



**Vilniaus universitetas
Matematikos ir informatikos
institutas
LIETUVA**



INFORMATIKA (09 P)

**DEFEKTŲ ĮTAKOS LIPIDINIŲ
MEMBRANŲ LAIDUMUI MODELIAVIMAS
BAIGTINIŲ ELEMENTŲ METODU**

Gintaras Dreižas

2017 m. spalio

Mokslinė ataskaita MII-DS-09P-17-16

VU Matematikos ir informatikos institutas, Akademijos g. 4, Vilnius LT-08663

www.mii.lt

Santrauka

Lipidinė membrana yra vienas pagrindinių barjerų, apsaugančių ląstelę nuo išorės veiksnių. Aplinkoje pasitaiko medžiagų, dažnai bakterijų išskiriamų toksinų, membranoje formuojančių poras ir taip pažeidžiančių ląstelę. Tokių medžiagų detekcija yra labai svarbi ankstyvai ligų diagnostikai. Dirbtinės lipidinės membranos, reaguojančios į laidumo pokyčius, biojutiklis būtų paprasta ir greita detekcijos sistema. Siekiant ištirti lipidinės membranos laidumo pokyčius atsiradus defektams, sukurtas radialinės simetrijos modelis, tinkamas apibūdinti homogeniško defektų pasiskirstymo atvejus. Siekiant tirti heterogeniško defektų pasiskirstymo atvejus, būdingus biologinėms sistemoms, sukurtas trimatis modelis, paremtas skaičiavimams naudojamu baigtinių elementų metodu.

Reikšminiai žodžiai: dirbtinė membrana, membranos defektai, skaitinis modeliavimas, baigtinių elementų metodas

Turiny

1	Įvadas	4
2	Membranos laidumo tyrimas.....	4
2.1	Lipidinė membrana	4
2.2	Defektų membranoje formavimasis	5
2.3	Membranos defektų biojutiklis.....	6
3	Defektų turinčios membranos modeliai	6
3.1	Radialinės simetrijos modelis.....	6
3.2	Trimatis modelis.....	7
4	Modeliavimo eiga	8
5	Modeliavimų rezultatai	8
5.1	Srovės tankio pasiskirstymas defekto aplinkoje	9
5.2	Membranos laidumo atsako kreivės.....	9
5.2.1	Membranos laidumas heterogeninio defektų pasiskirstymo atvejais.....	10
5.2.2	Skirtingo defektų pasiskirstymo lyginimas su radialinės simetrijos modeliu	10
6	Literatūra.....	11

1 Įvadas

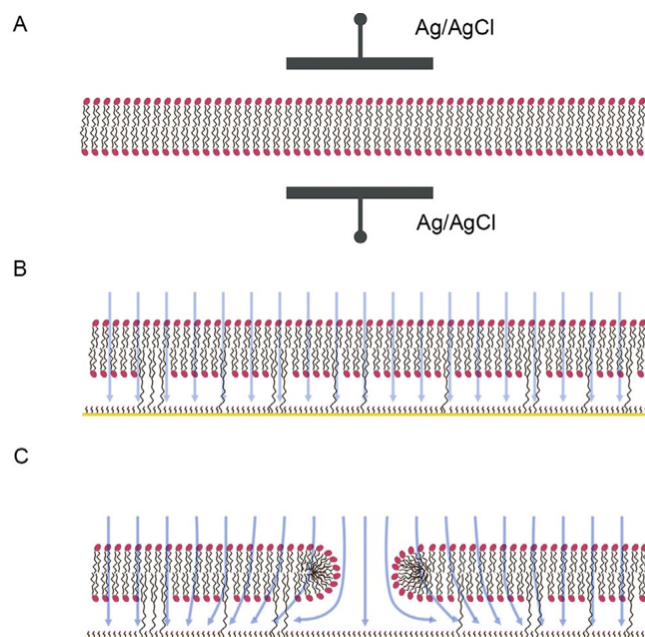
Įvairių biologinių sistemų atsako tyrimas yra svarbi fundamentinių mokslinių tyrimų bei praktinio pritaikymo dalis. Tiriant ląstelių lipidinių membranų laidumą medžiagoms ar elektros srovei galima nustatyti įvairių membranų ardančių medžiagų buvimą aplinkoje. Membranų laidumas gali būti tiriamas laboratorijose panaudojant dirbtinių membranų sistemas arba modeliuojant jas skaitiškai. Pastarasis būdas leidžia atlikti daug skaitinių eksperimentų santykinai greitai ir pigiai. Be to, parinkus tinkamas modelio sudarymo sąlygas, galima gauti rezultatus pakankamai tiksliai atkartojančius biologinę sistemą. Sugeneravus pakankamą kiekį patikimų duomenų, juos galima panaudoti neuroninio tinklo sudarymui, sugebančio iš atsako kreivių nuspėti dominančius membranos parametrus.

