

# Мультислой фосфолипидных мембран на гидрозольной подложке

А. М. Тихонов<sup>1)</sup>

Институт физических проблем им. П.Л. Капицы РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 13 июля 2010 г.

Методом рассеяния синхротронного излучения исследовано молекулярное строение мультислоя молекул 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC), адсорбированного на поверхности гидрозольных наночастиц кремнезема. Согласно данным рефлектометрии, мультислой сформирован планарными фосфолипидными бислоями толщиной  $69 \pm 1 \text{ \AA}$ , а его полная толщина составляет  $\sim 400 \text{ \AA}$ . Скользящая дифракция показывает, что бислои находятся в кристаллическом состоянии с площадью, приходящейся на молекулу  $41.6 \pm 0.7 \text{ \AA}^2$ .

В водной среде молекулы фосфатидилхолинов образуют микроскопические агрегаты – везикулы и липосомы, оболочка которых формируется молекулярными бислоями и часто рассматривается как модель биологической мембраны [1]. Детальная информация о строении липидного бислоя является существенной для решения множества биофизических задач. Характерный спонтанный радиус кривизны фосфолипидной мембраны в водной среде составляет менее 10 мкм, поэтому при структурных исследованиях образцы мембран приготавливаются на плоских твердых подложках из кристаллического кремния, стекла, кварца или полимера [2–7]. В этом письме сообщается о способе получения макроскопически плоских липидных мембран на жидкой подложке из водного раствора аморфных частиц кремнезема.

Образцы пленок 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC, см. рис.1) приготавливались и изучались во фторопластовой тарелке диаметром  $\sim 100 \text{ мм}$ . С помощью шприца емкостью 25 мкл (Hamilton) на поверхность жидкой подложки высаживалась капля  $\sim 5\text{--}10 \text{ мкл}$  раствора фосфолипида в хлороформе ( $\sim 0.03 \text{ моль/л}$ ), количество вещества в которой достаточно для формирования мультислоя из более чем 10 монослоев липида. При этом растекание капли по поверхности сопровождается падением поверхностного натяжения  $\gamma$  границы воздух – гидрозоль с  $\sim 74 \text{ мН/м}$  до  $\sim 40\text{--}35 \text{ мН/м}$ , которое регистрировалось методом Вильгельми с помощью датчика поверхностного давления (NIMA PS-2). Далее образец приводился в равновесие в герметичном одноступенчатом термостате при  $T = 298 \text{ К}$  в течение  $\sim 12 \text{ ч}$ .

Для сравнения, аналогичным образом приготавливался адсорбированный монослой DSPC на водной подложке ( $\text{pH} \approx 12$ ), представляющей собой рас-

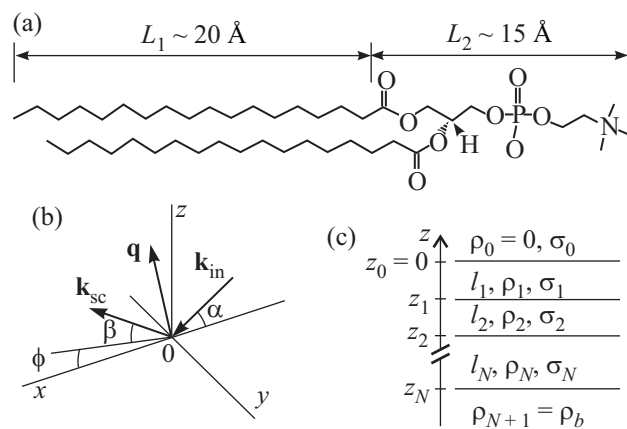


Рис.1. (а) Строение 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC); (б) кинематика рассеяния на поверхности жидкости;  $\mathbf{k}_{in}$  – волновой вектор падающей волны, а  $\mathbf{k}_{sc}$  – волновой вектор волны, рассеянной поверхностью в направлении точки наблюдения;  $\mathbf{q} = \mathbf{k}_{in} - \mathbf{k}_{sc}$  – вектор рассеяния; (с) параметризация электронной плотности интерфейса  $\rho(z)$ . Адсорбированный слой разбивается на  $N$  слоев (плит) с толщиной  $l_j$  и электронной плотностью  $\rho_j$  (slab model);  $\sigma_j = \sigma_0$  – среднеквадратичное отклонение положения  $j$ -й границы от номинального значения  $z_j$ . Слой, граничащий с подложкой, образован полярными группами глицеро-фосфохолина. Поверхностная плотность подложки  $\rho_N = \rho_w$ , а объемная плотность  $\rho_{N+1} = \rho_b$ . Вкладом переходного слоя в коэффициент отражения при  $q_z > 0.1 \text{ \AA}^{-1}$  пренебрегается ( $\sigma_N \gg \sigma_0$ ) [16]

твор NaOH (99.95% по содержанию металла, Sigma-Aldrich) в деионизированной воде (Barnstead UV). В этом случае  $\gamma \sim 50 \text{ мН/м}$ .

