым интенсивностям нескольких (до пяти) дифракционных порядков отражения, что дало возможность построения профиля структуры бислоя ДПФХ. Благодаря высокой скорости измерения дифракционных спектров удалось проследить эволюцию ламеллярной структуры липидного бислоя в реальном времени в ходе процессов его гидратации и дегидратации. Минимальное время накопления необходимой статистики составляло 3 min, что позволило с хорошей точностью определить характерные времена переходных процессов в мембране.

Финансирование работы осуществлялось по гранту Президента РФ для поддержки ведущих научных школ (№ НШ-1354.2003.2).

## 1. Введение

Гидратация липидной мембраны является важной характеристикой, которая определяет как ее структурную организацию, так и макроскопические свойства. Исследование процессов гидратации липидных мембран возможно с помощью рентгеновских или нейтронных дифракционных экспериментов на ориентированных липидных мультислоях (мембранах), осажденных на подложку. Как правило, в этих экспериментах удается измерить интенсивности нескольких порядков отражения от периодической ламеллярной структуры. Их анализ позволяет получить информацию об основных параметрах структуры (периоде липидного бислоя, распределении воды между бислоями, размерах гидрофильной и гидрофобной областей), которые необходимы для анализа свойств липидной мембраны — текучести, упругости, межмембранных взаимодействий [1].

Определение структуры бислоев из дифракционных спектров проводится с помощью стандартной процедуры Фурье-преобразования экспериментальных структурных факторов в профиль плотности длины рассеяния нейтрона, впервые примененной для анализа липидных мембран еще в 1970-х годах [2–5]. Поскольку в дифракционном эксперименте измеряются интенсивности пиков, необходимые для построения профиля centrosymmetric структуры бислоя знаки структурных факторов остаются неизвестными. В случае дифракции рентгеновских лучей эта проблема может быть решена с помощью метода „набухания“ (swelling technique), в котором используется непрерывность зависимости структурных

факторов ламеллярной структуры от ее периода. Существенной особенностью дифракции нейтронов является возможность определения знаков структурных факторов с помощью процедуры изоморфного замещения  $H_2O$  на  $D_2O$ . Этот метод отличается надежностью и необходимостью трех дополнительных измерений [4]. Высокая чувствительность рассеяния нейтронов к замене легкой воды на тяжелую и к избирательному дейтерированию отдельных компонент структуры мембраны может быть использована и для построения разностных распределений по методу Паттерсона, сравнение которых с модельными расчетами также позволяет определять знаки структурных факторов.

Дифракционные исследования кинетики водного обмена в липидных многослойных структурах представляют самостоятельный интерес, поскольку только с их помощью можно получить полную информацию как о скорости процесса, так и об изменениях структуры во времени. Необходимым условием успешности такого типа экспериментов является достаточно большая скорость накопления экспериментальных данных, а именно дифракционный спектр должен быть измерен за время, заметно меньшее, чем постоянная времени изучаемого процесса. Первые нейтронные дифракционные исследования кинетических процессов в ориентированных модельных фосфолипидных мембранах выполнялись с середины 1980-х годов на импульсном высокопоточном реакторе ИБР-2 (Дубна, ОИЯИ) с использованием метода времени пролета. Было показано, в частности, что с хорошей точностью эти процессы подчиняются экспоненциальному закону и имеют, как правило, две или

более стадий, различающихся характерным временем. Например, в работе [6] при изучении сорбции и десорбции воды в мультислоях из дипальмитоиллецитина и яичного лецитина были обнаружены быстрая фаза с характерным временем  $\tau_c \approx 1$  min и медленные фазы с  $\tau_c$  до десятков минут. В экспериментах с мультислоями из смеси фосфатидилхолина-фосфатидилглицерина (в стехиометрии 1:1) по изотопному обмену легкой воды на тяжелую и обратно [7] удалось измерить характерное время быстрой фазы процесса: оказалось, что  $\tau_c(\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D}_2\text{O}) = 92$  s,  $\tau_c(\text{D}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}) = 71$  s, т.е. диффузия легкой воды в мембране идет заметно быстрее, чем тяжелой воды.

В указанных работах 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 хорошо ориентированных многослойных мембран было показано [8], что при благоприятных обстоятельствах на дифрактометре по времени пролета на импульсном источнике нейтронов возможна одновременная регистрация нескольких порядков отражения от ламеллярной структуры. При этом появляется возможность наблюдения структурных изменений, происходящих в ходе кинетического процесса, по восстанавливаемым из дифракционных спектров распределениям рассеивающей плотности.

В настоящей работе приведены результаты экспериментов по гидратации и дегидратации многослойной ориентированной мембраны дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), в которых минимальное время накопления статистики составляло 3 min. Одновременно регистрировалось несколько (до пяти) порядков отражения от ламеллярной структуры. Эксперименты позволили проследить изменения структуры бислоя в ходе кинетических процессов и определить их постоянные времени.