2 Membranos laidumo tyrimas

Įprastomis sąlygomis lipidinė membrana yra nelaidi elektros srovei. Membranos laidumo pokyčiai gali rodyti tam tikrų medžiagų buvimą aplinkoje. Šios lipidinės membranos savybės gali būti panaudojamos biologinėmis sistemomis paremtų jutiklių kūrime.

2.1 Lipidinė membrana

Lipidinės membranos yra sutinkamos daugelyje gamtinių sistemų, jos sudaro ląstelės apsauginį sluoksnį nuo išorės veiksnių. Lipidinės membranos pasižymi nelaidumu įvairioms medžiagoms, jonams, elektros srovei. Membranos laidumas gali būti matuojamas membranos abejose pusėse įtaisius po elektrodą (1 pav. A), tačiau tokia matavimo sistema nėra įgyvendinama realiomis sąlygomis. Siekiant tirti lipidines membranas ir jų savybes laboratorijos sąlygomis, naudojamos specialiais molekuliniais inkarais imobilizuotos dvisluoksnės dirbtinės membranos (angl. tethered bilayer lipid membrane, tBLM) (1 pav. B). Dvisluoksnės lipidinės membranos yra biologinę sistemą atkartojančios savaime susirenkančios struktūros, kurios leidžia tirti įvairius biofizikinius lipidinės membranos parametrus, tokius kaip lipidų fazių virsmai, peptido ar baltymo sąveika su membrana, porų membranoje formavimasis [MVI12]. Prijungus tokią membraną prie laidaus paviršiaus, pavyzdžiui, aukso elektrodo galima stebėti biologinius vyksmus pagal membranos elektrocheminių savybių pokyčius. Pavyzdžiui, membranoje atsiradus defektui, pro ją gali laisvai praeiti įvairios krūvį pernešančios medžiagos (1 pav. C).

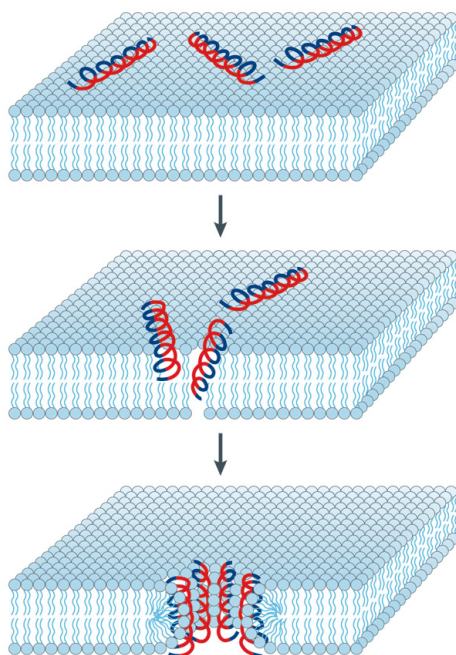


1 pav. Lipidinės membranos schematinis vaizdas. A – Biologinė lipidinė membrana su abiejose pusėse įtaisytais elektrodais. B – lipidinės membranos biologinių tyrimų modelis – inkarais imobilizuota membrana. C – membranoje atsiradęs defektas, per kurį laisvai keliauja elektros krūvininkai.

2.2 Defektų membranoje formavimasis

Defektai lipidinėje membranoje gali atsirasti savaime dėl įvairių mechaninių ar cheminių poveikių. Tačiau dėl lipidinės membranos savybės savaime susiformuoti, tokie defektai greitai išnyksta. Tiriant dirbtines lipidines membranas pastebėta, kad natūraliai atsirandantys defektai yra dažni, o jų tankis priklauso nuo membranos formavimo sąlygų [MVI12].

