

УДК 577.352.2:538.91:539.171.4

## СЛИЯНИЕ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ МЕМБРАН, ИНДУЦИРУЕМОЕ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ И ДИЭТИЛСУЛЬФОКСИДОМ

© 2018 г. Ю. Е. Горшкова

Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка, Объединенный институт ядерных исследований,  
141980 Дубна, Россия

E-mail: Yulia.Gorshkova@jinr.ru

Поступила в редакцию 14.01.2018 г.

Кинетика слияния однослойных везикул, вызванная добавлением диметил-(ДМСО) и диэтилсульфоксидов (ДЭСО) с мольными долями 0.1 и 0.2, изучена в жидкокристаллической фазе с помощью малоуглового рассеяния нейтронов. Мультислойные везикулы, образованные в результате частичного слияния однослойных везикул 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДМФХ) при добавлении ДМСО ( $X_{\text{ДМСО}} = 0.1, 0.2$ ) и ДЭСО ( $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ ), стабильны в течение длительного времени. Процесс охлаждения–нагревания не влияет на стабильность образованных систем. Присутствие ДМСО и ДЭСО с мольной долей 0.2 приводит к исчезновению риппл-фазы. Добавление ДЭСО к однослойным везикулам ДМФХ в  $D_2O$  с мольной долей 0.1 не влияет на структуру однослойных везикул в течение 5–15 мин после добавления сульфоксида в жидкокристаллическую фазу. Спустя три часа формируется стабильная система, состоящая из однослойных везикул с липидным бислоем толщиной  $d_b = 27.3(2)$  Å и мультислойных везикул с периодом повторяемости  $d = 43.6(2)$  Å. При охлаждении мультислойные везикулы разрушаются в области основного фазового перехода ( $T_m' = 24.8(9)^\circ\text{C}$  для исследуемой системы), и образуются однослойные везикулы.

**Ключевые слова:** диметилсульфоксид, диэтилсульфоксид, слияние однослойных везикул, малоугловое рассеяние нейтронов.

DOI: 10.7868/S0207352818070053

### ВВЕДЕНИЕ

Биологическая мембрана – структурный элемент клетки, представляющий собой динамичную функциональную оболочку. Одна из важнейших функций биологических мембран – способность отделять клетки от внеклеточной среды. Нарушение целостности мембраны приводит к гибели клеток. Однако в краткосрочном временном масштабе локальные изменения ее целостности приводят к созданию новых структур путем слияния или деления клеток [1]. Слияние мембран играет важную роль в физиологических процессах, таких как экзоцитоз, секреция, образование вторичных лизосом [2–5]. Кроме того, направленное слияние клеток с помощью различных агентов слияния (fusion agents) *in vitro* широко используется для решения ряда проблем в области биомедицины и биотехнологии. Известно, что механизм слияния мембран, состоящих из заряженных и нейтральных липидов, вызванный двух- и трехвалентными катионами ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  и другими), малыми органическими молекулами (н-гексил бромид, этанол), не зависит от выбора вещества, которым он вызывается [6],

и происходит в три стадии: стерический контакт, полуслияние и слияние мембран. Тем не менее, до сих пор не определены минимальные концентрации веществ, вызывающих слияние мембран, остается открытым вопрос о стабильности образованных систем при изменении внешних, в частности температурных, условий.

Диметилсульфоксид (ДМСО) – амфифильная молекула, состоящая из гидрофильной сульфоксидной группы ( $\text{S}=\text{O}$ ) и двух гидрофобных групп  $\text{CH}_3$  – один из агентов слияния мембран. Слияние мембран в присутствии ДМСО происходит в результате образования пор. Это приводит к увеличению проницаемости мембран [7] и уменьшению их жесткости [8]. Среди важных биологических и медицинских свойств ДМСО следует отметить анестетический и противовоспалительный эффекты, противовирусную и антибактериальную активность, возможность связывать радионуклиды. Эти свойства активно используются в клеточной биологии и медицине [9, 10]. В настоящее время ДМСО также широко применяется и в качестве криопротектора. Однако следует заметить, что ДМСО токсичен для живых клеток. Среди менее

токсичных растворителей в последнее время в литературе упоминается диэтилсульфоксид (ДЭСО). В [11], например, сделано заключение о меньшей токсичности ДЭСО по сравнению с ДМСО и глицерином для *E. coli*. ДЭСО представляет собой амфифильную молекулу, состоящую из гидрофильной сульфоксидной группы (S=O) и гидрофобной части, включающей две короткие углеводородные группы  $\text{CH}_2\text{—CH}_3$ . Взаимодействие ДЭСО—вода гораздо сильнее, чем ДМСО—вода [12].

Взаимодействия ДЭСО и ДМСО с биологическими мембранами, вероятно, идентичны. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [13] и с помощью рентгеновской дифракции [14] было показано, что ДЭСО, как и ДМСО, увеличивает температуру основного фазового перехода фосфатидилхолиновых (ФХ) мембран, при  $X_{\text{ДЭСО}} \geq 0.2$  мол. % риппл-фаза исчезает [13, 14]. Подобные эффекты ранее были обнаружены и в присутствии ДМСО [13, 15–18]. В [13] также определено, что незначительное содержание сульфоксидов (~20 мас. %) в растворе сульфоксид/вода приводит к изменению структуры несвязанной воды и частичной дегидратации липидного бислоя ФХ-липосом. При концентрации сульфоксидов более 40 мас. % молекулы ДМСО и ДЭСО взаимодействуют непосредственно с поверхностью липидной мембраны.

Гидратационные силы, как известно, вносят значительный вклад в баланс межмембранного взаимодействия на малых расстояниях и поддерживают соседние везикулы в равновесии на расстоянии ~2 нм [19]. Уменьшение гидратационного отталкивания приводит к слиянию мембран (стадия I) [19]. Действительно, уменьшение концентрации связанной воды ослабляет отталкивание липидных бислоев и индуцирует стерический контакт мембран [20]. В [21] было продемонстрировано, что с ростом  $X_{\text{ДМСО}}$  межмембранное расстояние 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДМФХ-*d54*) значительно уменьшается, и при  $X_{\text{ДМСО}} = 0.4$  соседние мембраны находятся практически в стерическом контакте друг с другом. Дефекты или колебания в области контакта, вызванные слиянием или изменением некоторых физических параметров, таких как температура [22], кривизна мембран [23] и поверхностное натяжение [22], играют ключевую роль в процессе слияния (этапы II и III). Сравнение действий сульфоксидов в качестве агентов слияния было проведено в [24]. Определено, что присутствие сульфоксидов вызывает структурный переход однослойные везикулы (ОСВ) → мультислойные везикулы (МСВ) путем слияния соседних везикул. Этот процесс зависит от двух факторов — времени и концентрации. ОСВ стабильны длительное время при мольной доли  $X = 0.1$ , в то время как увеличение концентрации ДМСО и ДЭСО до  $X = 0.2$  приводит к образованию

мультислойной структуры в течение 0.5 ч в случае ДЭСО и в течение 1 ч в случае ДМСО. Кроме того, исследования свежеприготовленных ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в смеси сульфоксид/вода показали, что образование МСВ происходит при  $X_{\text{ДЭСО}} = 0.3$  и  $X_{\text{ДМСО}} = 0.4$ .