Порошок синтетического 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина был приобретен у Avanti Polar Lipids, а хлороформ ( $\sim 99.8\%$ ) у Sigma-Aldrich. Монодисперсные гидрозольные аморфные частицы кремнезема диаметром  $\sim 220 \text{ \AA}$  поставлялись компанией Grace Davison. Эти растворы ( $\text{pH} \approx 9$ ) с удельной плотностью  $1.30 \pm 0.01 \text{ г/см}^3$  (Ludox TM-40,

<sup>1)</sup> e-mail: tikhonov@kapitza.ras.ru

$\sim 40\%$  –  $\text{SiO}_2$  по массе) и  $1.40 \pm 0.01 \text{ г/см}^3$  (Ludox TM-50,  $\sim 50\%$  –  $\text{SiO}_2$  по массе) стабилизированы гидроксидом натрия ( $\sim 0.2$  моль/л).

Рентгеноструктурные данные получены на станции X19C на синхротроне NSLS [8]. Поперечное и внутриплоскостное строение липидных пленок было исследовано методами рефлектометрии и скользящей дифракции сфокусированного луча ( $\sim 10^{11}$  ф/с) с энергией фотонов 15 кэВ ( $\lambda = 0.825 \pm 0.002 \text{ \AA}$ ), соответственно.

Кинематику рассеяния на поверхности жидкости естественно описывать в системе координат, в которой плоскость  $xy$  совпадает с поверхностью, а ось  $z$  направлена нормально к ней противоположно силе гравитации (см. рис.1b). На рис.2 треугольниками

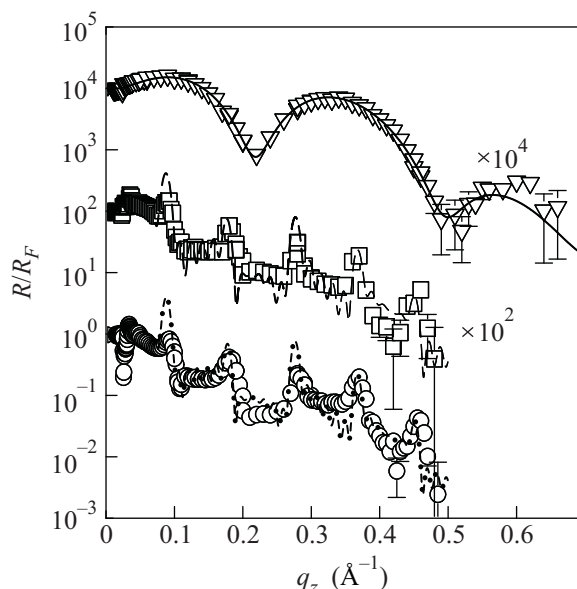


Рис.2. Треугольники –  $R(q_z)/R_F(q_z)$  для монослоя DSPC на поверхности воды. Сплошная линия – двухслойная модель монослоя. Квадраты и кружки –  $R(q_z)/R_F(q_z)$  для липидного мультислоя на поверхности гидрозольа с массовой концентрацией кремнезема 40% и 50%, соответственно. Штриховая линия – модель шести бислоев на подложке с  $\rho_b = 1.21\rho_w$  и  $\sigma_0 = 4.4 \text{ \AA}$ . Штрих-пунктирная линия – модель семи бислоев на подложке с  $\rho_b = 1.3\rho_w$  и  $\sigma_0 = 4.2 \text{ \AA}$