Defektus membranoje galima sukelti tikslingai naudojant įvairias į membraną įsiterpiančias medžiagas. Šios medžiagos patekusios ant membranos paviršiaus, jungiasi tarpusavyje ir taip suformuoja membranoje porą (2 pav.).



2 pav. Poros membranoje formavimasis ant membranos patekus poras formuojantiems peptidams. [Bro05]

2.3 Membranos defektų biojutiklis

Gamtoje gebėjimu formuoti poras ląstelių membranoje dažnai pasižymi bakterijų išskiriami toksinai. Veikiant šiems toksinams, ląstelės netenka savo pagrindinio barjero ir dėl to žūsta. Šių patogenų sukeltos ligos dažnai yra pavojingos ir jas būtina greitai diagnozuoti.

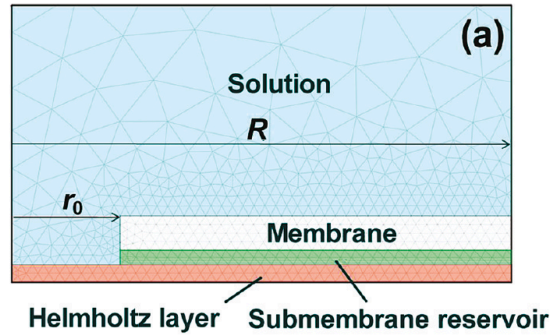
Šiuo metu poras formuojančių toksinų aptikimui yra naudojamos ląstelių arba antikūnų sistemos, kurios atsaką generuoja pakankamai lėtai. Todėl siekiama sukurti alternatyvią bioanalitinę sistemą, veikiančią dirbtinių dvisluoksnių lipidinių membranų pagrindu. Tokia sistema supaprastintų ir pagreitintų toksino aktyvumo matavimus. Šiuo atveju toksinas dirbtinėje membranoje suformuotų laidžią, vandens pripildytą porą, kuri galėtų būti lengvai pastebėta bei nuolatos sekama realiu laiku pagal membranos laidumo pokyčius elektrocheminiais metodais, tokiais kaip elektrocheminio impedanso spektroskopija. [BPZVV13]

3 Defektų turinčios membranos modeliai

Membranoje atsiradęs defektas gali būti apibūdinamas ritinio formos skykle, užpildyta elektrolito, esančio virš membranos. Po membrana susidaręs elektrolito sluoksnis pasižymi kitokiomis savybėmis ir vadinamas submembraniniu sluoksniu. Tarp skysto elektrolito ir elektrodo susidaro Helmholtz sluoksnis. [KVL+10]

3.1 Radialinės simetrijos modelis

Defektas membranoje supaprastintai gali būti aprašomas radialinės simetrijos modeliu, kuris apibūdinamas dviem spinduliais. Pirmasis jų (r_0) apibūdina plotą, nepadengtą membrana, t. y. defekto plotą. Antrasis spindulys (R) apibrėžia sritį, tenkančią vienam defektui.



3 pav. Radialinės simetrijos modelio schema. [KVL+10]

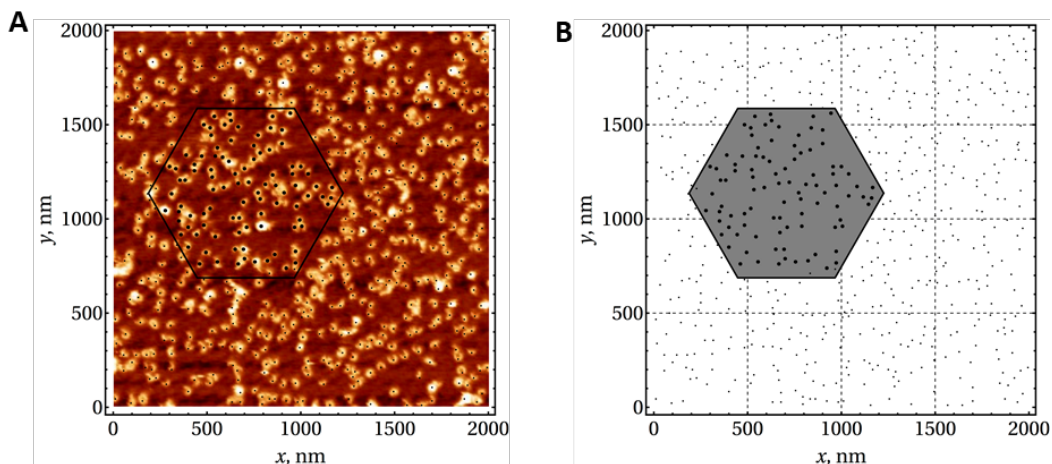
Ankstesnių modeliavimų metu parodyta, kad naudojant šį modelį, papildytą neutronų reflektometrijos duomenimis, parodančiais membranos ir submembraninio sluoksnių storius, bei elektroninės mikroskopijos duomenimis, parodančiais defekto dydį, gaunami pakankamai realistiškos atsako kreivė. [KVL+10]