## 2. Эксперимент

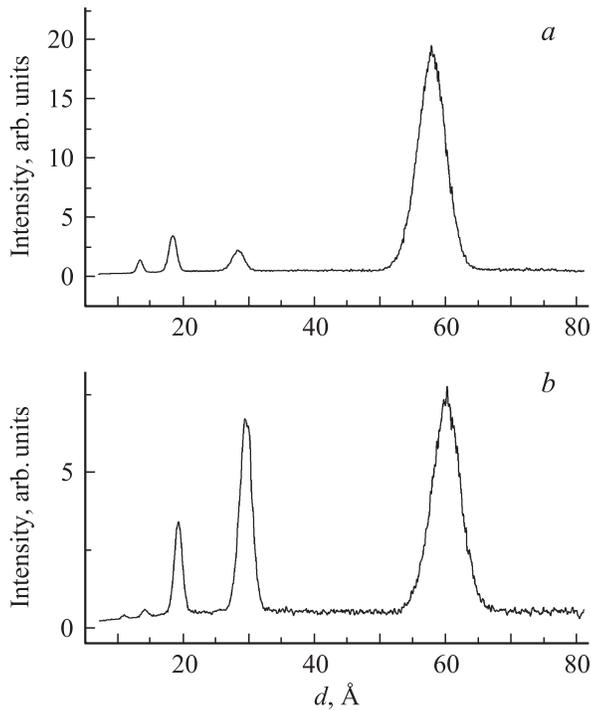
Для получения образца использовалась стандартная процедура приготовления ориентированной липидной мембраны на подложке. 2.4 ml 10 wt.% раствора липида в органическом растворителе (хлороформ/метанол в массовом отношении 2/1) выливалось на кварцевую пластину размером  $65 \times 25$  mm. Образец сушился при комнатной температуре и на 12 h помещался в вакуум для удаления остатка растворителя. Для уменьшения мозаичности образец нагревали несколько раз при 100% влажности выше температуры фазового перехода ( $T_m = 41^\circ\text{C}$  в избытке воды).

Нейтронные дифракционные спектры от ориентированной мембраны ДПФХ были измерены на дифрактометре ДН-2, расположенном на высокопоточном им-

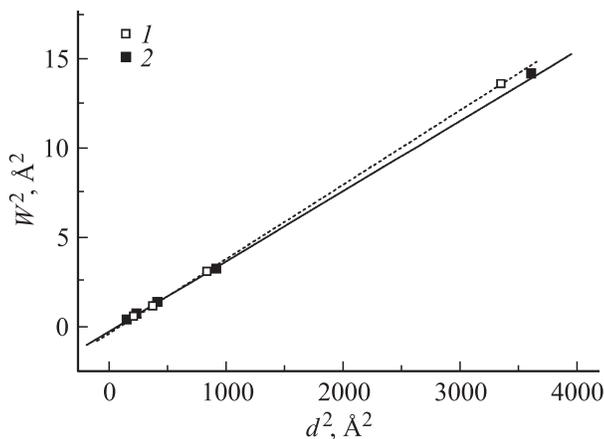
пульсном источнике нейтронов, реакторе ИБР-2. Кинетика водного обмена в мембране ДПФХ исследовалась для случаев гидратации при переходе из состояния с комнатными условиями к высокой относительной влажности (RH) паров воды и затем дегидратации при переходе к низкой относительной влажности: [46% RH, 0 wt.%  $\text{D}_2\text{O}$ ]  $\rightarrow$  [98% RH, 8 wt.%  $\text{D}_2\text{O}$ ]  $\rightarrow$  [58% RH, 8 wt.%  $\text{D}_2\text{O}$ ]. Для этого сухой образец из комнатных условий (относительная влажность 46%,  $20^\circ\text{C}$ ) помещался в алюминиевый контейнер объемом  $2600 \text{ cm}^3$ , внутри которого задавалась относительная влажность 98% с помощью насыщенного раствора соли  $\text{K}_2\text{SO}_4$  в воде с содержанием 8 wt.%  $\text{D}_2\text{O}$  и поддерживалась температура  $20^\circ\text{C}$ . Нейтронограммы регистрировались в течение 457 min с постепенно увеличивающимся временем набора одного спектра. Последовательность регистрации была следующей: три спектра с временем набора 3 min ( $3 \times 3$  min), затем  $3 \times 5$ ,  $3 \times 10$ ,  $1 \times 15$ ,  $2 \times 20$ ,  $4 \times 30$ ,  $3 \times 60$  min. Регистрация первого спектра начиналась через 2 min после помещения насыщенного раствора соли в измерительную камеру. После достижения образцом равновесного состояния раствор соли  $\text{K}_2\text{SO}_4$  заменялся на насыщенный раствор  $\text{NaBr}$ , который задает относительную влажность паров воды 58%. Процесс дегидратации мембраны регистрировался в течение 420 min согласно следующей последовательности:  $1 \times 2$ ,  $3 \times 3$ ,  $2 \times 5$ ,  $2 \times 15$ ,  $1 \times 20$ ,  $4 \times 30$ ,  $3 \times 60$  min.

Для регистрации дифракционных спектров на дифрактометре ДН-2 используется метод времени пролета, полный поток нейтронов на образце составляет  $\sim 10^7 \text{ n/cm}^2 \cdot \text{s}$ , разрешение  $\Delta d/d$  по межплоскостному расстоянию при угле рассеяния  $2\theta = 10^\circ$  близко к 0.1. Для регистрации рассеянных нейтронов использовался двухкоординатный позиционно-чувствительный детектор. Образец устанавливался в геометрии „на отражение“, в этом случае регистрируется так называемая „ламеллярная“ дифракция с передачей импульса перпендикулярно плоскости образца, т.е. брэгговские пики с  $d_h = d_0/h$ , где  $h$  — номер порядка отражения от мембраны,  $d_0$  — период повторяемости липидных бислоев. „Латеральная“ дифракция с передачей импульса параллельно плоскости образца, в основном связанная с рассеянием на упорядоченных углеводородных цепях липидных молекул (см., например, [9]), в настоящей работе не изучалась. Измеренные трехмерные распределения (координатами являлись углы рассеяния в вертикальной и горизонтальной плоскостях и время пролета) сворачивались в одномерные зависимости интенсивности от межплоскостного расстояния  $I(d)$  с помощью специальной программы. В качестве примера измеренные таким образом дифракционные спектры  $I(d)$  показаны на рис. 1.

