

УДК 004.9 51-73

**ОНЛАЙН-ИНТЕРФЕЙС ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ФОСФОЛИПИДНЫХ
ВЕЗИКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ
НЕЙТРОНОВ НА ОСНОВЕ МОДЕЛИ РАЗДЕЛЕННЫХ ФОРМФАКТОРОВ**

**Земляная Елена Валериевна¹, Киселев Михаил Алексеевич²,
Лукьянов Константин Валерьевич³, Попов Иван Романович⁴,
Турапбай Кайсар Омирсериккулы⁵**

¹Ведущий научный сотрудник;
Объединенный институт ядерных исследований;
Дубна, ул. Жолио-Кюри 6;
e-mail: elena@jinr.ru.

²Ведущий научный сотрудник;
Объединенный институт ядерных исследований;
Дубна, ул. Жолио-Кюри 6;
e-mail: kiselev@jinr.ru.

³Старший научный сотрудник;
Объединенный институт ядерных исследований;
Дубна, ул. Жолио-Кюри 6;
e-mail: luku@jinr.ru.

⁴Студент;
ГБОУ ВО МО «Университет «Дубна»,
Институт системного анализа и управления;
Дубна, ул. Университетская, 19;
popov.ivan.043@gmail.com.

⁵Студент;
Евразийский Национальный Университет им. Л.Н. Гумилева;
Астана, ул. К. Мунайтпасова, 5, Казахстан;
e-mail: keis-kz@mail.ru.

Исследование фосфолипидных везикул представляет собой одну из горячих тем современной нанофизики в связи с многочисленными приложениями этих нанообъектов в медицине, биохимии, фармакологии и косметологии. Один из эффективных и интенсивно используемых в последнее десятилетие методов изучения структуры и свойств везикул по данным малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) – метод разделенных формфакторов (РФФ), разработанный в Объединенном институте ядерных исследований (Дубна). В этой связи актуальной задачей является создание возможностей для удобной работы с РФФ широкому кругу пользователей, в том числе студентам соответствующих специальностей, а также исследователям, не владеющими навыками программирования и не имеющими в своем распоряжении соответствующего программного обеспечения. В работе представлен онлайн-интерфейс для работы с фортран-программой, реализующей подгонку структурных параметров полидисперсных везикулярных систем по экспериментальным данным МУРН рамках модели РФФ.

Работа выполнена при поддержке РНФ, грант 14-12-00516.

Ключевые слова: онлайн-интерфейс, фосфолипидные везикулы, малоугловое рассеяние, метод разделенных формфакторов.

ONLINE INTERFACE FOR INVESTIGATION OF THE STRUCTURE OF PHOSPHOLIPIDIC VESICULAR SYSTEMS BY THE SMALL ANGLE SCATTERING DATA ANALYSIS WITHIN THE FRAME OF THE SEPARATED FORM FACTORS MODEL

Zemlyanaya Elena¹, Kiselev Mikhail², Lukyanov Konstantin³,
Popov Ivan⁴, Turapbay Kaisar⁵

¹Leading Researcher;
Joint Institute for Nuclear Research;
Dubna Str. Joliot-Curie 6;
e-mail: elena@jinr.ru.

²Leading Researcher;
Joint Institute for Nuclear Research;
Dubna Str. Joliot-Curie 6;
e-mail: kiselev@jinr.ru.

³Senior Researcher;
Joint Institute for Nuclear Research;
Dubna Str. Joliot-Curie 6;
e-mail: luky@jinr.ru.

⁴Student;
Dubna State University,
Institute of system analysis and management;
141980, Dubna, Moscow reg., Universitetskaya str., 19;
e-mail: popov.ivan.043@gmail.com.

⁵Student;
L.N.Gumilyov Eurasian National University
Kazakhstan, Astana, K. Munaitpasova str 5;
e-mail: keis-kz@mail.ru..

The study of phospholipid vesicles is one of the hot topics of modern nanophysics due a wide range of applications in medicine, biochemistry, pharmacology and cosmetology. One of the most effective methods for investigation of the structure and properties of vesicles on the basis of the small angle neutron scattering data (SANS) is the method of separated form factors (RFF) developed at the Joint Institute for Nuclear Research (Dubna). In this regard, the important task is to create the tools for convenient work with the RFF method to a wide range of users, including students of relevant specialties, as well as researchers who do not have programming skills and do not have the appropriate software at their computers. In this paper, an online interface is presented for the work with the Fortran program that implements the adjustment of the structural parameters of polydispersed vesicular systems to the SANS experimental data on the basis of the SFF approach.

The work was supported by the RSF, grant 14-12-00516.

Keywords: Online interface, phospholipid vesicles, small angle scattering, separated form factors method.