Šiuo modeliu galima tirti ritinio formos struktūras, turinčias vieną defektą. Siekiant modelį pritaikyti daugiau defektų turinčioms struktūroms, ritinio formos elementai kombinuojami tarpusavyje, sudarant geometriją, pasižyminčią homogenišku defektų pasiskirstymu. Toks būdas nėra tikslus dėl nevisiško paviršiaus padengimo bei homogeninio pasiskirstymo, nebūdingo biologinėms sistemoms.

3.2 Trimatis modelis

Siekiant išspręsti dvimačio modelio problemas, padėtas naudoti trimatis modelis, pasižymintis geriau biologines sistemas reprezentuojančiomis savybėmis. Visų pirma, kuriant trimatį modelį, pasirinkta heksagoninė geometrija, siekiant padengti visą analizuojamą membranos plotą. Heksagoninė geometrija užtikrina, kad kombinuojant heksagonus tarpusavyje besiliečiančius kraštinėmis, bus užpildytas visas paviršiaus plotas.

Taip pat trimatis modelis pasižymi galimybe tirti tiek homogenišką, tiek heterogenišką defektų pasiskirstymą. Heterogeniškas defektų pasiskirstymas yra būdingas realių eksperimentų atveju. Žinant defektų pasiskirstymą realaus eksperimento atveju iš elektroninės mikroskopijos vaizdo (4 pav. A), galima parenti geometrijos šabloną skaitiniam trimačiam modeliavimui su analogišku defektų pasiskirstymu (4 pav. B).



4 pav. Defektų pasiskirstymas membranoje. A – realaus eksperimento elektroninės mikroskopijos vaizdas. B – suformuota geometrija trimačiam modeliavimui atlikti.

Vertinant membranos laidumą esant heterogeniškam defektų pasiskirstymui yra įskaičiuojamos įvairios defektų tarpusavio sąveikos, nes kintant atstumui tarp defektų gali susidaryti skirtingos krūvininkų sankaupų variacijos, kurios daro įtaką galutiniam atsakui.

4 Modeliavimo eiga

Siekiant kuo tiksliau atkartoti realią biologinę sistemą modeliavimo eiga pradedama šešiakampės trimatės struktūros sudarytos iš keturių sluoksnių: Helmholco – 0,66 nm, submembraninio elektrolito – 1,8 nm, lipidinės membranos – 3 nm ir elektrolito tirpalo – 1nm. Kiekvienam atvejui parenkamas reikiamas skaičius defektų bei atsitiktinai sugeneruojami defektų centrai, patalpinami į lipidinę membraną.

Parenkamas *Comsol Multiphysics* programos kintamų srovių (AC/DC) modulis ir kiekvienam sluoksniui nustatomos atitinkamos elektrinio laidumo reikšmės: Helmholco – 0 S/m, submembraninio elektrolito – 0,001 S/m, lipidinės membranos – 0 S/m, defekto viduje – 0,1 S/m ir elektrolito tirpalo – 1 S/m; bei dielektrinės skvarbos reikšmės: Helmholco – 7,45, submembraninio elektrolito – 0, lipidinės membranos – 2.2, defekto viduje – 0 ir elektrolito tirpalo – 0.