В настоящей работе рассматривается кинетика слияния ОСВ ДМФХ в избытке воды при добавлении ДМСО и ДЭСО с мольными долями сульфоксида в смеси сульфоксид/вода 0.1 и 0.2. Особое внимание уделено изучению стабильности образванных систем, как в жидкокристаллической фазе, так и при фазовых переходах в результате охлаждения и нагревания образцов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1,2-Димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин синтезирован фирмой Avanti (Birmingham) и использован без дальнейшей очистки. Тяжелая вода  $\text{D}_2\text{O}$  (99.8%) произведена фирмой “Изотоп” (Санкт-Петербург, Россия). ДМСО и ДЭСО (99%) получены в фирме “Реахим” (Россия).

**Приготовление образцов.** Изначально готовили МСВ ДМФХ в  $\text{D}_2\text{O}$ . Для гомогенизации образцов использовали термошейкер при  $T = 50$  °С в течение 20 мин. Затем раствор помещали в морозильную камеру при  $T = -20$  °С на 20 мин. Процедуру замораживания—оттаивания повторяли шесть раз. Большие ОСВ были приготовлены путем пропускания приготовленного раствора МСВ через поликарбонатные фильтры диаметром 100 нм с помощью экструдера (Hamilton Co., Reno, Nevada, USA) при температуре выше  $T_m$ . После 25 повторений растворы ОСВ помещали в кварцевые кюветы (Hellma, Germany) толщиной 1 мм и были оставлены на 12 ч при комнатной температуре.

Для исключения спонтанного слияния везикул был приготовлен контрольный образец ОСВ ДМФХ в  $\text{D}_2\text{O}$  по той же методике. Везикулы оставались стабильными в течение всего времени проведения эксперимента. Измерение контрольного образца после завершения эксперимента подтвердило, что слипание везикул не происходило.

**Методика эксперимента.** Кинетику слияния ОСВ ДМФХ в  $\text{D}_2\text{O}$  при добавлении сульфоксидов и стабильность образованных систем исследовали методом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН). Эксперимент проводился на спектрометре ЮМО, расположенном на четвертом канале импульсного реактора ИБР-2 (Дубна, Россия), с использованием двух детекторов методом времени пролета [25]. Поток тепловых нейтронов формировался системой коллиматоров так, чтобы на образец попадал пучок диаметром 8–22 мм с интенсивностью до  $4 \times 10^7$  нейтронов. Диапазон переданного импульса составлял 0.007–0.4 Å<sup>-1</sup>. Первичную обработку экспериментальных данных осуществляли

с помощью программы SAS [26], позволяющей нормировать полученный спектр на независимый ванадиевый рассеиватель, вычитать данные фонового образца [27].

Образцы в кварцевых кюветах помещали в термостатический бокс. Контроль температуры на образце осуществлялся с помощью термодпары, соединенной с жидкостным термостатом (Lauda, Germany). Точность определения температуры соответствовала погрешности прибора  $\pm 0.03$  °С. Время измерения ОСВ составляло 30 мин. Спектры МУРН снимали через 5, 45, 125 и 165 мин после добавления сульфоксидов. Для исследования кинетики слияния ОСВ ДМФХ измерения проводили для трех образцов с одинаковыми концентрациями сульфоксидов в течение 10 мин при температуре 55 °С. Стабильность образованных систем изучали в температурном диапазоне 55–10–55 °С. Температуру стабилизировали в течение 20 мин перед каждым измерением.

**Анализ данных.** В общем случае рассеяние на монодисперсных centrosymmetric частицах имеет вид:

$$I(q) = I_0 P(q) S(q) + bkg, \quad (1)$$

где  $q = 4\pi \sin\theta / \lambda$  – вектор рассеяния ( $2\theta$  – угол рассеяния и  $\lambda$  – длина волны нейтронов),  $I_0 = nV^2(\Delta\rho)^2$  – интенсивность рассеяния в нулевой угол,  $n$  – объемная концентрация частиц с объемом  $V$ , контраст  $\Delta\rho$  определяется разностью между плотностями длин рассеяния мембран  $\bar{\rho}_m$  и растворителя  $\rho_s$ ;  $P(q) \equiv F^2(q)$  – квадрат формфактора,  $S(q)$  – структурный фактор, описывающий взаимодействие между частицами,  $bkg$  – некогерентный фон.

Фосфолипидные ОСВ, концентрация которых не превышает 2 мас. % в  $D_2O$  или смеси сульфоксид/ $D_2O$ , представляют собой систему сильно разбавленных и слабо взаимодействующих частиц. В этом случае можно принять  $S(q) = 1$  [28, 29]. В первом приближении ОСВ представляют собой полые сферы с оболочкой, сформированной липидным бислоем, которая разделяет внутреннюю и внешнюю среды. Тогда рассеяние на ОСВ будет описываться формфактором, нормированным на объем липидного бислоя ( $V_b$ ) [30]:

$$P(q) = \frac{\phi}{V_b} \left[ \frac{3V_{in}(\rho_s - \bar{\rho}_m) J_1(qR_{in})}{qR_{in}} + \frac{3V_v(\bar{\rho}_m - \rho_s) J_1(qR_v)}{qR_v} \right]^2 + bkg, \quad (2)$$

где  $\phi$  – объемная доля липидного бислоя;  $V_{in}$  и  $R_{in}$  – объем и радиус сферы, образованной

растворителем внутри мембраны соответственно;  $V_v$  и  $R_v$  – объем и радиус ОСВ соответственно;  $J_1$  – сферическая функция Бесселя первого порядка ( $J_1 = (\sin x - x \cos x) / x^2$ ).