Введение

Фосфолипидные везикулы (другие названия – наносферы, липосомы) используются в фармакологии и косметологии для транспорта лекарственных и\или косметически активных препаратов.

Получение информации об их структуре и свойствах в различных средах имеет важное практическое значение, и исследования везикулярных систем активно ведутся в российских и зарубежных научных центрах.

Однослойные везикулы представляют собой наноразмерные объекты, имеющие близкую к сферической форму. Оболочка везикул представляет собой бислой, состоящий из липидных молекул, имеющих гидрофильную полярную головку и длинные гидрофобные углеводородные цепочки [1]. При этом все неполярные углеводородные «хвосты» находятся в центральной части мембраны, в то время как полярные полярные головки располагаются в наружных областях мембраны, соприкасаясь с молекулами воды (раствора) как снаружи, так и внутри везикулы (см. рис. 1).

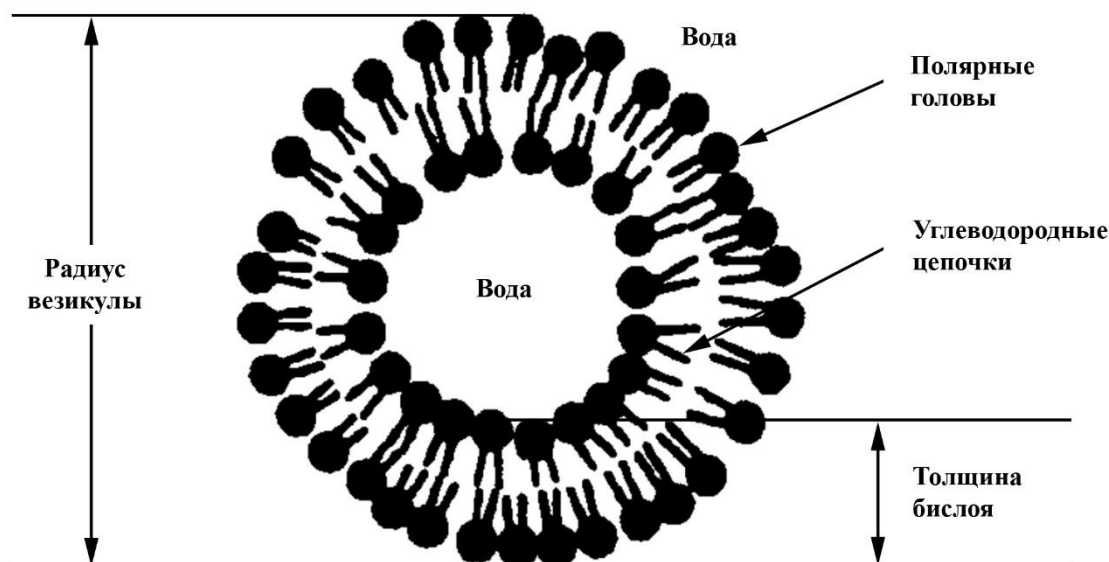


Рис. 1. Схема строения однослойной везикулы

Одно из важных приложений везикулярных систем – разработка систем транспорта лекарств на их основе [1-3]. Лекарственная субстанция, в зависимости от своего химического состава, может либо встраиваться в гидрофобную область фосфолипидного бислоя, либо адсорбироваться на поверхности бислоя, либо инкапсулироваться во внутреннюю область везикулы. Поэтому достоверная информация о размерах везикул и структуре бислоя является необходимой для их эффективного практического применения в качестве переносчика лекарств.

Метод малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) является одним из эффективных методов исследования структуры одно- и многослойных фосфолипидных везикул в избытке воды [4-5]. Для анализа данных МУРН и получения на этой основе информации о размерах и внутренней структуре везикулярных систем в избытке воды разработан метод разделенных формфакторов (РФФ) [6]. В рамках этого подхода значения параметров, «отвечающие» за структуру везикул (средний радиус везикулы, коэффициент полидисперсности, толщина бислоя и др.) подгоняются по экспериментальным данным МУРН. Этот метод успешно применялся для анализа структуры и свойств различных одно- и многокомпонентных везикул в зависимости от химического состава раствора, температуры и других факторов [7-12].

Для расширения возможностей работы с методом РФФ и с реализующей его Фортран-программой разработан удобный онлайн-интерфейс, позволяющий обрабатывать данные МУРН в режиме Интернет-доступа к соответствующему серверу с произвольного компьютера без специальных требований к операционной системе (ОС) и без необходимости установки специального программного обеспечения (ПО).

В статье приводятся основные формулы, определяющие метод РФФ, описан инструментарий, использованный для создания онлайн-интерфейса, и на конкретных примерах демонстрируется порядок работы с созданным приложением.