Из зависимости ширины дифракционных пиков от переданного импульса (межплоскостного расстояния) можно получить оценку характерного размера когерентно рассеивающих блоков мембраны (длины коге-



**Рис. 1.** Нейтронные дифракционные спектры от мембраны ДПФХ, находящейся в состоянии равновесия при RH = 58 (a) и 98% (b), измеренные в течение 60 min. Межплоскостное расстояние, при котором расположен первый порядок отражения, соответствует периоду  $d_0$  липидного бислоя. Положения остальных пиков соответствуют  $d_h = d_0/h$ ,  $h$  — номер порядка отражения от мембраны. Рост интенсивности дифракционных пиков при увеличении влажности демонстрирует увеличение гидратации мультислойной мембраны.



**Рис. 2.** Зависимость квадратов полуширин  $W^2$  рефлексов от квадрата межплоскостных расстояний  $d^2$  для мембраны, находящейся в состоянии равновесия при RH = 58 (1) и 98% (2). Зависимости описаны линейной функцией.

рентности) в направлении, перпендикулярном плоскости мембраны. Функциональную зависимость ширины пиков от межплоскостного расстояния при измерении дифракционного спектра на TOF-дифрактометре можно

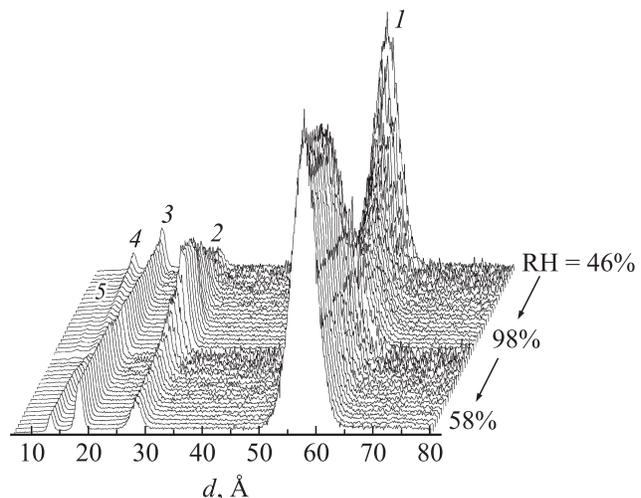
записать как

$$W^2 = C_1 + C_2 d^2 + (\Delta d_0/d_0)^2 d^2 + (0.62/L)^2 d^4, \quad (1)$$

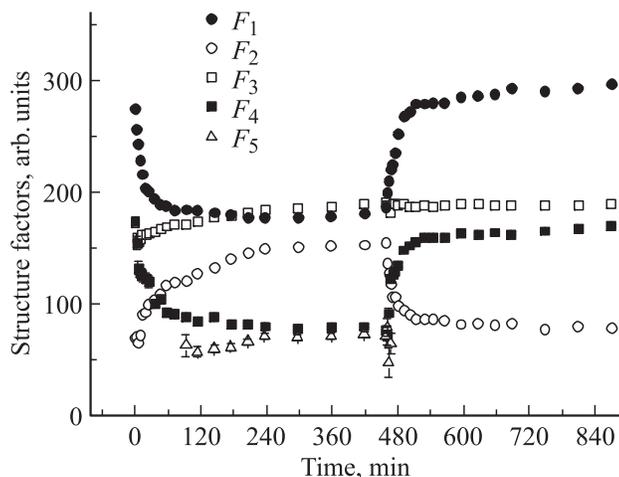
где  $C_1$  и  $C_2$  — константы, определяющие функцию разрешения дифрактометра,  $(\Delta d_0/d_0)$  — относительная дисперсия периода мембраны,  $L$  — характерный размер когерентного блока. Коэффициент 0.62 возникает из-за предположения о гауссовом характере функций, дающих вклад в член с  $L$ . Из рис. 2 видно, что экспериментальные значения квадратов ширин дифракционных пиков хорошо описываются линейной зависимостью (коэффициент линейной корреляции  $R = 0.99997$  для 58% RH и  $R = 0.99934$  для 98% RH).

### 3. Результаты и обсуждение

На рис. 3 представлена последовательность нейтронных дифракционных спектров от исследуемого образца, измеренная в процессе гидратации-дегидратации мембраны. Период повторяемости мембраны определялся по положению первого дифракционного пика. Стандартным методом анализа внутренней структуры бислоя многослойной липидной мембраны является построение распределения плотности длины рассеяния нейтронов (рассеивающей плотности)  $\rho_{\text{exp}}(z)$  вдоль направления, перпендикулярного плоскости мембраны. Это можно сделать, выполняя обратное Фурье-преобразование экспериментальных структурных факторов [3,4]. Из общих свойств Фурье-преобразования следует, что по измерениям вдоль какого-то направления в обратном пространстве периодической структуры структурным фак-



**Рис. 3.** 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 RH = 58%, содержит четыре видимых дифракционных пика.



**Рис. 4.** Зависимости от времени (и соответственно от влажности) структурных факторов мембраны ДПФХ в процессе ее гидратации (с 0 до  $\sim 460$  min) и последующей дегидратации (с  $\sim 460$  по  $\sim 900$  min).