Закон рассеяния на одиночных везикулах в области  $q$ , удовлетворяющей условию  $1/R_v \leq q \leq 1/R_l$ , можно записать в виде приближения Кратки–Порода:

$$I(q) = I_0 q^{-2} \exp[-R_l^2 q^2]. \quad (3)$$

Значения  $I_0$  и  $R_l^2$  для  $n_i$  мембран с объемом  $V_i$  связаны с плотностями длин рассеяния нейтронов для мембран  $\rho_m(x)$  вдоль направления  $x$  (нормаль к поверхности мембраны) и для растворителя  $\rho_s$  соотношениями:

$$R_l^2 = \int (\rho_m(x) - \rho_s) x^2 dx / \int (\rho_m(x) - \rho_s) dx, \quad (4)$$

$$I_0 = \sum n_i (\bar{\rho}_m - \rho_s)^2 V_i^2. \quad (5)$$

Используя зависимость  $\ln(Iq^2)$  от  $q^2$ , из радиуса гирации  $R_l$  можно определить толщину мембран  $d_b$  с точностью 1 Å [31]:

$$d_b = \sqrt{12} R_l. \quad (6)$$

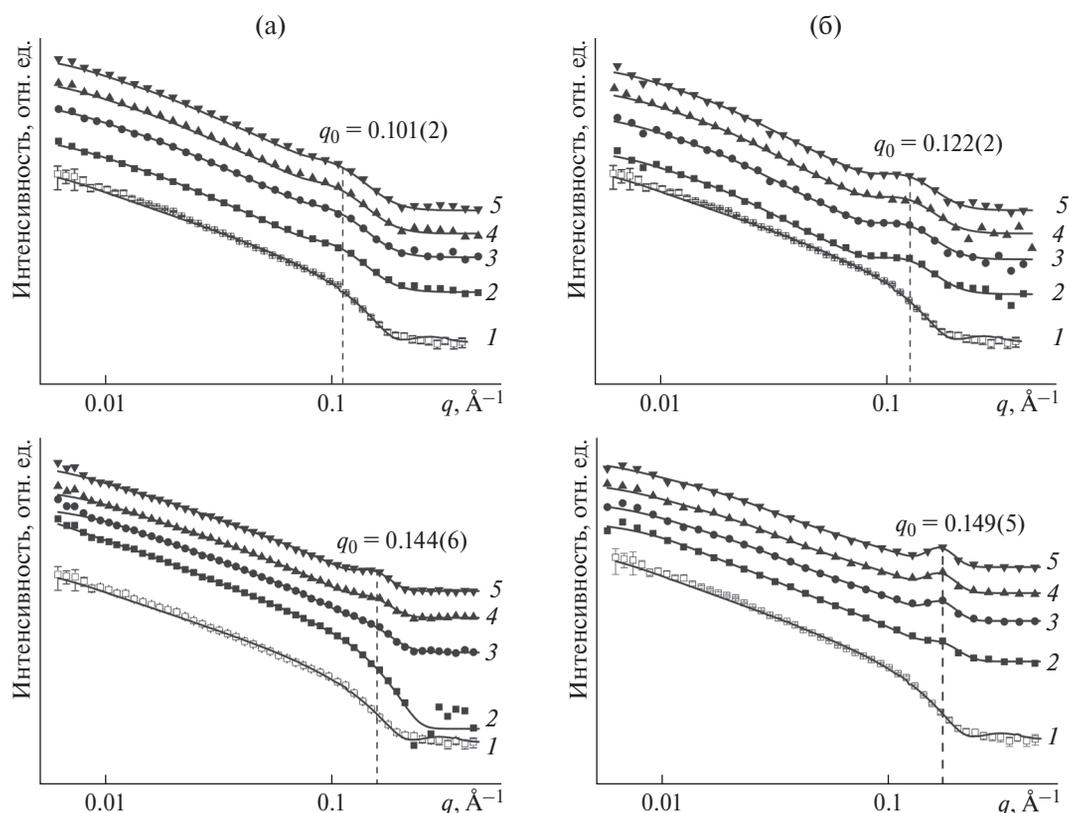
Точное значение  $d_b$  может быть определено в соответствии с [32].

В настоящей работе исследуется слияние ОСВ в  $D_2O$ , вызванное добавлением ДМСО или ДЭСО. При этом наблюдается структурный переход ОСВ → МСВ (рис. 1). Рассеяние на таких системах, состоящих из однослойных и мультислойных везикул, будет описываться функцией:

$$I(q) = I_0 q^{-2} \exp[-R_l^2 q^2] \times \left( 1 + A \exp\left[-\frac{(q - q_0)^2}{2w^2}\right] \right) + bkg. \quad (7)$$

Здесь рассеяние от МСВ задается функцией Гаусса в виде  $A \exp[-(q - q_0)^2 / 2w^2]$ , которая описывает дифракционный пик с амплитудой  $A$  и шириной  $w$  в области  $q \approx 0.1$  Å<sup>-1</sup> на кривой МУРН. По положению  $q_0$ , которому соответствует максимальная интенсивность дифракционного пика, можно определить период повторяемости мультислойной структуры как

$$d = 2\pi / q_0. \quad (8)$$



**Рис. 1.** Кривые МУРН для ОСВ ДМФХ, приготовленных в D<sub>2</sub>O (1), и через 15 (2), 55 (3), 135 (4) и 175 мин (5) после добавления сульфоксидов ДМСО (а), (б) и ДЭСО (в), (г): X<sub>ДМСО</sub> = 0.1 (а), 0.2 (б); X<sub>ДЭСО</sub> = 0.1 (в), 0.2 (г). Вертикальные пунктирные линии соответствуют положениям q<sub>0</sub>.

Зная период повторяемости мультислоев и толщину липидного бислоя, можно рассчитать межмембранное расстояние  $d_s$  из соотношения:

$$d = d_b + d_s. \quad (9)$$

Для определения температуры основного фазового перехода ( $T_m$ ) для ФХ-мембран зависимость периода повторяемости МСВ от температуры аппроксимирована функцией Больцмана в виде:

$$d = d_{\min} + (d_{\max} - d_{\min}) / (1 + \exp(T - T_m)/dT), \quad (10)$$

где  $d_{\max}$  и  $d_{\min}$  – максимальный и минимальный периоды повторяемости в заданном диапазоне температур ( $T$ ),  $T_m$  – абсцисса, которой соответствует ордината  $(d_{\max} + d_{\min})/2$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Кинетика слияния ОСВ.** Кинетику слияния ОСВ изучали на образцах ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в D<sub>2</sub>O в жидкокристаллической фазе. После стабилизации приготовленных методом экструдирования ОСВ (~12 ч при комнатной температуре) проводили

измерения при  $T = 55$  °С. Кривые МУРН (рис. 1, кривая 1) аппроксимированы функцией (2) с помощью программы SASView [33]. Плотности длин рассеяния мембран и растворителя вычислены как  $\bar{\rho}_m = 2.7473 \times 10^{-7} \text{ \AA}^{-1}$  и  $\rho_s = 6.3351 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-1}$  [34]. Введение полидисперсности ( $PD$ ) по толщине мембран ( $PD_{d_b}$ ) и радиусу внутренней сферы ( $PD_{R_{in}}$ ), которые задавали распределением Шульца [33], позволило получить наилучшую аппроксимацию с  $\chi^2 = 1.2$ . Для ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в D<sub>2</sub>O при  $T = 55$  °С определены следующие параметры:  $d_b = 36.2(1) \text{ \AA}$ ,  $R_{in} = 220(2) \text{ \AA}$ ,  $PD_{d_b} = 1.2$  и  $PD_{R_{in}} = 0.4$ .