представлена зависимость коэффициента отражения  $R$  от  $q_z = (4\pi/\lambda) \sin \alpha$  для монослоя DSPC, адсорбированного на поверхности воды. Квадраты и кружки на рис.2 иллюстрируют коэффициент отражения для пленок фосфохолина, адсорбированных на поверхности гидрозольа с концентрацией кремнезема 40 и 50%, соответственно. Для наглядности, зависимость  $R(q_z)$  нормирована на функцию Френеля  $R_F(q_z) \approx (q_z - [q_z^2 - q_c^2]^{1/2})^2 / (q_z + [q_z^2 - q_c^2]^{1/2})^2$ , где  $q_c = (4\pi/\lambda) \sin \alpha_c$ . При углах скольжения мень-

ше  $\alpha_c \approx \lambda \sqrt{r_e \rho_b} / \pi$  (где  $r_e = 2.814 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}$  – классический радиус электрона,  $\rho_b$  – средняя электронная плотность подложки) падающий луч испытывает полное отражение  $R \approx 1$ . Электронная плотность воды  $\rho_w \approx 0.333 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$  ( $e^-$  – заряд электрона), а кремнеземного гидрозольа  $\rho_b \approx 1.2\rho_w$  (Ludox TM-40) и  $\rho_b \approx 1.3\rho_w$  (Ludox TM-50).

Период осцилляций в  $R(q_z)$  для водной подложки примерно в два раза больше, чем для гидрозольной. Более того,  $R(q_z)/R_F(q_z)$  поверхности гидрозольа представляет собой набор острых пиков, в то время как структурный фактор монослоя на поверхности воды характеризуется широкими осцилляциями.

$R(q_z)$  содержит информацию об усредненном по большой площади ( $\sim 0.5 \text{ см}^2$ ) поперечном профиле электронной плотности  $\rho(z)$ . Параметризация  $\rho(z)$  произведена в рамках стандартной модели (slab model) мультислоя (см. рис.1b). Модельный профиль строится на основе функции ошибок, с предположением, что  $\sigma_j$  – среднеквадратичное отклонение положения  $j$ -й границы мультислоя от номинального значения  $z_j$  [9]. Нижний предел параметров  $\sigma_j$  обусловлен капиллярной шириной,  $\sigma_{cw}^2 = (k_B T / 2\pi\gamma) \ln(Q_{\max}/Q_{\min})$  ( $k_B$  – постоянная Больцмана), которая задается коротковолновым пределом в спектре капиллярных волн  $Q_{\max} = 2\pi/a$ ,  $a \approx 5 \text{ \AA}$  – по порядку величины межмолекулярное расстояние) и  $Q_{\min} = q_z^{\max} \Delta\beta$  ( $2\Delta\beta \approx 6 \cdot 10^{-4}$  рад – угловое разрешение детектора, а  $q_z^{\max} \approx 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ ) [10–13]. Полагая, что  $\sigma_j = \sigma_0$  для всех  $j$ , в первом борновском приближении структурный фактор имеет вид [14]

$$\frac{R(q_z)}{R_F(q_z)} \approx \left| \frac{1}{\rho_b} \sum_{j=0}^M (\rho_{j+1} - \rho_j) e^{-iq_z z_j} \right|^2 e^{-\sigma_0^2 q_z^2}. \quad (1)$$

Анализ данных на рис.2 (треугольники), показывает, что молекулы DSPC адсорбируются на поверхности воды в виде монослоя,  $R(q_z)$  которого хорошо описывается двухслойной моделью с пятью подгонными параметрами. Вариация параметров в модели монослоя находится в согласии со структурой молекулы DSPC (см. рис.1a). Первый слой толщиной  $L_1 \sim 18 \text{ \AA}$  образован углеводородными цепями и имеет плотность  $\rho_1 = 1.01\rho_w$ , соответствующую самой плотной упаковке предельных углеводородов в  $\gamma$ -фазе [1]. Второй слой монослоя, находящийся непосредственно в контакте с водой, образован полярными гидрофильными группами глицеро-фосфохолина и имеет плотность  $\rho_2 = 1.38\rho_w$ , а его толщина  $L_2 \sim 9 \text{ \AA}$ . Расчетное значение  $\sigma_{cw} = 3.4 \pm 0.2 \text{ \AA}$  и установленное в результате подгонки  $\sigma_0 = 3.6 \pm 0.2 \text{ \AA}$  в пределах погрешности совпадают. Непрерывная ли-

Модельные параметры профиля электронной плотности (см. рис.4)

