Письма в ЖЭТФ, том 92, вып. 5, с. 394 – 397

Мультислой фосфолипидных мембран на гидрозольной подложке

А. М. Тихонов[1)]

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 гидрозоля наночастиц кремнезема. Согласно данным рефлектометрии, мультислой сформирован планарными фосфолипидными бислоями толщиной 69 ± 1 Å, а его полная толщина составляет ∼ 400 Å. Скользящая дифракция показывает, что бислои находятся в кристаллическом состоянии с площадью, приходящейся на молекулу 41.6 ± 0.7 Å^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 ∼ 100 мм. С помощью шприца емкостью 25 мкл (Hamilton) на поверхность жидкой подложки высаживалась капля ∼ 5–10 мкл раствора фосфолипида в хлороформе (∼ 0.03 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 γ границы воздух – гидрозоль с ∼ 74 мН/м до ∼ 40–35 мН/м, которое регистрировалось методом Вильгельми с помощью датчика поверхностного давления (NIMA PS-2). Далее образец приводился в равновесие в герметичном одноступенчатом термостате при $T = 298$ К в течение ∼ 12 ч.

Для сравнения, аналогичным образом приготавливался адсорбированный монослой DSPC на водной подложке (pH≈12), представляющей собой раствор NaOH (99.95% по содержанию металла, Sigma-Aldrich) в деионизированной воде (Barnstead UV). В этом случае $\gamma \sim 50$ мН/м.

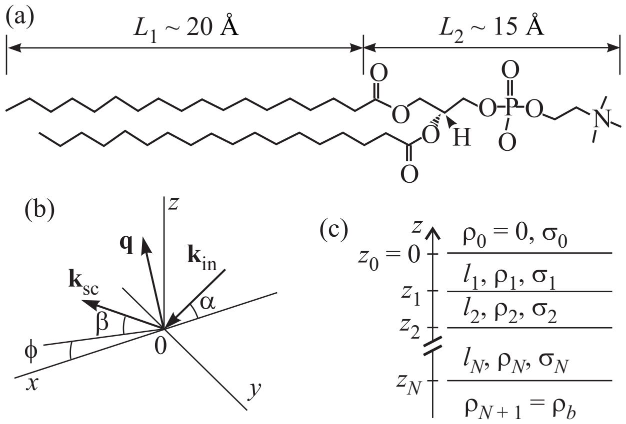

Рис.1. (a) Строение 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC); (b) кинематика рассеяния на поверхности жидкости; $\mathbf{k}_{in}$ – волновой вектор падающей волны, а $\mathbf{k}_{sc}$ – волновой вектор волны, рассеянной поверхностью в направлении точки наблюдения; $\mathbf{q} = \mathbf{k}_{in} - \mathbf{k}_{sc}$ – вектор рассеяния; (c) параметризация электронной плотности интерфейса $\rho(z)$. Адсорбированный слой разбивается на N слоев (плит) с толщиной l_j и электронной плотностью ρ_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 $q_z > 0.1$ Å^{-1} пренебрегается ($\sigma_N \gg \sigma_0$) [16]

Порошок синтетического 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина был приобретен у Avanti Polar Lipids, а хлороформ (∼ 99.8%) у Sigma-Aldrich. Монодисперсные гидрозоли аморфных частиц кремнезема диаметром ∼ 220 Å поставлялись компанией Grace Davison. Эти растворы (pH ≈ 9) с удельной плотностью 1.30 ± 0.01 г/см^3 (Ludox TM-40,

1) e-mail: tikhonov@kapitza.ras.ru

$\sim$ 40% – SiO_2 по массе) и 1.40 ± 0.01 г/см^3 (Ludox TM-50, $\sim$50% – SiO_2 по массе) стабилизированы гидроксидом натрия ($\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 ($\lambda = 0.825 \pm 0.002$ Å), 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

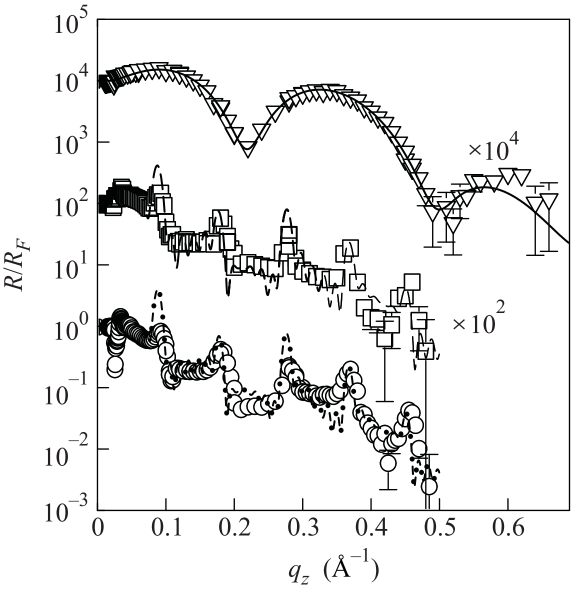

Рис.2. Треугольники – $R(q_z)/R_F(q_z)$ для монослоя DSPC на поверхности воды. Сплошная линия – двухслойная модель монослоя. Квадраты и кружки – $R(q_z)/R_F(q_z)$ для липидного мультислоя на поверхности гидрозоля с массовой концентрацией кремнезема 40% и 50%, соответственно. Штриховая линия – модель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