1. Метод разделенных формфакторов

В рамках метода РФФ макроскопическое когерентное сечение рассеяния на монодисперсной популяции однослойных везикул сферической формы радиуса R с толщиной бислоя d_b при условии $R \gg d_b$ определяется выражением [4]:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega_{\text{мон}}}(q) = nF_s(q, R)F_b(q, \rho)S(q, R), \quad (1)$$

где q – модуль вектора рассеяния, n – количество везикул в единице объема, $F_s(q, R)$ – формфактор бесконечно тонкой сферы радиуса R :

$$F_s(q, R) = \left(4\pi \frac{R^2}{qR} \sin(qR)\right)^2, \quad (2)$$

где $F_b(q, \rho)$ – формфактор симметричного липидного бислоя толщины d_b :

$$F_b(q, \rho) = \left(\int_{-\frac{d_b}{2}}^{\frac{d_b}{2}} \Delta\rho(x) \sin(qx) dx\right)^2, \quad (3)$$

где $S(q)$ – структурный фактор популяции везикул в форме Дебая:

$$S(q) = 1 - \frac{SV_v}{V} \left(\frac{\sin(2qR)}{2qR}\right). \quad (4)$$

Здесь V_v – объем везикулы, $v = 1/n$.

В выражении (2) $\Delta\rho(x)$ – разность (контраст) плотности длины рассеяния нейтрона липидным бислоем и окружающим раствором, x – расстояние от центра бислоя.

Для учета полидисперсности радиуса везикул используется несимметричное распределение Шульца:

$$G(R, \langle R \rangle) = \frac{R^m}{m!} \left(\frac{m+1}{\langle R \rangle}\right)^{m+1} \exp\left[-\frac{(m+1)R}{\langle R \rangle}\right]. \quad (5)$$

где $\langle R \rangle$ – средний радиус везикулы, m – коэффициент полидисперсности. Тогда макроскопическое сечение $d\Sigma(q)/d\Omega$ для полидисперсной популяции везикул среднего радиуса $\langle R \rangle$ имеет вид:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = \frac{\int_{R_{\min}}^{R_{\max}} \frac{d\Sigma}{d\Omega_{\text{мон}}}(q, R, \langle R \rangle) G(R, \langle R \rangle) dR}{\int_{R_{\min}}^{R_{\max}} G(R, \langle R \rangle) dR}, \quad (6)$$

где пределы интегрирования $R_{\min}=100 \text{ \AA}$ и $R_{\max}=1000 \text{ \AA}$.

С учетом некогерентного фона I_B и разрешения спектрометра реально измеряемое значение макроскопического сечения $\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q)$ может быть записано как:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = I_m(q) + \frac{1}{2} \Delta^2 \frac{d^2 I_m(q)}{dq^2} + I_B. \quad (7)$$

Здесь Δ – второй момент функции разрешения спектрометра [13], через $I_m(q)$ обозначена величина сечения, рассчитываемая по формуле (6).

Параметры m , $d_b, \langle R \rangle$, I_B , n , а также параметры функции ρ , определяющие внутреннюю структуру бислоя, подгоняются под экспериментальные данные МУРН путем минимизации невязки между экспериментальными и теоретическими значениями МУРН:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-k} \sum_{i=1}^N \left(\frac{\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q_i) - \frac{d\Sigma}{d\Omega_{\text{exp}}(q_i)}}{\delta(q_i)} \right)^2 \quad (8)$$

где $\delta(q_i)$ – ошибки экспериментальных данных; N – число экспериментальных точек; k – количество фитируемых параметров.

Для анализа спектров *МУРН* на основе модели РФФ, определяемой формулами (1-8), составлена компьютерная программа на языке Фортран, в которой для минимизации значений χ^2 используется программа *DFUMIL* из библиотеки программ *JINRLIB* (ЛИТ ОИЯИ), реализующая обобщенный метод наименьших квадратов [14].

2. Особенности реализации онлайн-интерфейса

Задача визуализации расчетных данных обычно решается с помощью прикладного программного обеспечения (ПО), работа с которым требует наличия рекомендуемой операционной системы (ОС). Однако в последнее время наблюдается тенденция использования кроссплатформенных средств для разработки подобного ПО, обеспечивающих возможность запуска расчета, получение и визуализацию результатов без привязки к конкретной ОС.

Популярным направлением разработки такого ПО стала разработка веб-приложений и веб-сервисов. Это дает возможность удаленного использования системы и означает, что пользователь не привязан к месту расположения аппаратной части, а может иметь доступ к нужному приложению из любой точки мира, где есть интернет. Важно заметить, что разработка веб-приложений в значительной степени отличается от разработки обычных клиентских приложений, что требует определенных усилий для обеспечения их корректного взаимодействия.