Подложка	$L_1(\text{Å})$	$L_2(\text{Å})$	$\rho_1/\rho_w$	$\rho_2/\rho_w$	$\sigma_0(\text{Å})$
вода	$17.5 +3/-0.5$	$9 +1/-5$	$1.005 +0.025/-0.006$	$1.38 +0.3/-0.05$	$3.6 +0.2/-0.1$
гидрозоля	$20 \pm 1$	$15 \pm 1$	$0.97 \pm 0.05$	$0.80 \pm 0.02$	$4.2 \pm 0.2$

$L_1$  – толщина слоя углеводородных хвостов с плотностью  $\rho_1$ ;  $L_2$  – толщина слоя полярных групп с плотностью  $\rho_2$ ;  $\sigma_0$  – ширина границ;  $\rho_w = 0.333 \text{ e}^-/\text{Å}^3$  – плотность воды. Ошибки в определении параметров были установлены с использованием стандартного критерия  $-\chi^2$  на доверительном уровне 0.9.

ния на рис.2 – модельный структурный фактор с параметрами, приведенными в таблице. Профиль  $\rho(z)$  двухслойной модели монослоя показан на рис.4а (см. ниже), и он находится в согласии с результатами предыдущих исследований [15].

Адсорбированная пленка фосфолипида на поверхности гидрозоля является мультислоем. При  $q_z > 0.1 \text{ Å}^{-1}$  рассеяние на неоднородностях электронной плотности, связанных с поперечным распределением 22-нанометровых частиц кремнезема, дает малый вклад в отраженную мощность [16]. То есть, при этих углах  $R(q_z)$  определяется лишь строением липидного слоя. Периодичность пиков  $\Delta Q_z \sim 0.09 \text{ Å}^{-1}$  в  $R(q_z)$  на рис.2 соответствует слоистой вдоль  $z$  структуре с периодом  $L \sim 2\pi/\Delta Q_z \sim 70 \text{ Å}$ , который равен толщине двойного слоя молекул DSPC. Относительно небольшая ширина пиков  $\delta q_z \sim 1.5 \cdot 10^{-2} \text{ Å}^{-1}$  в  $R(q_z)$  – результат интерференции отраженных лучей в слое толщиной  $\sim 400 \text{ Å}$ , в котором может располагаться  $\Delta Q_z/\delta q_z \sim 6-7$  липидных бислоев.

Наличие только одного пика в скольльзящей дифракции (рис.3) свидетельствует о высокосимметричной гексагональной упаковке углеводородных хвостов в мультислое. Его положение при  $q_{xy} = 1.48 \pm 0.01 \text{ Å}^{-1}$  ( $q_{xy} = (q_x^2 + q_y^2)^{1/2}$ ) соответствует треугольной решетке углеводородных цепей с периодом  $a = 4.91 \pm 0.04 \text{ Å}$ . Площадь, которая приходится на цепь,  $S = 20.8 \pm 0.5 \text{ Å}^2$ , в пределах погрешности измерения совпадает с ее значением в гексагональной объемной фазе  $P_{\beta'}$  кристаллов фосфохолинов [1].

Положение и интенсивность пиков в  $R(q_z)$  можно удовлетворительно описать профилем электронной плотности, заданным всего пятью параметрами, значения которых легко определить, воспользовавшись рентгеноструктурными данными для кристаллов фосфолипидов. Объем, занимаемый  $-\text{CH}_2-$  группой, в гексагональной фазе составляет  $V_0 \sim 25-26 \text{ Å}^3$  [1,17]. Таким образом, толщина слоя углеводородных хвостов  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}$  – DSPC составляет  $L_1 \sim 17V_0/S \approx 20 \text{ Å}$ , а электронная плотность этого слоя  $\rho_1 \approx \rho_w$  ( $137e^-$  в объеме  $L_1S$ ). Так как  $L = 2(L_1 + L_2)$ , то толщина слоя, образованного по-

