Письма в ЖЭТФ, том 102, вып. 7, с. 536 – 541

О формировании макроскопически плоской фосфолипидной мембраны на гидрозольной подложке

А. М. Тихонов[+1)], *В. Е. Асадчиков*[*], *Ю. О. Волков*[*]

[+]*Институт физических проблем им. Капицы РАН, 119334 Москва, Россия*

[*]*Институт кристаллографии им. Шубникова РАН, 119333 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 3 августа 2015 г.

Методом рентгеновской рефлектометрии с использованием синхротронного излучения исследована зависимость структуры фосфолипидного слоя (DSPC и SOPC), адсорбированного на гидрозольной подложке, от концентрации NaOH в растворе 5-нанометровых частиц кремнезема. С помощью модельно-независимого подхода по экспериментальным данным восстановлены профили электронной концентрации (поляризуемости), согласно которым толщина липидной пленки может варьироваться от монослоя (~ 35 Å) до нескольких бислоев (~ 450 Å). При объемной концентрации NaOH ~ 0.5 моль/л пленка на поверхности гидрозоля представляет собой макроскопически плоскую фосфолипидную мембрану (бислой) толщиной ~ 60 Å и с площадью, приходящейся на молекулу DSPC и SOPC, 45 ± 2 и 49 ± 3 Å^2 соответственно.

DOI: 10.7868/S0370274X15190157

Фосфолипидный бислой представляет собой простейшую модель клеточной мембраны [1–3]. Ранее нами сообщалось о способе получения макроскопически плоских мультислоев липидных мембран на сильно поляризованной подложке из водного раствора аморфных наночастиц кремнезема [4]. Применив модельно-независимый подход при восстановлении профилей электронной концентрации [5, 6], из данных рентгеновской рефлектометрии мы установили, что толщина фосфолипидного мультислоя определяется параметрами гидрозоля, которые задают ширину поверхностного электрического двойного слоя: концентрацией ионов Na^+, уровнем pH и размером наночастиц. В частности, при определенных условиях на поверхности гидрозоля 5-нанометровых частиц спонтанно образуется макроскопически плоская фосфолипидная мембрана.

Пленки 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) и 1-стеароил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (SOPC, см. рис. 1) приготавливались и изучались в соответствии с методикой, описанной в работе [4]. На поверхность жидкой подложки, помещенной во фторопластовой тарелке диаметром ~ 100 мм, с помощью шприца высаживалась капля раствора фосфолипида в хлороформе объемом 10–20 мкл, содержащая достаточное количество вещества для того, чтобы при ее растекании по поверхности сформировать более десяти монослоев липида. Адсорбированная пленка при этом находится в равновесии с трехмерными агрегатами, в которые аккумулируется избыток поверхностно-активного вещества. Изменение поверхностного натяжения γ границы воздух–гидрозоль с ~ 74 до $\sim 50-30$ мН/м регистрировалось по методу Вильгельми с помощью датчика поверхностного давления NIMA PS-2. Далее образец приводился в равновесие в герметичном одноступенчатом термостате при $T = 298$ K в течение ~ 12 ч.

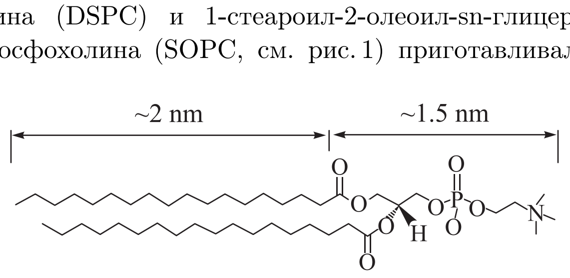

Рис. 1. Молекулярная структура фосфолипида DSPC

Порошки и растворы в хлороформе синтетических DSPC и SOPC приобретались у Avanti Polar Lipids, а хлороформ (~ 99.8 %) – у Sigma-Aldrich. Гидрофобная часть молекул этих липидов ($L_1 \approx \approx 2$ нм) представляет собой две углеводородные цепи из 18 атомов углерода. Гидрофильная часть молекулы ($L_2 \approx 1.5$ нм) образована глицерином и фосфохолином. Единственное отличие в строении DSPC и SOPC – это наличие у последнего двойной углеродной связи между 9-м и 10-м атомами в одной из углеводородных цепей. В молекуле DSPC (или $C_{44}H_{88}NO_8P$) содержится $\Gamma = 438$ электронов, а в

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

SOPC (или $C_{44}H_{86}NO_8P$) – на два меньше ($\Gamma = 436$).