Kadangi modeliuojama geometrija yra riboto dydžio, geometrijos kraštuose nustatytos kraštinės sąlygos, neleidžiančios elektros srovei ištekėti iš modeliuojamo objekto. Virš modeliuojamos geometrijos tirpalo yra 1 V įtampos šaltinis, pačioje apačioje, po Helmholco sluoksniu – elektrodas.

Iš sugeneruotos geometrijos, po fizikinių parametrų nustatymo kuriamas tinklelis, kurio tankis bei elementų skaičius priklauso nuo atstumo tarp defektų bei jų skaičiaus. Defektų aplinkoje generuojamas tinklelis yra tankesnis ir išretėja į geometrijos kraštus.

Turint sugeneruotą tinklelį, konfigūruojamas sprendimo algoritmas. Sprendimo algoritmas remiasi formule:

$$\nabla \cdot ((\sigma + j\omega\varepsilon)\nabla\phi) = 0,$$

kur σ ir ε yra terpės laidumas ir dielektrinė skvarba, $j = \sqrt{-1}$, $\omega = 2\pi f$ – kampinis dažnis, f – dažnis hercais, ϕ – kompleksinė įtampa [KVL+10].

Kadangi sistema yra trimatė, o joje vykstantys veiksmai aprašomi diferencialinių lygčių sistemomis, apytiksliai skaitiniam rezultatui rasti naudojamas baigtinių elementų metodas. Šis metodas ieškomo sprendinio sritį suskaido į supaprastintas dalis – baigtinius elementus. Tuomet algebrinės lygtys, aprašančios kiekvieną baigtinį elementą sujungiamos į vieną didelę sistemą, kuri yra skaitinis sprendžiamos problemos modelis [Say08]. Skaitinio sistemos modelio sprendiniams gauti naudojamas MUMPS (*a MULTifrontal MASSively PARallel sparse direct SOLver*) tiesioginis išsibarsčiusių matricių sprendėjas, gebantis atlikti skaičiavimus ir su kompleksinių reikšmių išsibarsčiusiomis matriciomis [AFE00].

Sprendėjo darbo rezultatas – elektros potencialas U , srovės tankis J kiekviename sugeneruoto tinklelio taške.

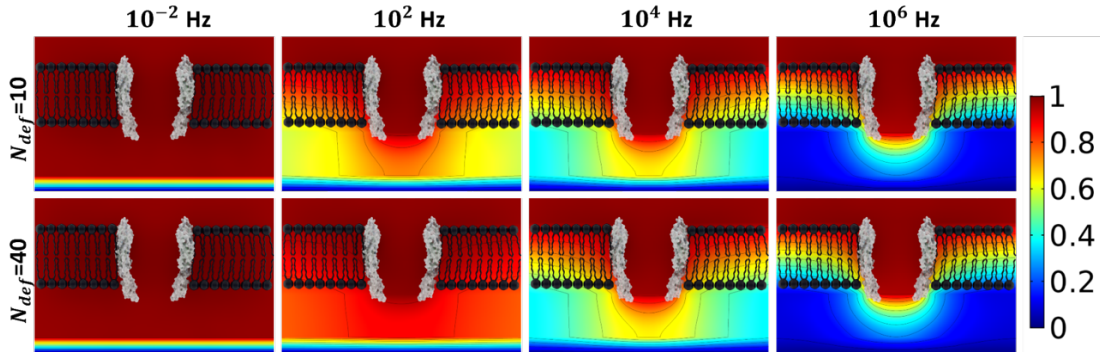
5 Modeliavimų rezultatai

Tyrimų stadijoje modeliavimo metu gauti rezultatai yra lyginami su realių eksperimentų rezultatais siekiant surasti optimaliausią, artimiausią geometrijos variantą, kuris su priimtinomis paklaidomis gali būti laikomas biologinės sistemos skaitinių modeliavimų atitikmeniu.

5.1 Srovės tankio pasiskirstymas defekto aplinkoje

Vienas iš modeliavimo metu gaunamų rezultatų yra srovės tankio pasiskirstymo defekto aplinkoje vaizdinės reprezentacijos. Srovės tankio pokyčiai gali būti apibūdinami potencialo verte ir priklauso tiek nuo defektų tankio N_{def} , tiek nuo kintamosios srovės dažnio. Daroma prielaida, kad defekto viduje srovės tankis identiškas išorinio elektrolito tankiui.