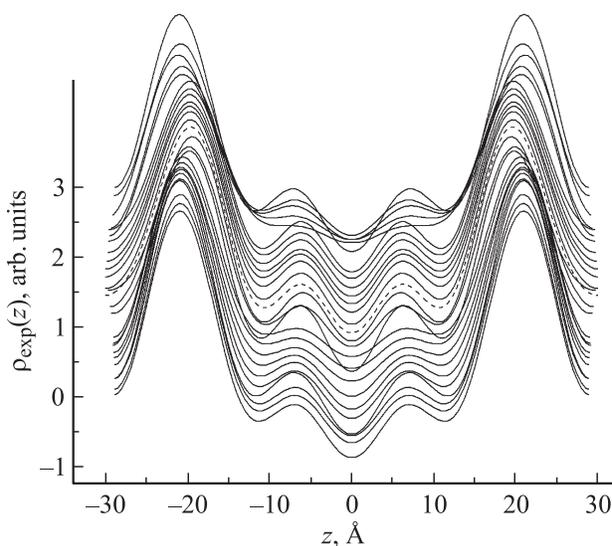
торам может быть построена проекция рассеивающей плотности на соответствующее направление в прямом пространстве. В случае ламеллярной дифракции, т.е. когда измеряются только  $F_{00h}$ -структурные факторы, это соответствует определению проекции плотности длины рассеяния нейтронов на направление, перпендикулярное плоскости мембраны (обычно называемой Фурье-профилем)

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

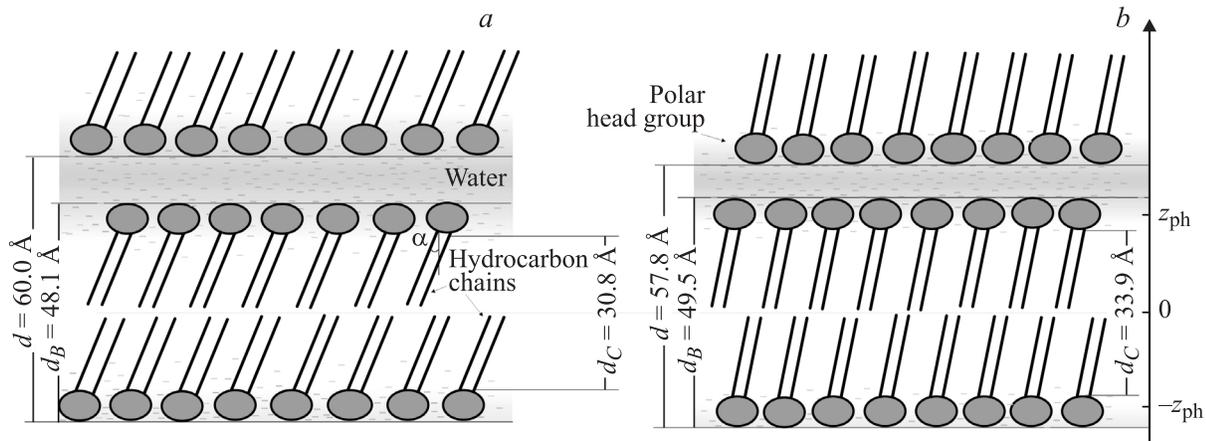
где  $h$  — порядковый номер дифракционного пика (индекс Миллера),  $d_0$  — период повторяемости мембраны. Значение модуля структурного фактора определяется из интегральной интенсивности  $I_h$  соответствующего дифракционного пика с учетом фактора Лоренца, который при использовании метода времени пролета  $\sim \lambda^4$ , а именно  $|F_h| = h^2 \sqrt{I_h}$ . Константы  $a$  и  $b$  в уравнении (2) определялись из нормировки  $\rho_{\text{exp}}(z)$  с точностью до постоянного множителя с помощью значения плотности длины рассеяния нейтронов для  $\text{CH}_3$ -групп углеводородных хвостов ( $-0.0085 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^{-2}$  [3]) и 8% концентрации тяжелой воды в легкой воде. Плотность длины рассеяния нейтронов для молекулярной группы рассчитывается по формуле  $\text{SLD} = \sum_{i=1}^n b_i/V_m$ , где  $b_i$  — когерентная длина рассеяния нейтронов  $i$ -го атома в молекулярной группе,  $n$  — число атомов в молекулярной группе,  $V_m$  — объем молекулярной группы.

На рис. 4 показаны зависимости от времени величин  $|F_h|$ , определенные из дифракционных спектров, представленных на рис. 3, по которым далее рассчи-