Реализация онлайн-интерфейса для РФФ-анализа данных *МУРН* выполнена с использованием клиент-серверной архитектуры. Клиентами выступают подключенные к сети Интернет компьютеры, на которых установлен веб-браузер. Основные функции клиента – ввод и представление данных. Вся вычислительная работа осуществляется на сервере, который принимает входные данные, в соответствии с ними осуществляет расчет, и возвращает в клиент-компьютер результат.

При разработке онлайн-интерфейса были использованы технологии, позволяющие при необходимости менять серверную платформу (*windows, unix-like*) без серьезных переработок кода:

- со стороны сервера: пакет программ *XAMPP*, включающий в себя веб-сервер *Apache*, язык программирования *PHP* и СУБД *MySQL*;
- со стороны клиента (веб-браузера): язык разметки *HTML*, язык сценариев *JavaScript*;
- клиент-серверное взаимодействие: протокол *HTTP*.

Также сюда следует отнести адаптированный код программы расчетов (в том числе и *DFUMIL*) и соответствующий исполняемый файл.

В основе алгоритма лежит возможность запуска исполняемого файла программы расчетов на сервере по запросу клиента с учетом введенных параметров. Запуск программы осуществляется в отдельной файловой ветке, связанной с текущим пользователем онлайн-интерфейса и уникальным идентификатором расчета. Формируемые по итогам расчета выходные файлы с результатами расчетов возвращаются клиенту, а также сохраняются на сервере для повторного использования.

3. Порядок работы с онлайн-интерфейсом

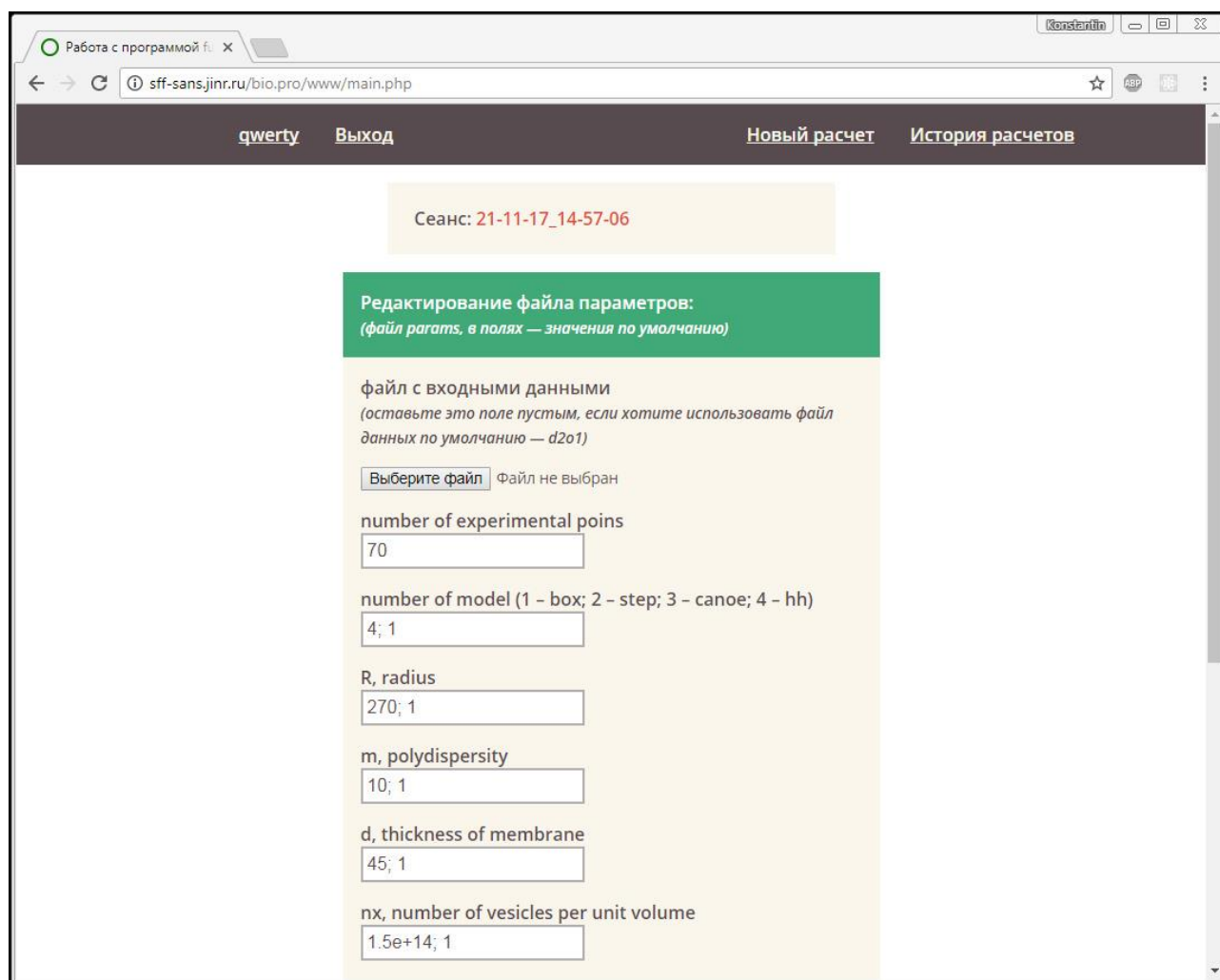
Доступ к приложению по РФФ анализу спектров *МУРН* на полидисперсных везикулярных системах осуществляется через любой веб-браузер. Для начала работы необходимо осуществить вход в систему, перейдя по ссылке «Вход» в верхней строке меню (новые пользователи должны предварительно пройти процедуру регистрации).