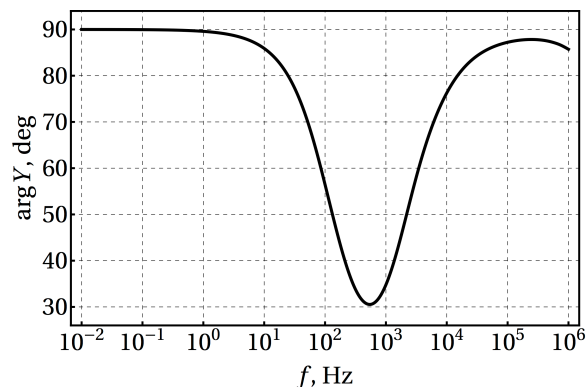
Esant mažam dažniui potencialas visoje sistemoje pasiskirstęs vienodai, tačiau didėjant dažniui pastebimi potencialo skirtumai tarp membranos ir sluoksnio esančio šalia elektrodo. Taip pat, didėjant defektų tankiui, stebimi mažesni efektai, dėl mažesnio krūvininkų kiekio, tenkančio vienam defektui (5 pav.).



5 pav. Srovės tankio pasiskirstymas defekto aplinkoje.

5.2 Membranos laidumo atsako kreivės

Membranos laidumą apibūdinančios kreivės vaizduoja admitanso (tariamojo laidumo) argumento priklausomybę nuo kintamosios srovės dažnio (6 pav.). Admitansas yra elektrinio laidumo atitikmuo esant kintamai elektros srovei. Admitansas yra atvirkščias dydis impedansui, kurio priklausomybė nuo kintamosios srovės dažnio pamatuojama impedanso spektroskopijos būdu. Dėl šios priežasties modeliavimo rezultatų kreivės gali būti lyginamos su realaus impedanso spektroskopijos eksperimento duomenimis. Lokalus kreivės minimumas yra vienas pagrindinių matuojamų sistemą apibūdinančių parametrų.

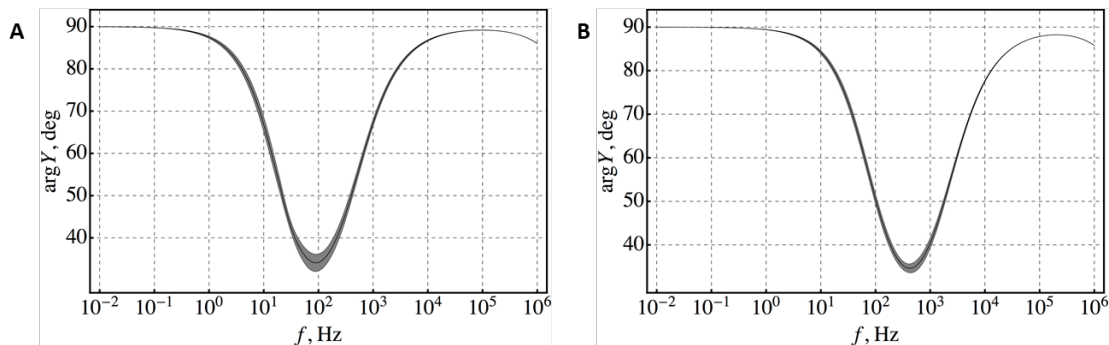


6 pav. Admitanso (tariamojo laidumo) argumento priklausomybės nuo kintamosios srovės dažnio grafikas.

5.2.1 Membranos laidumas heterogeninio defektų pasiskirstymo atvejais

Siekiant išsiaiškinti, kiek lipidinės membranos laidumą keičia skirtingas defektų išsidėstymas, buvo modeliuojami 10 nepriklausomo defektų išsidėstymo atvejų. Palyginus rezultatus tarpusavyje, paaiškėjo, kad esant atsitiktiniam defektų išsidėstymui geometrijoje, atsako kreivės gaunamos labai panašios (7 pav.).