Концентрированный монодисперсный золь Ludox FM, стабилизированный гидроксидом натрия, был предоставлен компанией Grace Davison. Этот водный раствор плотностью 1.1 г/см^3 содержит кремнеземные аморфные частицы диаметром $D \approx 5$ нм (16 % SiO_2, 0.3 % Na по массе и pH ≈ 10).

Обогащение гидрозоля NaOH проводилось в колбе путем его смешивания (взбалтывания и последующего помещения в ультразвуковую ванну Branson 2510) с раствором (~ 5 моль/л) гидроксида щелочного металла (99.95 % по содержанию металла, Sigma-Aldrich) в деионизированной воде (Barnstead UV). При этом очень важно, чтобы уровень pH-золя не превышал критического значения $pH_c < 12$, при котором происходит процесс коагуляции наночастиц [7].

Поперечное строение липидных пленок было исследовано методом рефлектометрии с использованием синхротронного излучения на станции X19C синхротрона NSLS, которая оборудована универсальным спектрометром для изучения поверхности жидкости [8]. Источником излучения для X19C является поворотный магнит с критической энергией ~ 6 кэВ. В экспериментах использовался сфокусированный монохроматический рентгеновский луч с интенсивностью $\approx 10^{11}$ ф/с и энергией фотонов $E = 15$ кэВ ($\lambda = 0.825 \pm 0.002$ Å). Фокусировка луча с поперечным сечением на выходе из магнита 5 мм в высоту и 40 мм в ширину осуществлялась с помощью тороидального зеркала с фокусным расстоянием ~ 10 м. Далее луч с диаметром поперечного сечения менее 1 мм отклонялся к поверхности образца, ориентированной силой гравитации, с помощью однокристального монохроматора (Si (111)). Таким образом, при измерении коэффициента отражения можно было перекрыть диапазон углов скольжения α от 0 до $\sim 8°$. Монохроматор спектрометра собран на основе трехкружного гониометра (Huber), имеет водяное охлаждение и расположен в герметичной емкости, заполненной газообразным гелием под небольшим избыточным давлением (~ 10 торр). В эксперименте геометрические параметры падающего на поверхность образца луча, а также пространственное разрешение детектора контролировались с помощью щелей. В данной работе измерения коэффициента отражения были произведены с угловым разрешением детектора $\Delta\beta \approx 0.02°$ в вертикальной плоскости и $\approx 0.8°$ в горизонтальной.

Пусть $\mathbf{k}_{in}$, $\mathbf{k}_{sc}$ – волновые вектора падающего и рассеянного в направлении точки наблюдения лучей соответственно. Вектор рассеяния $\mathbf{q} = \mathbf{k}_{in} - \mathbf{k}_{sc}$ при зеркальном отражении ($\alpha = \beta$) имеет только одну компоненту, $q_z = (4\pi/\lambda)\sin(\alpha)$, где α и β – углы скольжения и рассеяния в плоскости, нормальной к поверхности (см. вставку к рис. 2).