После входа пользователь попадает на свою собственную страницу «История расчетов» (рис. 2), что обеспечивает возможность одновременного доступа на сервер разных пользователей. На странице для каждого произведенного расчета указаны дата, входные параметры, сервисные ссылки для просмотра результатов, повторения расчета и удаления информации.

Дата расчета	Входные параметры	Действия
16-11-17 08:06:41	'd2o1' % file of experimental poins 70 % number of experimental poins 4 1 % number of model (1 - box; 2 - step; 3 - canoe; 4 - hh) 270 1 % R, radius 10 1 % m, polydispersity 45 1 % d, thickness of membrane 1.5e+14 1 % nx, number of vesicles per unit volume .00546 0 % IB, incoherent background 20 1 % D, internal thickness (model2,4) 3.5e+10 1 % rho_ph(model 2) 6.37e+10 0 % rho_0 (D20) 'hh_d' % file for data output 'hh_p' % file for parameters output	Посмотреть расчет Пересчитать Удалить
21-04-17 14:39:13	'dmpce' % file of experimental poins 86 % number of experimental poins 4 1 % number of model (1 - box; 2 - step; 3 - canoe; 4 - hh) 200 1 % R, radius 18 1 % m, polydispersity 45 1 % d, thickness of membrane 1.5e+14 1 % nx, number of vesicles per unit volume .00546 1 % IB, incoherent background 20 1 % D, internal thickness (model 2,4) 6.4e+10 0 % rho 0 (D20) 'data_out' % file for data output 'params_out' % file for parameters output	Посмотреть расчет Пересчитать Удалить
21-04-17 14:59:16	's6' % file of experimental poins 81 % number of experimental poins 4 1 % number of model (1 - box; 2 - step; 3 - canoe; 4 - hh) 170 1 % R, radius	Посмотреть расчет Пересчитать Удалить

Рис. 2. Страница «История расчетов» онлайн-интерфейса для РФФ-анализа данных МУРН на везикулярных системах

Переход к новому расчету осуществляется нажатием соответствующей ссылки в верхней строке меню. Пользователь попадает на страницу с формой ввода параметров расчета (рис. 2), при этом для каждого поля уже заданы значения по умолчанию, которые пользователь может изменить.



Работа с программой f... x

Kenstantin

← → ↻ sff-sans.jinr.ru/bio.pro/www/main.php ☆ ASP

qwerty Выход Новый расчет История расчетов

Сеанс: 21-11-17_14-57-06

Редактирование файла параметров:
(файл params, в полях — значения по умолчанию)

файл с входными данными
(оставьте это поле пустым, если хотите использовать файл данных по умолчанию — d2o1)

Выберите файл Файл не выбран

number of experimental points
70

number of model (1 - box; 2 - step; 3 - canoe; 4 - hh)
4; 1

R, radius
270; 1

m, polydispersity
10; 1

d, thickness of membrane
45; 1

nx, number of vesicles per unit volume
1.5e+14; 1

Рис. 3. Страница «Новый расчет» (часть) онлайн-интерфейса для РФФ-анализа данных МУРН на везикулярных системах

В первой строке входных данных выбирается файл с экспериментальными точками. Вторая строка – количество число экспериментальных точек в этом файле, по которым будет проводиться подгонка параметров. В третьей строке задаются два числа: первое – выбор модели структуры бислоя (1 – *box*, 2 – *step*, 3 – *canoe*, 4 – *hh*), второе – учет *S*-фактора (1 – *S*-фактор рассчитывается по формуле (4), 0 – *S*-фактор полагается равным 1). Модели бислоя представлены на рис. 4.