При добавлении ДМСО или ДЭСО с заданной мольной долей (0.1 или 0.2) на кривых МУРН появляется дифракционный пик в области  $q \approx 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ , что свидетельствует о формировании мультислоистой структуры. Спектры МУРН, представленные на рис. 1а–г, снимали через 5, 45, 125 и 165 мин после добавления сульфоксидов в течение 10 мин. Для улучшения статистики эксперимент повторяли три раза, с использованием SAS [35] проводилось суммирование спектров образцов, измеренных в одинаковых условиях. Анализ экспериментальных

данных для систем, состоящих из однослойных и многослойных везикул, проведен с помощью уравнения (7).

Добавление ДМСО к ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  приводит к образованию мультислойных структур в течение первых 15 мин (минимальное время, обусловленное техническими аспектами проведения эксперимента) (рис. 1а, б). Кривые МУРН не изменяются со временем для исследуемых концентраций ДМСО. Период повторяемости составляет 62.2(2) Å для  $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$ . Это значение близко к 60.6(1) Å, которое было получено для приготовленных МСВ ДМФХ (1 мас. %) в  $D_2O$  [36]. При добавлении ДМСО с  $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$  из ОСВ ДМФХ (2 мас. %) образуется мультислойная структура с  $d = 51.5(2)$  Å. Аппроксимировав дифракционный пик, можно оценить количество слоев ( $N$ ) в сформированной мультислойной структуре как  $N = \xi/d$ , где корреляционная длина ( $\xi$ ) связана с шириной пика на полувысоте ( $w$ ) соотношением  $\xi = 2\pi/w$ . При  $w = 0.046(4)$  Å<sup>-1</sup> в случае  $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$  и  $w = 0.060(6)$  Å<sup>-1</sup> в случае  $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$  количество слоев, которым соответствует дифракционный пик, равно двум.

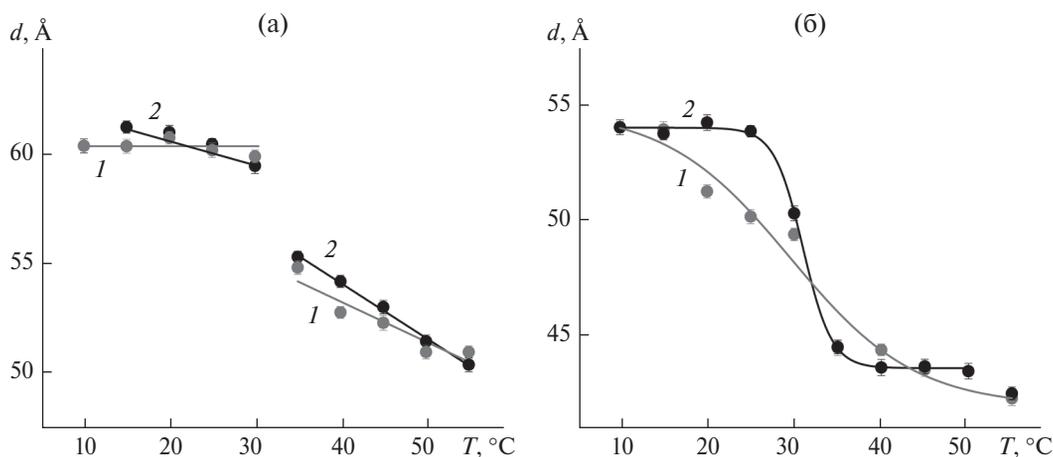
Ранее было определено, что увеличение концентрации ДМСО не изменяет толщину липидного бислоя для ОСВ ДМФХ-*d*54 (2 мас. %) в растворе ДМСО/вода в жидкокристаллической фазе при равенстве  $X_{\text{ДМСО}}$  внутри и вне мембраны [21]. При добавлении ДМСО с мольными долями 0.1 и 0.2 к ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  влияния сульфоксида на толщину липидного бислоя также не выявлено. Значение  $d_b$  равно 36.2 Å в  $L_\alpha$ -фазе во всем исследуемом временном диапазоне. Межмембранное расстояние, определяемое соотношением (9), уменьшается с ростом концентрации ДМСО:  $d_s = 26$  Å при  $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$  и  $d_s = 15.3$  Å при  $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ . Эти значения сравнимы с межмембранными расстояниями, полученными для системы ДМФХ-*d*54/ДМСО/ $D_2O$  [21]. Таким образом, приведенные выше рассуждения свидетельствуют о переходе ОСВ в МСВ путем слияния ОСВ, индуцируемого добавлением ДМСО.

Образование МСВ из ОСВ также наблюдается и при добавлении ДЭСО к ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$ . Однако в отличие от ДМСО исследуемый процесс в присутствии ДЭСО зависит от времени. Уменьшение интенсивности в области малых  $q$  и увеличение в области больших  $q$  (более 0.1 Å<sup>-1</sup>) свидетельствует об уменьшении количества ОСВ и увеличении числа МСВ в системе со временем. Толщина липидного бислоя не изменяется во временном интервале 5–45 мин. Формирование МСВ наблюдается спустя 45 мин после добавления ДЭСО с мольной долей 0.1. Период повторяемости для такой системы составляет 43.6(2) Å, и эта величина остается постоянной в течение 45–165 мин, в то время как количество самих слоев увеличивается от двух до четырех. Толщина липидного бислоя при этом уменьшается: 37.5(2), 37.1(3),

30.5(3) и 27.3(2) Å. Последнее значение фактически соответствует 27.5(1) Å, определенному для приготовленных методом экструдирования ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в смеси ДЭСО/ $D_2O$  при  $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$  [24]. Увеличение концентрации сульфоксида до  $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$  приводит к образованию МСВ с  $d = 42.1(2)$  Å уже в первые 5 мин после добавления ДЭСО. Это значение очень близко к 41.6(1) Å, что соответствует периоду повторяемости приготовленных МСВ ДМФХ (2 мас. %) в ДЭСО/ $D_2O$  при  $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$  [37]. Количество слоев в образованной мультислойной структуре растет от трех до пяти в исследуемом временном диапазоне. Спустя 165 мин никаких структурных изменений в жидкокристаллической фазе не наблюдалось для обеих систем.