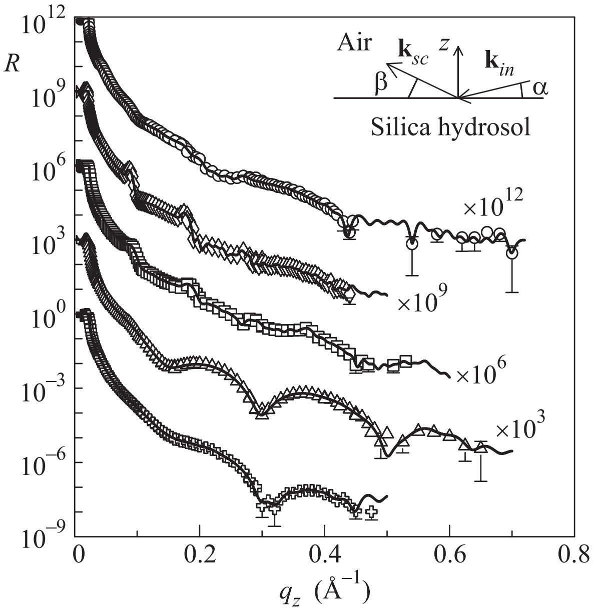

Рис. 2. Коэффициент отражения R границы воздух–гидрозоль с адсорбированной пленкой липида: кружки – монослой DSPC (pH $\approx$ 10); ромбы – мультислой DSPC (pH $\approx$ 10); квадраты – мультислой DSPC (pH $\approx$ 11); треугольники и кресты – бислои DSPC и SOPC, соответственно (pH $\approx$ 11.5); сплошные линии – результат расчета. Вставка: $\mathbf{k}_{in}$, $\mathbf{k}_{sc}$ – волновые вектора падающего и рассеянного в направлении точки наблюдении лучей соответственно

При измерении кривой отражения происходит усреднение влияния латеральных неоднородностей поверхности и приповерхностных слоев, так как характерная площадь области засветки образца зондирующим пучком $\sim 10^2$ мм^2. Это позволяет рассмотреть восстановленные структуры в рамках представления идеальной слоисто-неоднородной среды.

Детальная реконструкция распределений поляризуемости среды $\delta(z)$ по глубине z проводилась с использованием модельно-независимого подхода, основанного на экстраполяции асимптотики угловой зависимости коэффициента отражения в область больших α [5, 6]. Предполагается наличие в реконструируемой структуре особых "точек разрыва", в которых $\delta(z)$ либо его n-я производная $\delta^{(n)}(z)$ меняется скачкообразно:

$$\mathrm{D}^{(n)}(z_j) \equiv \frac{d^n\delta}{dz^n}(z_j + 0) - \frac{d^n\delta}{dz^n}(z_j - 0), \qquad (1)$$

где z_j – координата j-й точки разрыва. В свою очередь, в рамках первого борновского приближения асимптотическое поведение амплитудного коэффициента отражения имеет вид

$$r\left(q_z \to \infty\right) \simeq -\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \left(\frac{i}{q_z}\right)^{n+2} \sum_{j=1}^{m} \mathrm{D}^{(n)}\left(z_j\right) e^{iq_z z_j}. \tag{2}$$

Подход [5] утверждает, что заданному сочетанию из m «точек разрыва» $\mathrm{D}^{(n)}\left(z\right)$ соответствует конечное число различных амплитудных коэффициентов отражения, описывающих экспериментально измеренное значение квадрата их модуля R в некотором интервале q_z. В частности, если расстояния между всеми "точками разрыва" различны, то существует всего два решения $\delta(z)$, удовлетворяющих требуемой асимптотике кривой отражения.

Процедура модельно-независимого восстановления профиля поляризуемости состоит из двух этапов. Сперва для исследуемой структуры посредством анализа зависимости Rq_z^{2n+4} определяются порядок и расположение "точек разрыва" (где $n = 0, 1, 2, \ldots$ – искомый порядок особых точек). Затем проводится численная оптимизация распределения $\delta(z_1, \ldots, z_M)$, разбитого на большое число $M \sim 100$ тонких слоев. При этом расчетная кривая отражения R_c подгоняется к экспериментально измеренной кривой R с применением стандартного алгоритма Левенберга–Марквардта [9].