тывались профили рассеивающей плотности липидной мембраной в каждом измеренном состоянии. Знаки структурных факторов, необходимые для вычислений по формуле (2), были взяты из работы [5]:  $-$ ,  $-$ ,  $+$ ,  $-$ ,  $-$ . Рассчитанные таким образом Фурье-профили мембраны ДПФХ для процессов гидратации и последующей дегидратации показаны на рис. 5. Видимые изменения профилей в ходе кинетических процессов отражают изменения во внутренней структуре мембраны. Количественная оценка этих изменений может быть выполнена с помощью анализа профилей на основе модельных функций. Конечное число измеренных дифракционных пиков приводит к размытию рассеивающей плотности при ее восстановлении методом Фурье-синтеза. Для мембраны с периодом повторяемости  $60 \text{ \AA}$  и пяти (четырёх) измеренных дифракционных пиков уширение резких изменений плотности (обычно называемое разрешением Фурье-синтеза) составляет  $\sim 7 \text{ \AA}$  ( $\sim 9 \text{ \AA}$ ). В этом случае в качестве модельных функций можно использовать функции Гаусса, описывающие молекулярные группы, расстояние между которыми соответствует разрешению [10]. Это условие будет удовлетворено, если такими молекулярными группами выбрать группу полярных голов,  $\text{CH}_2$ -углеводородные цепи и  $\text{CH}_3$ -группу углеводородных цепочек. Как было показано в работе [11], такое описание позволяет получить хорошую точность в определении расстояний между выделенными молекулярными группами. Результирующая модельная функция имеет вид  $\rho_{\text{fit}}(z) = \rho_{\text{ph}}^{\text{sym}}(z) + \rho_{\text{CH}_2}^{\text{sym}}(z) + \rho_{\text{CH}_3}^{\text{sym}}(z)$ , где функции  $\rho^{\text{sym}}(z)$  описывают симметричные относительно  $z = 0$  группы полярных голов и углеводородных



**Рис. 5.** Изменение рассеивающей плотности  $\rho_{\text{exp}}(z)$  мембраны ДПФХ в процессе ее гидратации и последующей дегидратации. Верхний профиль соответствует структуре при начальных условиях (RH = 46%), средний — мембране в равновесном состоянии при RH = 98% (штриховая линия), нижний — равновесному состоянию мембраны при RH = 58%.



**Рис. 6.** Схематическое изображение внутренней структуры мембраны ДПФХ в равновесных состояниях при RH = 98 (a) и 58% (b).

цепочек, а именно

$$\rho^{\text{sym}}(z) = \frac{A}{\sqrt{2\pi\sigma}} \left( \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{z - z_0}{\sigma} \right)^2 \right] + \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{z + z_0}{\sigma} \right)^2 \right] \right). \quad (3)$$

Расчет параметров функции (3) осуществлялся методом наименьших квадратов с помощью пакета PeakFit (System Software Inc.).

Основными параметрами липидной мембраны, характеризующими ее внутреннюю структуру, являются толщина бислоя  $d_B$ , размер области углеводородных хвостов липидов  $d_C$  и ширина водной прослойки между полярными головами пространства  $d_w$ . Толщину липидного бислоя можно определить как среднее расстояние от одного водного слоя до другого, т.е. от одной границы полярных голов липидных молекул с водой до водной границы полярных голов липидных молекул противоположного слоя (рис. 6). Эту величину можно получить из Фурье-профиля мембраны, два симметричных максимума которого соответствуют области полярных голов. Для расчета толщины бислоя, а также величины углеводородной области используются параметры группы полярных голов — ее положение и ширина, которые определяются из найденных положения  $z_{ph}$  и полной ширины на половине высоты  $F_{ph}$  функции Гаусса,

соответствующей этой молекулярной группе

$$d_B = 2(z_{ph} + F_{ph}/2), \quad d_C = 2(z_{ph} - F_{ph}/2), \quad (4)$$

где  $F_{ph} = 2\sigma\sqrt{2\ln 2}$ .

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

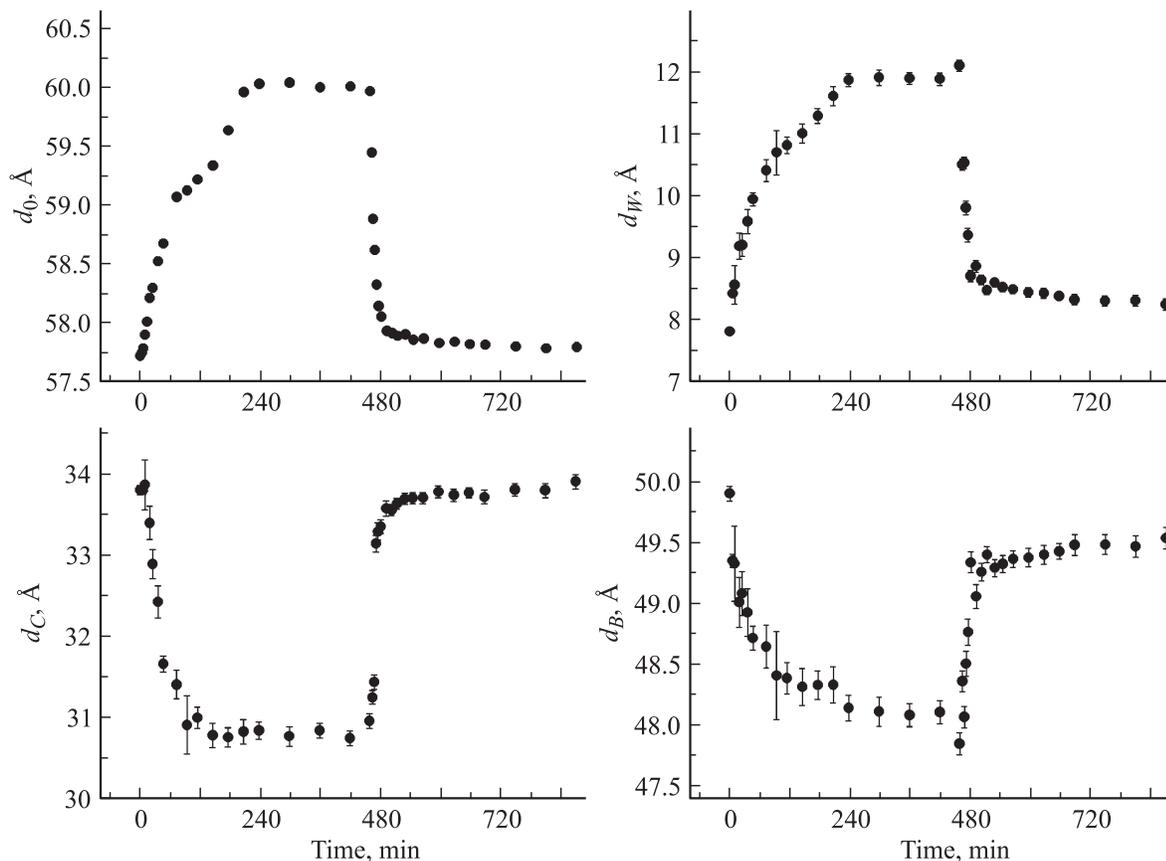
Эти параметры приведены в табл. 1, а схематическая структура мембраны ДПФХ в равновесных состояниях, т.е. при 98 и 58% относительной влажности, показана на рис. 6. Видно, что при гидратации период повторяемости мембраны ДПФХ увеличивается на  $2.2 \text{ \AA}$ , что связано с увеличением толщины слоя воды на  $3.6 \text{ \AA}$ , тогда как толщина липидного бислоя уменьшается на  $1.4 \text{ \AA}$ . Последняя цифра определяется, с одной стороны, увеличением области полярных голов (за счет проникновения воды) и, с другой стороны, уменьшением  $d_C$  из-за увеличения наклона углеводородных хвостов.