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 гидрозолей 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 меньше $\alpha_c \approx \lambda\sqrt{r_e\rho_b/\pi}$ (где $r_e = 2.814 \cdot 10^{-5}$ Å – классический радиус электрона, ρ_b – средняя электронная плотность подложки) падающий луч испытывает полное отражение $R \approx 1$. Электронная плотность воды $\rho_w \approx 0.333$ e^-/Å^3 (e^- – заряд электрона), а кремнеземного гидрозоля $\rho_b \approx 1.2\rho_w$ (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 гидрозоля 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 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 σ_j – среднеквадратичное отклонение положения j-й границы мультислоя от номинального значения z_j [9]. Нижний предел параметров σ_j обусловлен капиллярной шириной, $\sigma_{cw}^2 = (k_BT/2\pi\gamma)\ln(Q_{\max}/Q_{\min})$ (k_B – постоянная Больцмана), которая задается коротковолновым пределом в спектре капиллярных волн $Q_{\max} = 2\pi/a$, $a \approx 5$ Å – по порядку величины межмолекулярное расстояние) и $Q_{\min} = q_z^{\max}\Delta\beta$ ($2\Delta\beta \approx 6 \cdot 10^{-4}$ рад – угловое разрешением детектора, а $q_z^{\max} \approx 0.5$ Å^{-1}) [10–13]. Полагая, что $\sigma_j = \sigma_0$ для всех j, в первом борновском приближении структурный фактор имеет вид [14]

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

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 подгоночными параметрами. Вариация параметров в модели монослоя находится в согласии со структурой молекулы DSPC (см. рис.1a). Первый слой толщиной $L_1 \sim 18$ Å образован углеводородными цепями и имеет плотность $\rho_1 = 1.01\rho_w$, соответствующую самой плотной упаковке предельных углеводородов в γ-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 $L_2 \sim 9$ Å. Расчетное значение $\sigma_{cw} = 3.4 \pm 0.2$ Å и установленное в результате подгонки $\sigma_0 = 3.6 \pm 0.2$ Å в пределах погрешности совпадают. Непрерывная ли-

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

Подложка	L_1(Å)	L_2(Å)	ρ_1/ρ_w	ρ_2/ρ_w	σ_0(Å)
вода	$17.5\ {+3/-0.5}$	$9\ {+1/-5}$	$1.005\ {+0.025/-0.006}$	$1.38\ {+0.3/-0.05}$	$3.6\ {+0.2/-0.1}$
гидрозоль	20 ± 1	15 ± 1	0.97 ± 0.05	0.80 ± 0.02	4.2 ± 0.2

L_1 – толщина слоя углеводородных хвостов с плотностью ρ_1; L_2 – толщина слоя полярных групп с плотностью ρ_2; σ_0 – ширина границ; $\rho_w = 0.333$ e-/Å^3 – плотность воды. Ошибки в определении параметров были установлены с использованием стандартного критерия – χ^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 $q_z > 0.1$ 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 $\Delta Q_z \sim 0.09$ Å^{-1} в $R(q_z)$ на рис.2 соответствует слоистой вдоль z структуре с периодом $L \sim 2\pi/\Delta Q_z \sim 70$ Å, который равен толщине двойного слоя молекул DSPC. Относительно небольшая ширина пиков $\delta q_z \sim 1.5\cdot10^{-2}$ Å^{-1} в $R(q_z)$ – результат интерференции отраженных лучей в слое толщиной $\sim$400 Å, в котором может располагаться $\Delta Q_z/\delta q_z \sim 6{-}7$ липидных бислоев.