В данной работе все экспериментальные кривые спадают $\propto 1/q_z^6$. Поэтому для описания структур достаточно использовать только особые точки 1-го порядка. В этом случае целевая функция невязки, обеспечивающая требуемое асимптотическое поведение угловой зависимости коэффициента отражения, имеет вид:

$$\begin{aligned} &MF\left(\delta_1, \ldots, \delta_M\right) = \\ &= \frac{1}{N} \sum_{j=1}^{N} \Big[\log R\left(q_j\right) - \log R_c\left(q_j\right)\Big]^2 + \\ &+ Q_1 \sum_{j \neq j_1, \ldots, j_m}^{M-1} \left(\delta_{j-1} + \delta_{j+1} - 2\delta_j\right)^2 + \\ &+ Q_2 \sum_{j=j_1 \ldots j_m}^{m} \left(\delta_{j+1} - \delta_j\right), \end{aligned} \tag{3}$$

где N – число экспериментальных точек, $j_1, \ldots, j_m$ – положения "точек разрыва", $Q_{1,2}$ – параметры, регулирующие точность подгонки ($Q \approx 10^9$). Вторая сумма в (3) обеспечивает непрерывность профиля $\delta(z)$ в интервалах между точками разрыва $z_1, \ldots, z_n$, а третья – 1-й порядок точек разрыва.

Восстановленному профилю $\delta(z)$ соответствует распределение электронной концентрации $\rho(z)$ [10]:

$$\rho = \frac{2\pi}{r_0 \lambda^2}\delta, \tag{4}$$

где $r_0 = 2.814 \cdot 10^{-5}$ Å – классический радиус электрона. Далее зависимость $\rho(z)$ можно использовать, например, для оценки площади A на одну молекулу в монослое толщиной $d = z_2 - z_1$:

$$A = \frac{\Gamma}{\int\limits_{z_1}^{z_2} \rho(z) dz}. \tag{5}$$

На рис. 2 символами представлены экспериментальные зависимости коэффициента отражения $R(q_z)$ для границ воздух–гидрозоль 5-нанометровых частиц с адсорбированной пленкой липида. Кружки соответствуют поверхности золя с pH ≈ 10 (Ludox FM), количества высаженного на которой DSPC недостаточно для формирования однородного монослоя на всей поверхности подложки. Период осцилляции R для этой системы $\Delta q_z \approx 0.25$ Å^{-1}, что предполагает наличие в области засветки адсорбированного слоя толщиной в монослой ($\sim 2\pi/\Delta q_z \approx 30$ Å). Ромбами показана зависимость $R(q_z)$ для той же поверхности золя с pH ≈ 10, но с однородным мультислоем DSPC. Квадратами представлена поверхность обогащенного NaOH (~ 0.3 моль/л) золя с pH ≈ 11 с мультислоем того же фосфолипида. Последние две зависимости аналогичны ранее опубликованным данным для гидрозольных подложек с частицами кремнезема диаметром ~ 22 нм и pH ≈ 9 [4]. Кривые, представленные треугольниками (слой DSPC) и крестами (слой SOPC), получены для подложек, обогащенных NaOH (~ 0.5 моль/л), с pH ≈ 11.5. Период осцилляций R на этих кривых $\Delta q_z \approx 0.15$ Å^{-1}, т.е. толщина адсорбированного слоя $\sim 2\pi/\Delta q_z \approx 50$ Å (бислой).

Согласно восстановленному для монослоя DSPC профилю $\rho(z)$ (рис. 3а, где $\rho_w = 0.333\ e^-/$Å^3 – электронная концентрация в воде при нормальных условиях) его толщина 36 ± 2 Å $\approx L_1 + L_2$, т.е. все молекулы преимущественно ориентированы вдоль нормали к поверхности. Несмотря на то что расчетная площадь на молекулу $A = 44 \pm 2$ Å^2 хорошо согласуется со значением для кристаллического монослоя, электронная концентрация в области гидрофильной группы все же меньше, чем в модельном распределении (штриховая линия на рис. 3а) для монослоя DSPC из работы [4]. Это, по-видимому, свидетельствует о неполном заполнении липидного слоя.