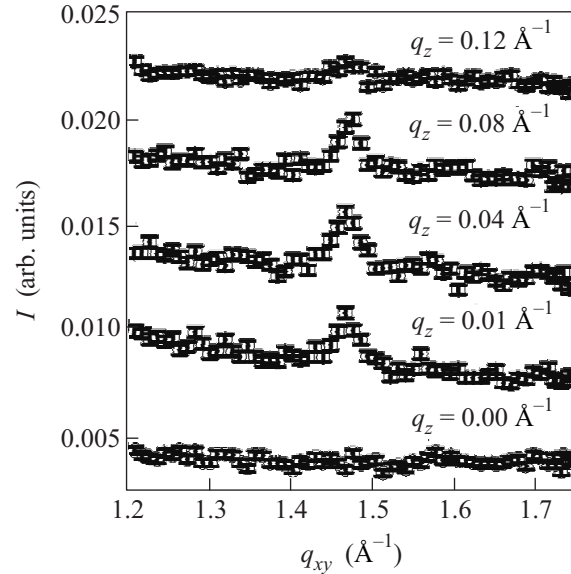


Рис.3. Интенсивность скольльзящей дифракции от липидного мультислоя на границе воздух – гидрозоля. Структура брэгговского пика вдоль оси  $z$  измерена при угле скольжения  $\alpha \approx 0.07^\circ$  с помощью вертикального позиционно-чувствительного детектора (Ordela). Горизонтальное угловое разрешение детектора, которое фактически определяет ширину дифракционного пика, составляет  $\sim 3 \cdot 10^{-3}$  рад или  $\Delta q_{xy} \approx 0.02 \text{ Å}^{-1}$ . Угловое разрешение детектора в вертикальной плоскости  $\sim 2 \cdot 10^{-3}$  рад или  $\Delta q_z \approx 0.02 \text{ Å}^{-1}$

лярными группами,  $L_2 = L/2 - L_1 \sim 15 \text{ Å}$ , а его плотность задается 164 электронами глицеро-фосфохолиновой группы  $\rho_2 = 164e^-/2SL_2 \approx 0.8\rho_w$  (всего в молекуле  $\text{C}_{44}\text{H}_{88}\text{NO}_8\text{P}$  содержится 438 электронов).

Штриховая и штрих-пунктирная линии на рис. 2 соответствуют структурным факторам модели мультислоя (1), образованного шестью и семью бислоями, соответственно (см. рис.4б и таблицу). В этих экспериментах падение  $R(q_z)$  при больших  $q_z$  хорошо описывается расчетным значением  $\sigma_0 = 4.2 \pm 0.2 \text{ Å}$ . Лучшего количественного согласия модели с экспериментальными данными при  $q_z > 0.05 \text{ Å}^{-1}$ , по-видимому, можно добиться, если учесть наличие топологических дефектов заполнения мультислоя на границе с воздухом. Однако в этом случае однозначность опи-

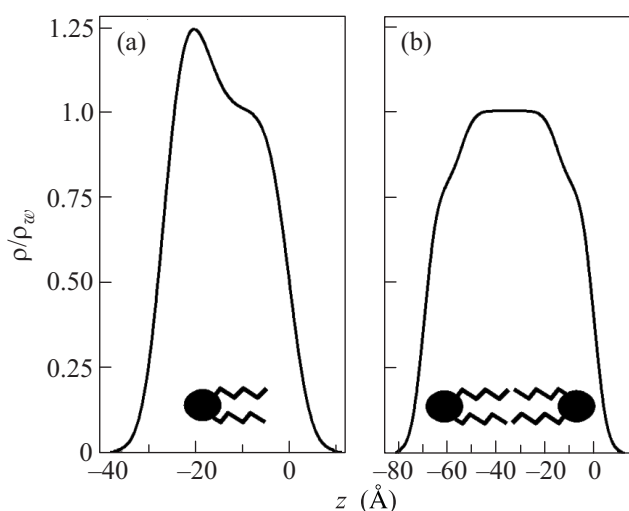


Рис.4. Модельные профили  $\rho(z)$ , нормированные на  $\rho_w = 0.333 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ : (a) липидный монослой на поверхности воды; (b) липидный бислой в составе мультислоя на поверхности гидрозоля. Границы слоев с воздухом проходят при  $z = 0$ , а с подложкой – при  $z < 0$

сания потребует точного знания морфологии поверхности.

Итак, молекулы DSPC адсорбируются на поверхности воды в виде монослоя, в то время как на поверхности гидрозоля они образуют мультислой мембран. Оценка показывает, что на одну молекулу липида как в монослое на поверхности воды, так и в бислое приходится примерно одна и та же площадь,  $\sim 42 \text{ \AA}^2$ . Однако параметры моделей, приведенные в таблице, указывают на то, что слой полярных групп в монослое на  $\sim 50\%$  плотнее и на  $\sim 50\%$  тоньше, чем в бислое. Это свидетельствует о различной конформационной конфигурации глицеро- фосфохолиновых групп в этих слоях. Возможно, это вызвано гидратацией полярной группы молекулы DSPC на поверхности воды, в то время как в мультислое молекулы липида, по-видимому, остаются сухими [18, 19].