Анализируя последовательность рассчитанных профилей, можно определить эволюцию во времени основных параметров мембраны в кинетическом процессе дополнительно к описанию ее внутренней структуры в равновесных состояниях. На рис. 7 представлены временные зависимости периода повторяемости мембраны, толщины бислоя и слоя воды в ходе процессов гидратации (от 0 до 457 min) и дегидратации (от 457 min). Изменение периода повторяемости мембраны в начале

**Таблица 1.** Структурные параметры мембраны ДПФХ при  $20^\circ\text{C}$  и разных значениях относительной влажности, вычисленные по Фурье-профилям мембраны

RH, %	$z_{ph}, \text{ \AA}$	$d_0, \text{ \AA}$	$d_B, \text{ \AA}$	$d_C, \text{ \AA}$	$d_w, \text{ \AA}$
98	$19.71 \pm 0.03$	$60.0 \pm 0.1$	$48.11 \pm 0.09$	$30.76 \pm 0.09$	$11.9 \pm 0.1$
58	$20.86 \pm 0.02$	$57.8 \pm 0.1$	$49.54 \pm 0.09$	$33.92 \pm 0.09$	$8.3 \pm 0.1$

Примечание. Обозначения приведены на рис. 6. Ошибки структурных параметров мембраны вычислялись через рассчитанные методом наименьших квадратов абсолютные погрешности параметров функции (3):  $\Delta d_B = \Delta d_C = \sqrt{\Delta(z_{ph})^2 + (\Delta F_{ph})^2}$ ,  $\Delta d_w = \sqrt{(\Delta d_0)^2 + (\Delta d_B)^2}$ .



**Рис. 7.** Изменения периода повторяемости  $d_0$  мембраны ДПФХ, слоя воды  $d_w$ , толщины области углеводородных хвостов липидов  $d_c$  и толщины липидного бислоя  $d_b$  во времени в процессе гидратации и последующей дегидратации мембраны.

процесса гидратации (от 0 до 72 min) описывается экспоненциальным законом с характерным временем  $\tau = 81 \pm 1$  min

$$d_0(t) = d_0 - \Delta d \exp(-t/\tau). \quad (5)$$

Начальный этап дегидратации мембраны происходит намного быстрее, а изменение периода повторяемости мембраны во времени хорошо описывается двумя экспоненциальными зависимостями

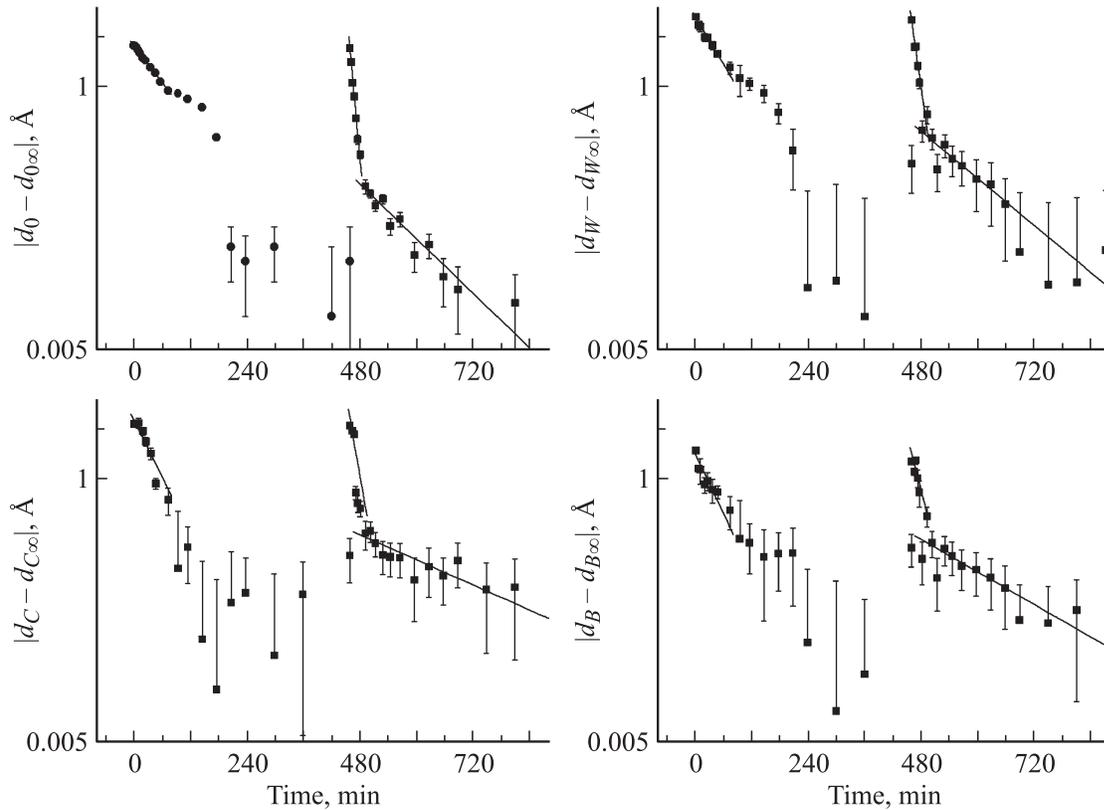
$$d_0(t) = d_\infty - \Delta d_1 \exp(-t/\tau_1) - \Delta d_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (6)$$