В четвертой, пятой и шестой строках для всех моделей задаются начальные значения параметров среднего радиуса везикул, полидисперсности и толщины мембраны, соответственно. В седьмой строке для *box*-модели задается произведение числа молекул в единице объема на константную плотность. Для остальных моделей в этой строке задается число молекул в единице объема. В восьмой строке во всех моделях задается параметр некогерентного фона. В девятой строке для моделей 2, 3, 4 задается толщина гидрофобной области (*D*). Десятая строка используется в моделях 2, 3 – здесь задается значение плотности длины рассеяния на области полярных голов (*rho_ph*). Второе число, задаваемое в каждой и строк с номерами 4-10, «отвечает» за фиксацию параметра: 0 – параметр фиксируется и не меняется в процессе счета, 1 – параметр подгоняется к экспериментальным данным.

Примечания:

1. Для *box*-модели *S*-фактор не учитывается, поскольку вместо числа молекул в единице объема вычисляется его произведение на константную плотность.

2. Для *step*-модели один из параметров *d*, *D*, *rho_ph* должен быть зафиксирован, чтобы исключить корреляцию параметров.

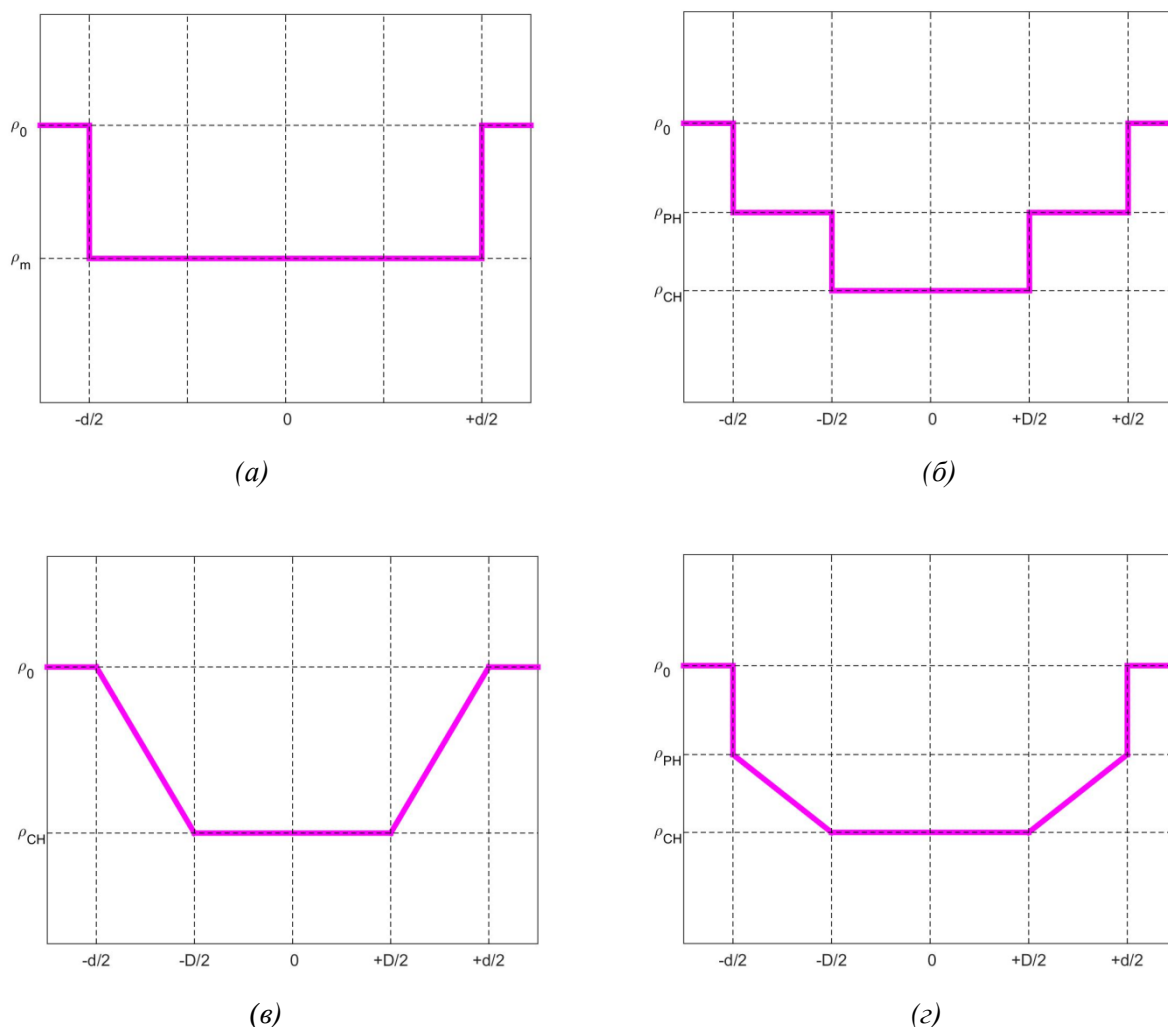


Рис. 4. Модели плотности длины рассеяния нейтронов поперек липидного бислоя: (а) – box-модель с однородной плотностью ρ_m , (б) – step-аппроксимация в виде “ступеньки” с учетом разницы между плотностью в области полярных голов ρ_{PH} и в области углеводородных цепочек ρ_{CH} , (в) – гидрофобно-гидрофильная модель (hh) с линейной аппроксимацией плотности в гидрофильной области, (г) – saw-аппроксимация. Здесь d – толщина мембраны, D – толщина области углеводородных цепочек, ρ_0 – плотность длины рассеяния на окружающей мембрану растворе

При нажатии кнопки «Очистить поля» в меню будут возвращены значения параметров по умолчанию. При нажатии кнопки «Рассчитать» будет произведен расчет с введенными входными данными. Во время счета на экран выводится текущая информация, по которой можно следить за ходом итерационного процесса. По окончании расчета на дисплее отображается затраченное на расчет время и появляется ссылка «Посмотреть расчет». Перейдя по этой ссылке, можно увидеть график с экспериментальными и теоретическими точками, файл с входными и выходными параметрами, а также файл с экспериментальными точками. Все три файла можно скачать, график – сохранить в растровом или векторном виде.