Наличие только одного пика в скользящей дифракции (рис.3) свидетельствует о высокосимметричной гексагональной упаковке углеводородных хвостов в мультислое. Его положение при $q_{xy} = 1.48\pm0.01$ Å^{-1} ($q_{xy} = (q_x^2+q_y^2)^{1/2}$) соответствует треугольной решетке углеводородных цепей с периодом $a = 4.91\pm0.04$ Å. Площадь, которая приходится на цепь, $S = 20.8\pm0.5$ 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 -CH_2- группой, в гексагональной фазе составляет $V_0 \sim 25{-}26$ Å^3 [1, 17]. Таким образом, толщина слоя углеводородных хвостов CH_3-$(CH_2)_{16}$ – DSPC составляет $L_1 \sim 17V_0/S \approx 20$ 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-

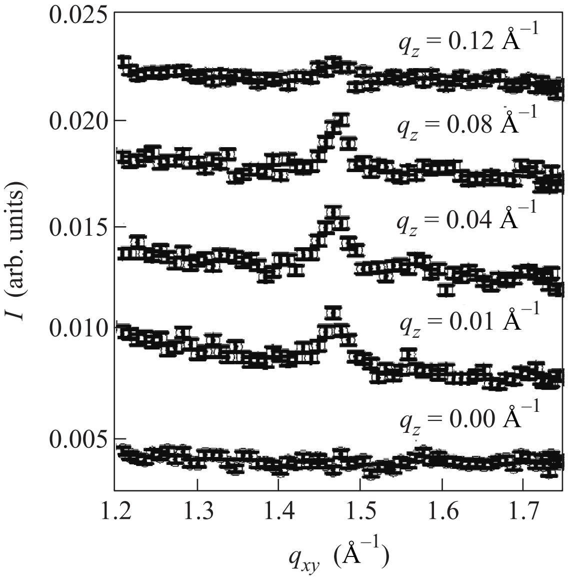

Рис.3. Интенсивность скользящей дифракции от липидного мультислоя на границе воздух – гидрозоль. Структура брэгговского пика вдоль оси z измерена при угле скольжения $\alpha \approx 0.07°$ с помощью вертикального позиционно-чувствительного детектора (Ordela). Горизонтальное угловое разрешение детектора, которое фактически определяет ширину дифракционного пика, составляет $\sim 3\cdot10^{-3}$ рад или $\Delta q_{xy} \approx 0.02$ Å^{-1}. Угловое разрешение детектора в вертикальной плоскости $\sim 2\cdot10^{-3}$ рад или $\Delta q_z \approx 0.02$ Å^{-1}

лярными группами, $L_2 = L/2 - L_1 \sim 15$ Å, а его плотность задается 164 электронами глицеро-фосфохолиновой группы $\rho_2 = 164e^-/2SL_2 \approx 0.8\rho_w$ (всего в молекуле $C_{44}H_{88}NO_8P$ 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.4b и таблицу). В этих экспериментах падение $R(q_z)$ при больших q_z хорошо описывается расчетным значением $\sigma_0 = 4.2\pm0.2$ Å. Лучшего количественного согласия модели с экспериментальными данными при $q_z > 0.05$ Å^{-1}, по-видимому, можно добиться, если учесть наличие топологических дефектов заполнения мультислоя на границе с воздухом. Однако в этом случае однозначность опи-

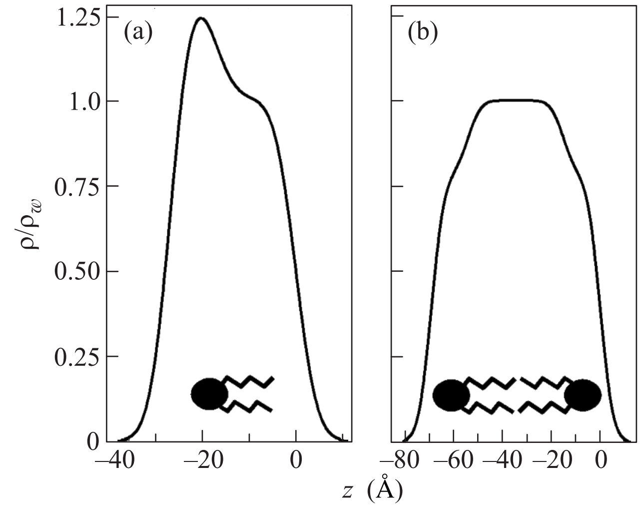

Рис.4. Модельные профили $\rho(z)$, нормированные на $\rho_w = 0.333\ e^-/\text{Å}^3$: (a) липидный монослой на поверхности воды; (b) липидный бислой в составе мультислоя на поверхности гидрозоля. Границы слоев с воздухом проходят при $z = 0$, а с подложкой – при $z < 0$

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, $\sim 42\,\text{Å}^2$. 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 ~ 400 Å соответствует дебаевской длине экранирования в объеме гидрозоля (~ 1000 Å) и ширине переходного слоя на его поверхности, возникающего благодаря разнице в потенциалах сил электрического изображения для катионов 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} В/м [16]. Высокая концентрация Na^+ на поверхности гидрозоля $\sim 10^{19}\,\text{м}^{-2}$ также может способствовать формированию 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, Biochemica 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).