с постоянными времени  $\tau_1$  и  $\tau_2$ .

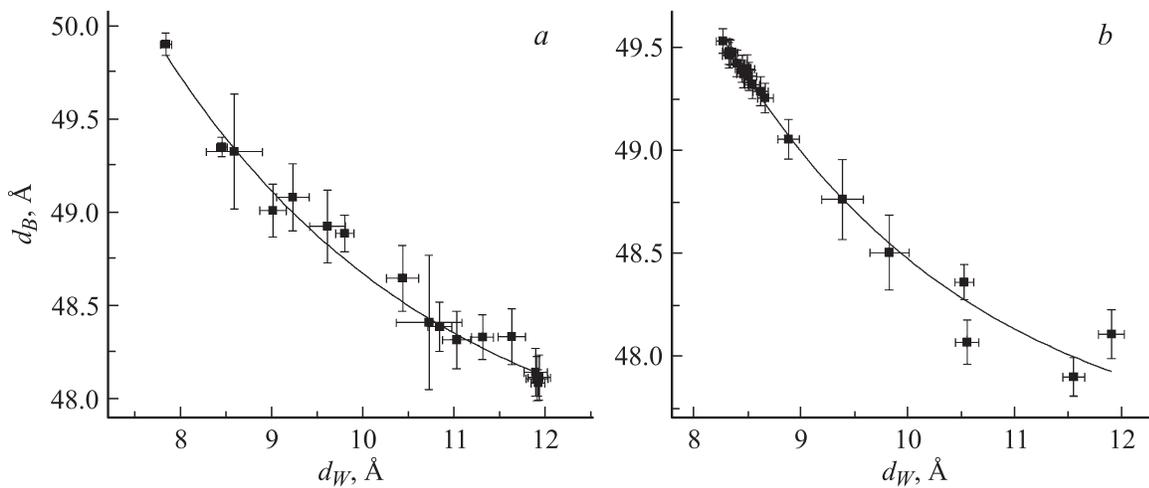
Для определения значений характерных времен изменения параметров мембраны в кинетических процессах зависимости (5) и (6) удобно представить в виде логарифмической функции  $\ln(d_0 - d_{0\infty})$ , наклон которой определяет характерное время процесса (рис. 8). Здесь  $d_{0\infty}$  — равновесное значение параметра мембраны после завершения кинетического процесса. Из рис. 8 видно, что изменение толщины бислоя  $d_b$ , ширины углеводородной области  $d_c$  и слоя воды  $d_w$  при гидратации в течение первых 72 min, также можно описать уравнением (5), тогда как при дегидратации изменение этих параметров состоит из быстрой начальной и последующей очень медленной стадии с характерными временами  $\tau_1$  и  $\tau_2$  (табл. 2).

**Таблица 2.** Характерные времена (в min) кинетических процессов

Параметр	Гидратация (0–72 min) [46% RH → 98% RH, 20°C] $\tau$	Дегидратация [98% RH → 58% RH, 20°C]	
		$\tau_1$	$\tau_2$
$d_0$	$81 \pm 1$	9.6	$109 \pm 18$
$d_b$	$50 \pm 6$	$27 \pm 4$	$424 \pm 234$
$d_c$	$52 \pm 4$	$18 \pm 1$	$238 \pm 113$
$d_w$	$63 \pm 4$	$15 \pm 1$	$127 \pm 57$



**Рис. 8.** Зависимости  $|d_0 - d_{0\infty}|$ ,  $|d_W - d_{W\infty}|$ ,  $|d_C - d_{C\infty}|$  и  $|d_B - d_{B\infty}|$  от времени для процесса гидратации (до 457 min) и дегидратации (от 457 min).