**Стабильность образованных систем.** В течение 3 ч после добавления сульфоксидов к ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  были получены стабильные системы, для которых были проведены температурные исследования: охлаждение от 55 до 10 °С и нагрев до 55 °С. Мультислойная структура остается стабильной при добавлении ДМСО с мольной долей 0.1, ДМСО или ДЭСО с мольной долей 0.2. Зависимости периодов повторяемости от температуры спонтанно образованных МСВ из ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  после добавления ДМСО ( $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ ) и ДЭСО ( $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ ) представлены на рис. 2 в температурном диапазоне 10–55 °С. Из экспериментальных данных следует, что в присутствии ДМСО и ДЭСО с мольной долей 0.2 переход  $P_{\beta'} \leftrightarrow L_{\beta'}$  исчезает. Подобный эффект ранее был обнаружен методом рентгеновской дифракции [14, 18] и ДСК [13, 15] для ФХ-липосом с одинаковой концентрацией сульфоксидов вне и внутри мембран. Методом МУРН для МСВ, приготовленных и образованных из ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в растворах ДМСО/ $D_2O$  и в ДЭСО/ $D_2O$ , также было показано, что при мольной доле сульфоксидов  $X = 0.2$  в смеси сульфоксид/вода риппл-фаза исчезает [37]. Таким образом, в исследуемой системе, так же как и в изученных ранее, добавление ДМСО и ДЭСО стабилизирует гелевую фазу ФХ-мембран. Причиной подобного явления может быть уменьшение стерического отталкивания между головами липидных молекул, как предполагали в случае ФХ-мембран в присутствии ДМСО ( $X_{\text{ДМСО}} \geq 0.2$ ) [18].

Для исследования влияния сульфоксидов на период повторяемости и температуру основного фазового перехода были выбраны системы, полученные в результате добавления ДМСО и ДЭСО с мольными долями 0.2 к ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$ . Из анализа температурной зависимости периода повторяемости МСВ ДМФХ в присутствии ДМСО с мольной долей 0.2 (рис. 2а) следует, что основной фазовый переход наблюдается в диапазоне температур 30–35 °С. Очевидно, что температура основного фазового перехода находится



**Рис. 2.** Изменение периода повторяемости для спонтанно образованных МСВ из ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  после добавления ДМСО ( $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ ) (а) и ДЭСО ( $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ ) (б) при нагревании (1) и охлаждении (2).

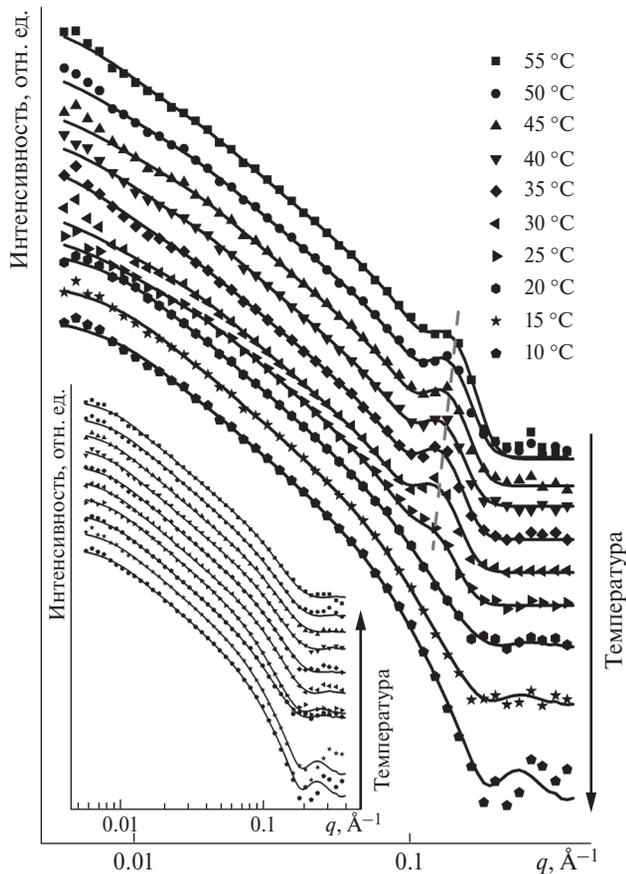
между значениями, которые были ранее определены для спонтанно образованных МСВ из ОСВ, когда концентрация сульфоксида в смеси ДМСО/ $D_2O$  вне и внутри везикул была одной и той же, ( $T_m = 35.2$  °С, нагревание) [37] и  $30.6/29.5$  °С (нагревание/охлаждение) в случае липосом ДМФХ [13]. В области основного фазового перехода период повторяемости изменяется от  $59.9(3)/59.4(4)$  Å при  $T = 30$  °С до  $54.8(4)/55.3(3)$  Å при  $T = 35$  °С в ходе охлаждения/нагревания. Период повторяемости сформированных МСВ в  $L_\alpha$ -фазе при  $T = 55$  °С составляет  $50.9(3)$  Å, в  $L_\beta$ -фазе после охлаждения ( $10$  °С)  $d = 60.4(3)$  Å, и в  $L_\alpha$ -фазе после нагревания ( $55$  °С)  $d = 50.4(3)$  Å.

ДЭСО, как и ДМСО, увеличивает температуру основного фазового перехода ФХ-мембран, как было показано методом ДСК [13] и рентгеновской дифракции [14]. Для ДМФХ (2 мас. %) в растворе ДЭСО/ $D_2O$  методом МУРН было определено, что  $T_m = 33.6$  °С для МСВ, образованных из ОСВ, и  $T_m = 28.9$  °С для приготовленных МСВ в процессе роста температуры [37]. При добавлении ДЭСО ( $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ ) к ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  формируются МСВ, для которых температура основного фазового перехода при нагревании составляет  $31.0(1)$  °С. Данное значение определено с помощью аппроксимации Больцмана (10) температурной зависимости периода повторяемости МСВ (рис. 2б). Значение  $T_m$  при охлаждении нельзя точно определить аналогичным способом. Аппроксимация Больцмана дает значение  $29.6$  °С, однако, ошибка вычисления  $\pm 2.5$  °С,  $\chi^2 = 10.9$ . Зависимость  $d(T)$  при охлаждении однозначно указывает на то, что в области температур  $55$ – $35$  °С МСВ находятся в жидкокристаллической фазе, а при  $15$ – $10$  °С – в гелевой фазе. Нельзя также исключить, что в области  $15$ – $20$  °С осуществляется переход в промежуточную фазу (между  $L_\beta$ -

и  $L_\alpha$ -фазами), поскольку период повторяемости МСВ ДМФХ возрастает на  $2.7$  Å – от  $51.2(3)$  Å при  $T = 20$  °С до  $53.9(3)$  Å при  $T = 15$  °С. При добавлении ДЭСО период повторяемости образованной мультислойной структуры ДМФХ равен  $42.1(2)$  Å в  $L_\alpha$ -фазе при  $T = 55$  °С,  $54.0(3)$  Å в  $L_\beta$ -фазе после охлаждения ( $10$  °С) и  $42.5(3)$  Å в  $L_\alpha$ -фазе после нагревания ( $55$  °С). Эти значения близки к тем, которые были получены для приготовленных МСВ ДМФХ (2 мас. %) в смеси ДЭСО/ $D_2O$  с  $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ :  $41.6(1)$  и  $55.5(1)$  Å в жидкокристаллической ( $55$  °С) и гелевой ( $10$  °С) фазах соответственно [37].