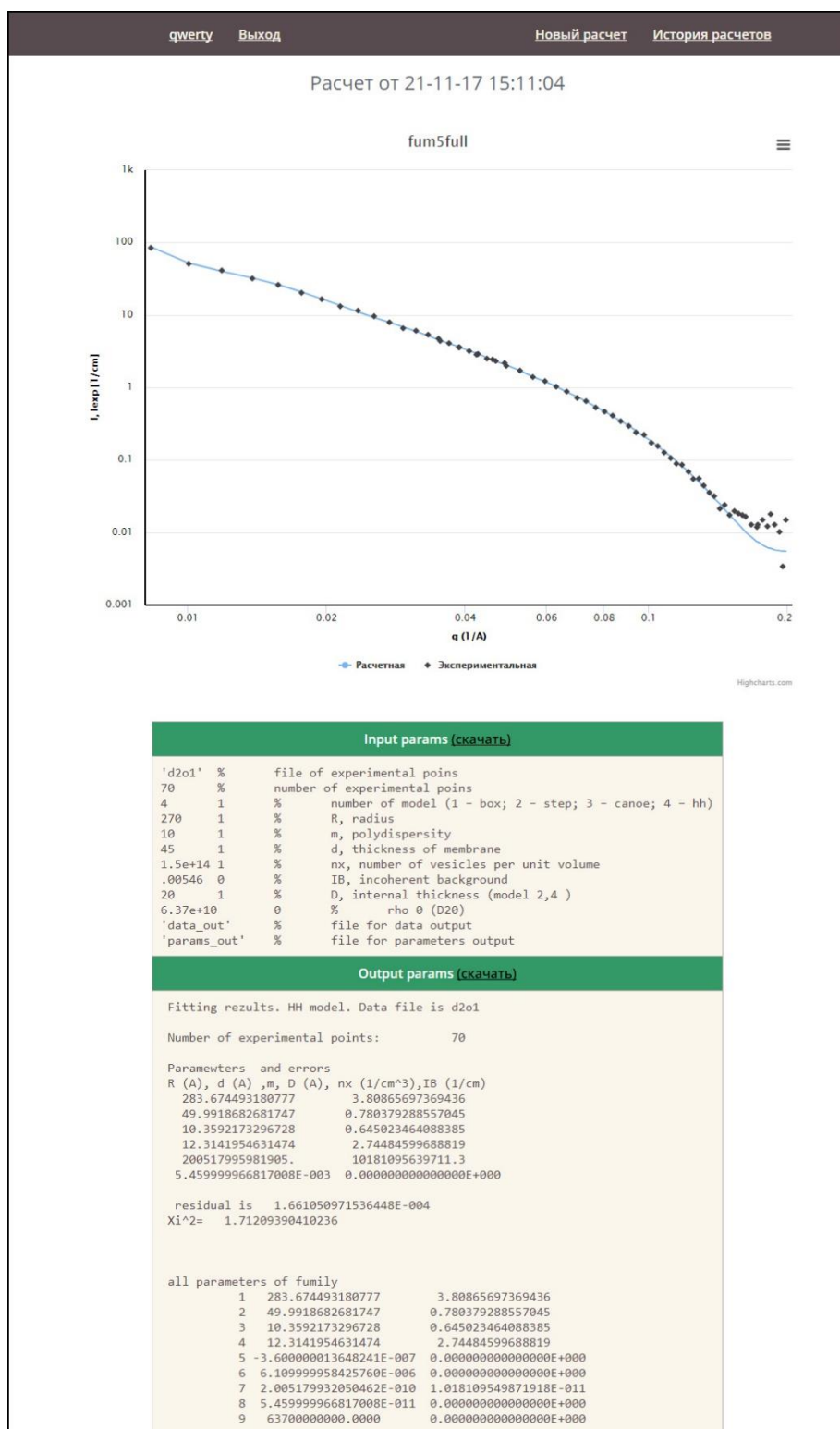


Рис. 5. Страница с результатами расчета (часть) онлайн-интерфейса для РФФ-анализа данных МУРН на полидисперсной везикулярной системе DMPC (димиристоилфосфатидилхолин), полученных на малоугловом спектрометре ЮМО (ЛНФ ОИЯИ). Расчет проведен по HH-модели с учетом структурного фактора

Заключение

В работе представлена онлайн-система с удобным интерфейсом для исследования структуры везикулярных систем в рамках согласно модели РФФ, позволяющая в режиме удаленного доступа обрабатывать спектры *МУРН*. Единственным требованием к системному обеспечению является доступ в Интернет. Проектирование и первоначальная реализация онлайн-интерфейса выполнены в магистерской работе Попова И. [15]. В дальнейшем в бакалаврской работе Турапбай К. [16] система существенно доработана с учетом выявленных недостатков и требований потенциальных пользователей к характеристикам веб-интерфейса. Приложение не занимает много места, что позволяет без проблем создавать несколько сессий, не переживая за ресурсы. Система функционирует в Лаборатории информационных технологий ОИЯИ и доступна по ссылке <http://sff-sans.jinr.ru/>.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант 14-12-00516.

Список литературы

1. Волькенштейн М. В. Биофизика: Учебное руководство, 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит. 1988. — С. 592.
2. Ipatova O.M., Torkhovskaya T.I., Medvedeva N.V., et al. // *Biomedical Chemistry*. — 2010. — Vol. 4. — P. 82.
3. Kiselev M.A., Zemlyanaya E.V., Ipatova O.M. et al. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2015. — Vol. 114. Pp. 288-291.
4. Свергун Д.И., Фрейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. — М.: Наука, 1986. — С. 276.