В заключение отметим, что наблюдаемая толщина адсорбированного слоя DSPC  $\sim 400 \text{ \AA}$  соответствует дебаевской длине экранирования в объеме гидрозоля ( $\sim 1000 \text{ \AA}$ ) и ширине переходного слоя на его поверхности, возникающего благодаря разнице в потенциалах сил электрического изображения для катионов  $\text{Na}^+$  и отрицательно заряженных наночастиц (макроионов) [20]. Спонтанное образование липидного мультислоя, по-видимому, обязано уникальным граничным условиям на поверхности гидрозоля, на которой электрическое поле, ориентирующее диполи молекул, достигает величины  $\sim 10^9 - 10^{10} \text{ В/м}$  [16]. Высокая концентрация  $\text{Na}^+$  на поверхности гидрозоля  $\sim 10^{19} \text{ м}^{-2}$  также может способствовать форми-

рованию мультислоя. Ранее Берковец с соавторами обсуждали способность ионов натрия глубоко проникать в фосфолипидные мембраны и таким образом формировать положительный поверхностный потенциал [21, 22].

Синхротрон NSLS использовался при поддержке Департамента Энергетики США по контракту No DE-AC02-98CH10886. Станция X19C финансировалась из фондов ChemMatCARS Университета Чикаго, Университета Иллинойса в Чикаго и Университета Стони Брук. Работа частично выполнена при содействии Российского фонда фундаментальных исследований (грант # 090212341).

1. D. M. Small, *The Physical Chemistry of Lipids*, Plenum Press, New York, 1986.
2. S. J. Johnson, T. M. Bayerl, D. C. McDermott et al., *Biophys. J.* **59**, 289 (1991).
3. T. Charitat, E. Bellet-Amalric, G. Fragneto, and F. Graner, *Eur. Phys. J. B* **8**, 583 (1999).
4. P. Theato and R. Zentel, *Langmuir* **16**, 1801 (2000).
5. T. Gutberlet, R. Steitz, G. Fragneto and B. Klosgen, *J. Phys.: Condens. Matter* **16**, S2469 (2004).
6. J. Daillant, E. Bellet-Amalric, A. Braslau et al., *PNAS* **102**, 11639 (2005).
7. E. Novakova, K. Giewekemeyer, and T. Salditt, *Phys. Rev. E* **74**, 051911 (2006).
8. M. L. Schlossman, D. Synal, Y. Guan et al., *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 4372 (1997).
9. F. P. Buff, R. A. Lovett, and F. H. Stillinger, *Phys. Rev. Lett.* **15**, 621 (1965).
10. M. P. Gelfand and M. E. Fisher, *Physica (Amsterdam) A* **166**, 1 (1990).
11. E. S. Wu and W. W. Webb, *Phys. Rev. A* **8**, 2065 (1973).
12. D. K. Schwartz, M. L. Schlossman, E. H. Kawamoto et al., *Phys. Rev. A* **41**, 5687 (1990).
13. D. M. Mitrinovic, A. M. Tikhonov, M. Li et al., *Phys. Rev. Lett.* **85**, 582 (2000).
14. J. Daillant, L. Bosio, B. Harzallah, and J. J. Benattar, *J. Phys. II* **1**, 149 (1991).
15. H. Mohwald, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **41**, 441 (1990).
16. A. M. Tikhonov, *J. Chem. Phys.* **130**, 024512 (2009).
17. M. G. Ruocco and G. G. Shipley, *Biochimica et Biophysica Acta* **691**, 309 (1982).
18. M. Dyck, P. Kruger, and M. Losche, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 150 (2005).
19. T. J. McIntosh, *Chemistry and Physics of Lipids* **81**, 117 (1996).
20. A. M. Tikhonov, *J. Phys. Chem. C* **111**, 930 (2007).
21. S. A. Pandit and M. L. Berkowitz, *Biophys. J.* **82**, 1818 (2002).
22. S. Pandit, D. Bostick, and M. L. Berkowitz, *Biophys. J.* **84**, 3743 (2003).