**Структурные переходы ОСВ при добавлении  $X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$ .** Исследование системы, образованной из ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  при добавлении ДЭСО с мольной долей 0.1, показало, что первоначально в жидкокристаллической фазе часть ОСВ переходит в МСВ. Структурные параметры для этой системы определены из аппроксимации кривой МУРН (рис. 3) функцией (7):  $d = 43.6(2)$  Å,  $d_b = 27.3(2)$  Å. Однако, в отличие от рассмотренных выше систем, МСВ при охлаждении–нагревании разрушаются, и образуются ОСВ. Оказалось, что переход МСВ → ОСВ реализуется в температурном диапазоне  $25$ – $20$  °С, как представлено на рис. 3, где экспериментальные данные изображены точками, а аппроксимирующие кривые – линиями. Для аппроксимации экспериментальных данных в температурном интервале  $55$ – $25$  °С использовано уравнение (7) и для всех остальных температур – уравнение (2). Полученные структурные параметры в зависимости от температуры представлены на рис. 4.

Известно, что для ОСВ ДМФХ в  $H_2O$  переход  $L_\alpha \rightarrow L_\beta$  реализуется при  $23.4$  °С, а в присутствии ДЭСО с  $X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$  температура основного фазового перехода возрастает до  $24.1$  °С [13]. Для исследуемой системы величина  $T'_m$  – температура

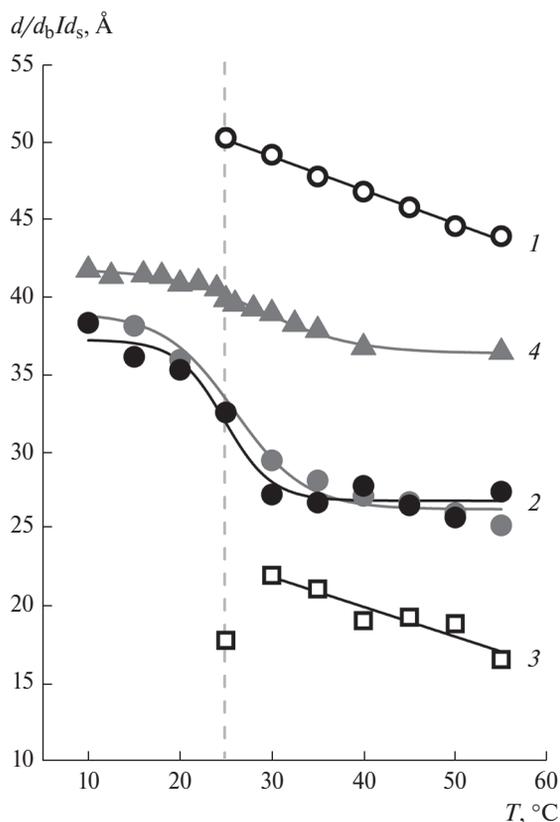


**Рис. 3.** Изменение кривых МУРН для ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  после добавления ДЭСО ( $X_{ДЭСО} = 0.1$ ) и стабилизации в течение 3 ч при  $T = 55$  °С при охлаждении от 55 до 10 °С и нагревании от 10 до 55 °С (вставка). Пунктирной линией показано изменение положения  $q_0$ .

основного фазового перехода ФХ-мембран при охлаждении – определена как 24.8(9)°С из аппроксимации функцией Больцмана (10) зависимости толщины липидного бислоя от температуры (рис. 4, кривая 2). До указанной температуры наблюдается линейный рост периода повторяемости от 43.9(1) до 50.2(2) Å, в то время как толщина липидного бислоя фактически не изменяется в жидкокристаллической фазе. Среднее значение  $d_b$  можно принять равным 26.9(5) Å, и оно возрастает до 32.5(2) Å при  $T = 25$  °С, что связано с увеличением расстояний между углеводородными группами гидрофобного хвоста липидных молекул. В гелевой фазе при температуре 10 °С  $d_b = 38.3(2)$  Å для ОСВ ДМФХ в  $D_2O$  с добавлением ДЭСО, что на 2.9 Å меньше, чем определено для ОСВ ДМФХ в  $D_2O$ , но на 0.8 Å больше, чем определено для ОСВ ДМФХ в ДЭСО/ $D_2O$  при  $X_{ДЭСО} = 0.1$  [24]. При увеличении температуры от 10 до 55 °С ОСВ ДМФХ остаются стабильными (вставка на рис. 3). Значение  $T_m$  для

них определено как 25.9(9)°С, в жидкокристаллической фазе в интервале от 30 до 55 °С наблюдается линейное уменьшение толщины липидного бислоя от 29.4(1) до 25.2(1) Å. Последнее значение существенно меньше, чем было получено для ОСВ ДМФХ в  $D_2O$  ( $d_b = 36.2(2)$  Å) или для ОСВ ДМФХ в ДЭСО/ $D_2O$  ( $d_b = 31.4(3)$  Å при  $X_{ДЭСО} = 0.1$ ) [24].

Используя зависимости  $d$  и  $d_b$  от  $T$  (рис. 4, кривые 1 и 2), из соотношения (9) можно определить, как изменяется межмембранное расстояние (рис. 4, кривая 1) в жидкокристаллической фазе. Вычисления показывают, что расстояние между соседними слоями с уменьшением температуры от 55 до 30 °С возрастает линейно от 16.5(2) до 22.0(1) Å и уменьшается до 17.8(2) Å при  $T = 25$  °С. Толщина липидного бислоя при этой температуре увеличивается до 32.5(2) Å. В области основного



**Рис. 4.** Температурная зависимость структурных параметров системы, полученной для ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  после добавления ДЭСО ( $X_{ДЭСО} = 0.1$ ): периода повторяемости МСВ  $d$  (1); толщины липидного бислоя  $d_b$  (2); межмембранного расстояния  $d_s$  (3); толщины липидного бислоя ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  (4). Черные символы – нагревание, серые символы – охлаждение. Линии – аппроксимация функцией (10) параметра  $d_b$  и прямой параметров  $d$  и  $d_s$ . Вертикальная пунктирная линия обозначает температуру основного фазового перехода для ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в  $D_2O$  при добавлении ДЭСО ( $X_{ДЭСО} = 0.1$ ).