5. Киселев М.А. Физика элементарных частиц и атомного ядра. — 2011. — Vol. 42. — P. 578.
6. Kiselev M.A., Zemlyanaya E.V., Aswal V.K. et al. // *Europ. Biophys. J.* — 2006. — Vol. 35. — P. 477.
7. Zemlyanaya E.V., Kiselev M.A., Zbytovska J. et al. // *Crystallography reports*. — 2006. — Vol. 51. — Suppl. 1. — P. S22.
8. Земляная Е.В., Киселев М.А., Нойберт Р. и др. // *Поверхность. рентген., синхротрон. нейтрон. исследования*. — 2008. — № 11. — С. 14.
9. Kiselev M.A., Zemlyanaya E.V., Ryabova N.Y. et al. // *Appl. Phys. A*. — 2014. — Vol. 116. — P. 319.
10. Киселев М.А., Земляная Е.В., Жабицкая Е.И., и др. // *Кристаллография*. — 2015. — Т. 60. — № 1. — С. 140.
11. Zemlyanaya E.V., Kiselev M.A., Zhabitskaya E.I. et al. // *Journal of Physics: conference series*. — 2016. — 724, 012056.
12. Zhabitskaya E., Zemlyanaya E., Kiselev M., Gruzinov A. // *EPJ Web of Conferences*. — 2016. — Vol. 108. — 02047.
13. Ostanevich Y.M. // *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* — 1988. — Vol. 15. — P. 91.
14. Dymov S.N., Kurbatov V.S., Silin I.N., Yaschenko S.V. // *Nucl Instrum Methods Phys. Res. A*. — 2000. Vol. 440. — P. 431.
15. Попов И.Р. Проектирование on-line системы расчета параметров полидисперсных везикулярных систем. Магистерская диссертация по направлению «Системный анализ и управление». — Дубна: Государственный университет «Дубна», 2016.
16. Турапбай К.О. Анализ данных малоуглового рассеяния нейтронов на фосфолипидных везикулярных системах с использованием интерактивного on-line интерфейса. Бакалаврская работа по направлению «Физика». — Дубна: Государственный университет «Дубна», 2017.