**Рис. 9.** Толщина липидного бислоя мембраны ДПФХ как функция слоя воды в процессе гидратации (a) и дегидратации (b).

Как видно из рис. 7, в ходе кинетических процессов уменьшение (увеличение) толщины мембраны сопровождается увеличением (сужением) слоя воды в межмембранном пространстве. Для выявления связи между этими параметрами мембраны  $d_B$  можно представить как функцию  $d_W$  (рис. 9). Зависимости  $d_B(d_W)$  для обоих процессов хорошо описываются экспоненциальной зави-

симостью

$$d_B = d_B^* + A \exp(-d_W/\tau). \quad (7)$$

Уравнение (7) имеет вид  $d_B[\text{Å}] = 47.53 + 29.32 \times \exp(-d_W/3.08)$  и  $d_B[\text{Å}] = 47.50 + 69.34 \exp(-d_W/2.35)$  соответственно для процесса гидратации и дегидратации. Асимптотичность уравнения (7) показывает, что

при гидратации толщина мембраны может уменьшаться до предельного значения  $d_B^*$ . Это значение  $d_B^* = 47.5 \pm 0.3 \text{ \AA}$  совпадает с толщиной полностью гидратированного бислоя ДПФХ в гелевой фазе  $47.8 \text{ \AA}$  [1]. Экспоненциальная зависимость между этими параметрами мембраны свидетельствует о сильном влиянии изменения толщины водного слоя на перестройку липидных молекул. При этом количество воды в межмембранном пространстве зависит от заряда и размера липидной молекулы и внешних условий. При гидратации полярные головы липидных молекул связываются с молекулами воды, площадь поперечного сечения полярной группы увеличивается. Для сохранения объема липидной молекулы поперечное сечение углеводородной цепи также увеличивается за счет ее наклона по отношению к плоскости бислоя, что в итоге приводит к уменьшению толщины бислоя. Поскольку липидные молекулы в ламеллярной структуре должны находиться друг от друга на конечном расстоянии, площадь поперечного сечения липидной молекулы может увеличиваться до конечного значения, которое наступает при полной гидратации.

Как видно из табл. 2, характерные времена изменения толщины бислоя ( $\tau_1 = 27 \text{ min}$ ) и слоя воды ( $\tau_1 = 15 \text{ min}$ ) в начале процесса дегидратации мембраны отличаются друг от друга почти вдвое, тогда как характерные времена связанных экспоненциальной зависимостью расширения области углеводородных цепочек ( $\tau_1 = 18 \text{ min}$ ) и сужения слоя воды очень близки. Это позволяет предположить, что расширение толщины липидного бислоя при дегидратации происходит не только за счет уменьшения наклона углеводородных цепочек, но и за счет более медленного процесса переноса захваченной при гидратации воды из гидрофобной области.

#### 4. Заключение

С помощью дифракции нейтронов при использовании метода времени пролета на высокопоточном импульсном источнике исследованы процессы гидратации и дегидратации ориентированной многослойной липидной мембраны, приготовленной из дипальмитоилфосфатидилхолина на кварцевой подложке. Впервые в реальном времени одновременно регистрировалось несколько (до пяти) порядков отражения от ламеллярной структуры мембраны, что позволило проследить эволюцию внутренней структуры мембраны в переходных процессах дополнительно к стандартной процедуре измерения периода повторяемости и определению основных параметров липидного бислоя в стационарных условиях.

Благодаря высокой скорости накопления дифракционной информации удалось показать, что кинетика изменения основных структурных параметров мембраны при ее гидратации или дегидратации хорошо описывается экспоненциальными зависимостями с одним или двумя характерными временами. Диапазон характерных времен довольно широк — от нескольких минут до

сотен минут. Особенно быстро ( $\tau_1 \approx 10 \text{ min}$ ) при дегидратации от начального уровня относительной влажности 98% уменьшается период повторяемости мембраны. Наоборот, заключительная стадия дегидратации идет с характерными временами на уровне сотен минут. Показано, что связь между изменением толщины бислоя и толщины воды в кинетических процессах описывается экспоненциальной зависимостью.

Как было показано в недавних экспериментах [10], гидратация многокомпонентных мембран на основе *Stratum Corneum*, моделирующих липидную матрицу верхнего слоя кожи человека, через которую происходит диффузия воды и растворенных в ней веществ, характеризуется величинами порядка 100 min. Представленные в настоящей работе результаты показывают, что дифракция нейтронов в реальном времени может быть эффективным методом изучения такого рода переходных процессов и использоваться, в частности, для анализа проникновения через кожу разнообразных лекарственных компонентов.

#### Список литературы

- [1] J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 159 (2000).
- [2] G. Zaccai, K. Blaste, B.P. Schoenborn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 376 (1975).
- [3] D.L. Worcester, N.P. Franks. *J. Mol. Biol.* **100**, 359 (1976).
- [4] B.P. Schoenborn. *Biochim. Biophys. Acta* **457**, 41 (1976).
- [5] G. Büldt, H.U. Gally, A. Seelig, J. Seelig. *Nature* **271**, 182 (1978).
- [6] А.М. Балагуров, В.И. Горделий, Л.С. Ягужинский. *Биофизика* **31**, 1004 (1986).
- [7] А.М. Балагуров, Г.М. Миронова. *Кристаллография* **36**, 314 (1991).
- [8] А.М. Балагуров, В.И. Горделий. В сб.: *Краткие сообщения ОИЯИ. Дубна* (1984). С. 23.
- [9] И.А. Василенко, Л.А. Тонконог, А.М. Балагуров, В.И. Горделий, В.Л. Боровягин. *Биол. мембраны* **5**, 428 (1988).
- [10] M.A. Kiselev, N.Y. Ryabova, A.M. Balagurov, S. Dante, T. Hauss, J. Zbytovska, S. Wartewig, R.H. Neubert. *Eur. Biophys. J.* **34**, 1030 (2005).
- [11] M.C. Wiener, S.H. White. *Biophys. J.* **59**, 162 (1991).