фазового перехода, при переходе из “наклонной” жидкокристаллической в “наклонную” гелевую фазу, везикулы деформируются за счет неоднородной кривизны мембраны, возникающей вследствие формирования топологических дефектов в направлении наклона, как было показано, например, в случае гигантских однослойных везикул ДМФХ [38]. Уменьшение гидратационного отталкивания в области  $T'_m$  приводит к сближению соседних бислоев, и в результате наблюдается слияние мембран, которое сопровождается разрушением мультислойной структуры. Поскольку молекулы ХФ-мембран содержат как гидрофильную полярную голову, так и гидрофобную часть – углеводородные хвосты, система стремится замкнуться. В итоге формируются ОСВ, которые стабильны и в гелевой фазе, и при переходе  $L_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ , и в жидкокристаллической фазе. Толщины липидного бислоя при охлаждении и нагревании в жидкокристаллической фазе в диапазоне температур 40–50 °С фактически совпадают (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе нагревания–охлаждения формируется стабильная система, которая состоит только из ОСВ с липидным бислоем толщиной 25.2(2) Å. Это значение несколько меньше, чем 27.3(2) Å, которое было получено для системы, сформированной из ОСВ ДМФХ в D<sub>2</sub>O в течение 3 ч после добавления ДЭСО с мольной долей  $X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$  при той же температуре. Принимая во внимание факты, что ДМФХ в D<sub>2</sub>O при  $T = 55$  °С имеет  $d_b = 36.2(1)$  Å, присутствие ДЭСО уменьшает толщину липидного бислоя ФХ-мембран [24],  $d_b = 27.5(1)$  Å для приготовленных методом экструдирования ОСВ ДМФХ (2 мас. %) в смеси ДЭСО/D<sub>2</sub>O при  $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$  [24], можно заключить, что ДЭСО способен проникать внутрь везикул. Механизм этого процесса, очевидно, связан с формированием пор во время слияния мембран. Кроме того, можно предположить, что концентрация ДЭСО вблизи липидного бислоя ОСВ ДМФХ в результате добавления ДЭСО ( $X_{\text{ДЭСО}} = 0.1$ ) в случае стабилизированной в течение 3 ч системы, по всей видимости, больше, чем в растворителе ДЭСО/D<sub>2</sub>O в случае исследуемой системы.

Подобный эффект восстановления однослойной структуры не был обнаружен для мембран ДМФХ при добавлении ДЭСО с мольной долей 0.2. В случае добавления ДМСО также формируются стабильные системы, состоящие из ОСВ и МСВ. Мультислойные структуры, полученные в результате слияния ОСВ, имеют межмембранные расстояния  $d_s = 27$  Å при  $X_{\text{ДМСО}} = 0.1$  и  $d_s = 16.3$  Å при  $X_{\text{ДМСО}} = 0.2$ . Сформированные системы стабильны во всем диапазоне исследованных температур, как при переходе  $L_{\alpha} \rightarrow L_{\beta'}$ , так и при переходе  $L_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что в жидкокристаллической фазе добавление сульфоксидов с мольными долями 0.1 и 0.2 к ОСВ ДМФХ в D<sub>2</sub>O приводит к образованию мультислойных структур в результате частичного слияния ОСВ. Системы, состоящие из ОСВ и МСВ, при добавлении ДМСО ( $X_{\text{ДМСО}} = 0.1, 0.2$ ) и ДЭСО ( $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ ) стабильны в течение длительного времени. Процесс охлаждения–нагревания не влияет на стабильность образованных систем.

Сравнение структурных параметров приготовленных МСВ и ОСВ ДМФХ в растворе сульфоксид ( $X = 0.2$ )/D<sub>2</sub>O и системы, образованной в результате слияния ОСВ ДМФХ в D<sub>2</sub>O при добавлении сульфоксидов ( $X = 0.2$ ), позволяет сделать вывод о проникновении молекул ДМСО и ДЭСО внутрь везикул через поры, которые образуются в результате слияния ОСВ. Так, например, в результате добавления ДЭСО ( $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$ ) к ОСВ ДМФХ в D<sub>2</sub>O образуется система, состоящая из ОСВ с  $d_b = 27.3(2)$  Å и МСВ с  $d = 42.1(2)$  Å в жидкокристаллической фазе ( $T = 55$  °С). Эти параметры очень близки к значениям, которые были получены для МСВ и ОСВ ДМФХ, приготовленных в растворе ДЭСО/D<sub>2</sub>O с  $X_{\text{ДЭСО}} = 0.2$  при  $T = 55$  °С:  $d = 41.6(1)$  Å и  $d_b = 27.5(1)$  Å. Температурные исследования мембран ДМФХ в диапазоне 10–55 °С показали, что в результате добавления ДМСО и ДЭСО с мольной долей 0.2 к ОСВ ДМФХ в D<sub>2</sub>O риппл-фаза исчезает. Это означает, что в исследуемой системе, так же как и в МСВ ДМФХ (2 мас. %) в растворе сульфоксид/вода при  $X = 0.2$ , добавление ДМСО и ДЭСО стабилизирует гелевую фазу ФХ-мембран.

Результаты, полученные для ОСВ ДМФХ в D<sub>2</sub>O при добавлении 0.1 мольной доли ДЭСО, несколько иные. С одной стороны, ДЭСО не приводит к изменению структуры ОСВ в жидкокристаллической фазе в течение 5–15 мин после добавления сульфоксида. В этом случае можно говорить об изменении структуры только несвязанной воды и формировании сети ДМСО-вода вокруг ОСВ. С другой стороны, увеличение времени проведения эксперимента позволило проследить кинетику слияния ОСВ ДМФХ в жидкокристаллической фазе. После 3 ч формируются стабильные системы, состоящие из однослойных и многослойных везикул. Однако, в отличие от рассмотренных выше систем, при охлаждении МСВ разрушаются и образуются ОСВ. Переход МСВ → ОСВ реализуется в области основного фазового перехода при  $T'_m = 24.8(9)$  °С; при нагревании ОСВ не слипаются. В конечном итоге в жидкокристаллической фазе формируется система, состоящая преимущественно из однослойных везикул с  $d_b = 25.2(2)$  Å.

Полученные результаты представляют интерес для использования ДЭСО, наряду с ДМСО,