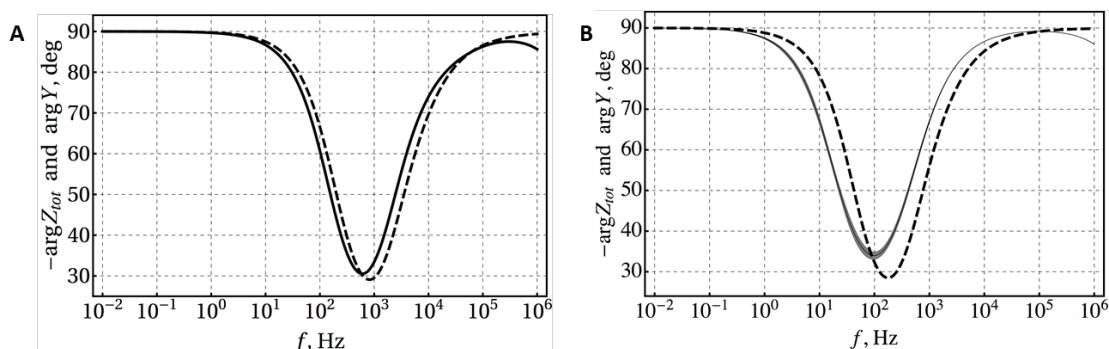
Taip pat pastebėjome, kad gaunamas didesnis atsako kreivių išsibarstymas esant mažam defektų tankiui (7 pav. A). Didėjant defektų tankiui, tirama sistema yra homogeniškesnė ir išsibarstymas mažėja (7 pav. B).



7 pav. 10 nepriklausomo defektų pasiskirstymo atvejų vidurkio atsako kreivė. A – defektų tankis lygus 10. B – defektų tankis lygus 40.

5.2.2 Skirtingo defektų pasiskirstymo lyginimas su radialinės simetrijos modeliu

Siekiant išsiaiškinti, kiek trimatis modelis yra tikslesnis vertinant homogeniško ir heterogeniško defektų pasiskirstymo atvejus, gaunami rezultatai buvo palyginti su radialinės simetrijos modelio atsako kreivėmis. Gauti rezultatai parodė, kad homogeninio defektų pasiskirstymo atveju atsaką pakankamai tiksliai atvaizduoja tiek trimatis, tiek radialinės simetrijos modeliai (7 pav. A). Tačiau heterogeninio pasiskirstymo atveju trimačio ir radialinės simetrijos modelių rezultatai ženkliai skyrėsi (7 pav. B). Tokius rezultatus galima paaiškinti tuo, kad trimatis modelis atsižvelgia į defektų tarpusavio sąveikas esant skirtingiems atstumams tarp jų, o radialinės simetrijos atveju daroma prielaida, kad atstumai tarp defektų yra vienodi.



7 pav. Trimačio modelio (vientisa linija) atsako kreivių palyginimas su radialinės simetrijos modelio (punktyrinė linija) kreivėmis. A – homogeninio pasiskirstymo atveju. B – heterogeninio pasiskirstymo atveju.

6 Literatūra

- [AFE00] Amestoy PR, Duff IS, L'Excellent J-Y. Multifrontal parallel distributed symmetric and unsymmetric solvers. *Comput Methods Appl Mech Eng.* 2000;184(2-4):501-520. doi:10.1016/S0045-7825(99)00242-X.
- [BPZVV13] Budvytyte R, Pleckaityte M, Zvirbliene A, Vanderah DJ, Valincius G (2013) Reconstitution of Cholesterol-Dependent Vaginolysin into Tethered Phospholipid Bilayers: Implications for Bioanalysis. *PLoS ONE*8(12): e82536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082536>
- [Bro05] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238-250. doi:10.1038/nrmicro1098.
- [KVL+10] Kwak KJ, Valincius G, Liao WC, et al. Formation and finite element analysis of tethered bilayer lipid structures. *Langmuir.* 2010;26(23):18199-18208. doi:10.1021/la1021802.
- [Say08] Sayas FJ. A gentle introduction to the Finite Element Method An introduction. 2008:103.
<http://www.math.udel.edu/~fjsayas/anIntro2FEM.pdf>.
- [VMI12] Valincius G, Meškauskas T, Ivanauskas F. Electrochemical impedance spectroscopy of tethered bilayer membranes. *Langmuir.* 2012;28(1):977-990. doi:10.1021/la204054g.