в качестве криопротектора нативных мембран и клеток, с одной стороны. С другой стороны, рассмотренные апротонные растворители могут быть применены в качестве веществ, индуцирующих слияние клеток и в присутствии которых возможен перенос ионов и больших незаряженных молекул из внешней среды в везикулярное пространство.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках научной программы ОИЯИ—Румыния 2017—2018.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chismadzhev Yu.A. // *Soros Educ. J.* 2001. V. 7. P. 4.
2. Lucy J.A. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 814. DOI: 10.1038/227815a0
3. Meldolesi J., Borgese N., Camilli P.D., Ceccarelli B. // *Cell Surf. Rev.* 1978. V. 5. P. 510.
4. Bischoff R. // *Cell Surf. Rev.* 1978. V. 5. P. 127.
5. Ahkong Q.F., Fisher D., Tampion W., Lucy J.A. // *Nature.* 1975. V. 253. P. 194. DOI: 10.1038/253194a0S
6. Mondal R.S., Sarkar M. // *J. Lipids.* 2011. V. 2011. P. 528784. DOI: 10.1155/2011/528784
7. Notman R., Noro M., O'Malley B., Anwar J.J. // *Amer. Chem. Soc.* 2006. V. 128. № 43. P. 13982. DOI: 10.1021/ja063363t
8. Gurtovenko A.A., Anwar J. // *J. Phys. Chem. B.* 2007. V. 111 (35). P. 10453. DOI: 10.1021/jp073113e
9. Lovelock J.E., Bishop M.W.H. // *Nature.* 1959. V. 183. P. 1394. DOI: 10.1038/1831394a0
10. Ali J., Shelton J.N. // *J. Reprod. Fertil.* 1993. V. 99. № 2. P. 471. DOI: 10.1530/jrf.0.0990471
11. Markarian S.A., Bonora S., Bagramyan K.A., Arakelyan V.B. // *Cryobiol.* 2004. V. 49. № 1. P. 1. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2004.04.001
12. Markarian S.A., Zatikyan A.L., Bonora S., Fagnano C. // *J. Mol. Struct.* 2003. V. 655. P. 285. DOI: 10.1016/S0022-2860(03)00313-2
13. Bonora S., Markarian S.A., Trincherio A., Grigorian K.R. // *Thermochim. Acta.* 2005. V. 433. P. 19. DOI: 10.1016/j.tca.2005.02.011
14. Gorshkova Yu.E., Ivankov O.I., Kuklin A.I., Gordeliy V.I. // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2012. V. 351. P. 012006. DOI: 10.1088/1742-6596/351/1/012006
15. Tristram-Nagle S., Moore T., Petrache H., Nagle J.F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1396(1). P. 19. DOI: 10.1016/S0005-2736(97)00197-1
16. Gordeliy V.I., Kiselev M.A., Lesieur P., Pole A.V., Teixeira J. // *Biophys. J.* 1998. V. 75. № 5. P. 2343. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77678-7
17. Curatolo W. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 817. № 1. P. 134. DOI: 10.1016/0005-2736(85)90075-6
18. Yu Z.W., Quinn P.J. // *Mol. Membrane Biol.* 1998. V. 15. P. 59. DOI: 10.3109/09687689809027519
19. Rand R.P., Parsegian A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1989. V. 988. № 3. P. 351. DOI: 10.1016/0304-4157(89)90010-5
20. Cevc G., Seddon J.M. and Marsh D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 814. № 1. P. 141. DOI: 10.1016/0005-2736(85)90429-8
21. Горшкова Ю.Е., Горделий В.И. // *Кристаллография.* 2007. Т. 52. № 3. С. 560. DOI: 10.7868/S0207352816110068
22. Cevc G., Richardsen H. // *Adv. Drug. Delivery Rev.* 1999. V. 38. № 3. P. 207. DOI: 10.1016/S0169-409X(99)00030-7
23. Nir S., Wilschut J., Bentz J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. V. 688. № 1. P. 275. DOI: 10.1016/0005-2736(82)90604-6
24. Gorshkova Yu.E. // *J. Optoelectr. Adv. Mater.* 2015. V. 17. № 9—10. P. 1532.
25. Kuklin A.I., Islamov A. Kh., Gordeliy V.I. // *Neutron News.* 2005. V. 16. № 3. P. 16. DOI: 10.1080/10448630500454361
26. Soloviev A.G., Murugova T.N., Islamov A. Kh., Kuklin A.I. // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2012. V. 351. P. 012027. DOI: 10.1088/1742-6596/351/1/012027
27. Ostanevich Yu.M. // *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* 1988. V. 15. P. 91. DOI: 10.1002/masy.19880150107
28. Knoll W., Haas J., Sturhrmann H.B., Fuldner H.H., Vogel H., Sackmann E. // *J. Appl. Crystallogr.* 1981. V. 14. P. 191. DOI: 10.1107/S0021889881009102
29. Nawroth T., Conrad H., Dose K. // *Physica B.* 1989. V. 156. P. 477. DOI: 10.1016/0921-4526(89)90708-4
30. Guinier A., Fournet G. *Small-Angle Scattering of X-Rays.* New York: John Wiley & Sons, 1955. 276 p.
31. Feigin L.A., Svergun D.I. *Structure Analysis by Small-angle X-ray and Neutron Scattering.* New York—London: Plenum Press, 1987. 335 p. DOI: 10.1002/actp.1989.010400317
32. Gordeliy V.I., Cherezov V., Teixeira J. // *Phys. Rev. E.* 2005. V. 72. P. 1. DOI: 10.1103/PhysRevE.72.061913
33. Doucet M., Cho J.H., Gervaise A. et al. *SasView. Version 4.1, Zenodo.* DOI: 10.5281/zenodo.438138
34. <https://sld-calculator.appspot.com>
35. Soloviev A.G., Solovieva T.M., Kuklin A.I. *SAS—5.1.0.* <http://www.info.jinr.ru/programs/jinrlib/sas/indexe.html>
36. Горшкова Ю.Е., Ку克林 А.И., Горделий В.И. // *Поверхность. Рентген., синхротрон. и нейтрон. исслед.* 2016. № 11. С. 34. DOI: 10.7868/S0207352816110068
37. Gorshkova Yu.E., Ivankov O.I. // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2017. V. 848. P. 012014. DOI: 10.1088/1742-6596/848/1/012014
38. Hirst L.S., Ossowski A., Fraser M., Geng J., Selinger J.V., Selinger R.L.B. // *Proceed. National. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 9. P. 3242. DOI: 10.1073/pnas.1213994110

## Phosphatidylcholine Membrane Fusion Induced by Dimethyl Sulfoxide and Diethyl Sulfoxide

Yu. E. Gorshkova

The kinetic of unilamellar vesicles fusion induced by the addition of dimethyl sulfoxide and diethyl sulfoxide with mole fractions of 0.1 and 0.2 has been studied in the liquid-crystal phase using small-angle neutron scattering. Multilamellar vesicles formed due to partial fusion of unilamellar vesicles of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC) with the addition of DMSO ( $X_{\text{DMSO}} = 0.1, 0.2$ ) and DESO ( $X_{\text{DESO}} = 0.2$ ) are stable for a long time. The cooling–heating process does not affect the stability of the formed systems. The presence of DMSO and DESO with mole fraction of 0.2 leads to the disappearance of the ripple phase. The addition of DESO to the unilamellar vesicles of DMPC in  $\text{D}_2\text{O}$  with a mole fraction of 0.1 does not affect the structure of unilamellar vesicles during 5–15 minutes after addition of the sulfoxide in the liquid-crystal phase. Three hours later, a stable system is formed consisting of unilamellar vesicles with lipid bilayer of 27.3(2) Å thickness and multilamellar vesicles with a repeat distance  $d = 43.6(2)$  Å. During cooling, multilamellar vesicles are destroyed in a region of the main phase transition ( $T'_m = 24.8(9)^\circ\text{C}$  for the investigated system) and unilamellar vesicles are formed.

**Keywords:** dimethyl sulfoxide, diethyl sulfoxide, fusion of unilamellar vesicles, small-angle neutron scattering.