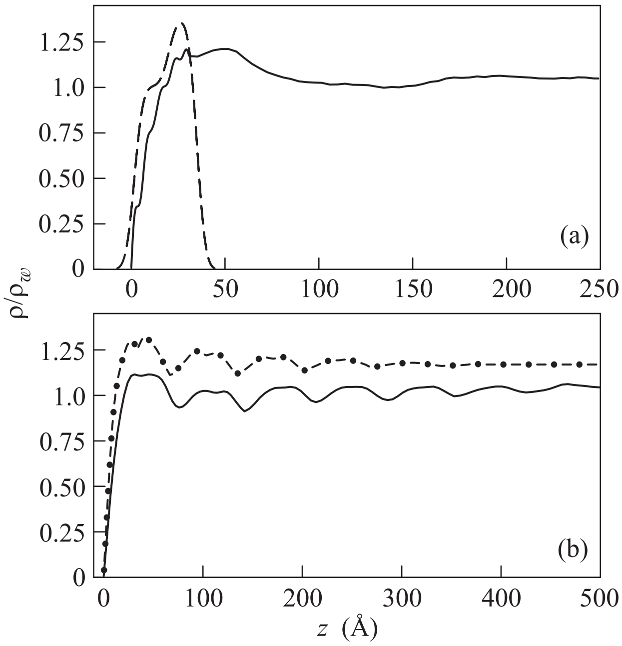

Рис. 3. Восстановленные профили распределений $\rho(z)$, нормированные на электронную концентрацию в воде при нормальных условиях, $\rho_w = 0.333\ e^-/\text{Å}^3$. (a) – Сплошная линия – монослой DSPC на поверхности гидрозоля $\sim$5-нанометровых частиц, штриховая линия – модельное распределение электронной концентрации для монослоя DSPC [4]. (b) – Сплошная линия – мультислой DSPC на гидрозольной подложке с pH ≈ 10, штрихпунктир – мультислой того же липида на подложке с pH ≈ 11

Непосредственно к монослою примыкает слой с повышенной плотностью $\rho \approx 1.2\rho_w$ толщиной ≈ 50 Å, а следом идет слой толщиной ~ 80 Å с электронной концентрацией $\approx \rho_w$. Мы связываем формирование двух последних слоев с явлением конденсации наночастиц кремнезема на границе монослоя, образованной гидрофильными группами [11].

Профиль мультислоя DSPC на поверхности гидрозоля с pH ≈ 10 (сплошная линия на рис. 3b) представляет собой 6-слойную структуру (полная толщина ~ 450 Å) с периодом между "точками разрыва" 72 ± 2 Å, что соответствует удвоенному значению длины молекулы DSPC. Предполагая, что каждый из наблюдаемых слоев эквивалентен молекулярному бислою, получаем расчетное значение $A = 39 \pm 1\,\text{Å}^2$. В то же время по экспериментальным данным скользящей дифракции $A = 41.6 \pm 0.7\,\text{Å}^2$ [4]. Таким образом, согласно (5) избыточное число электронов на молекулу липида составляет 32 ± 9, что соответствует ~ 3 молекулам H_2O и/или ионам Na^+. Толщина мультислоя DSPC на подложке с pH ≈ 11 заметно меньше (~ 300 Å; штрихпунктирная линия на рис. 3b). Он представляет собой 4-слойную структуру с периодом между "точками разрыва" 68.1 ± 0.9 Å и расчетным значением $A = 34 \pm 2\,\text{Å}^2$. Таким образом, "избыток" электронов на одну молекулу липида составляет 86 ± 2, что соответствует ~ 9 молекулам H_2O и/или ионам Na^+.

На рис. 4a показан профиль электронной концентрации для тонкой пленки липида DSPC на гидрозоле, сильно обогащенном NaOH (~ 0.5 моль/л, pH $\approx$ ≈ 11.5). Одна из "точек разрыва" в нем расположена на глубине 30.6 Å. Предполагая, что положение этой особой точки соответствует границе раздела между внешним и внутренним монослоями, получаем $A = 45 \pm 2\,\text{Å}^2$.

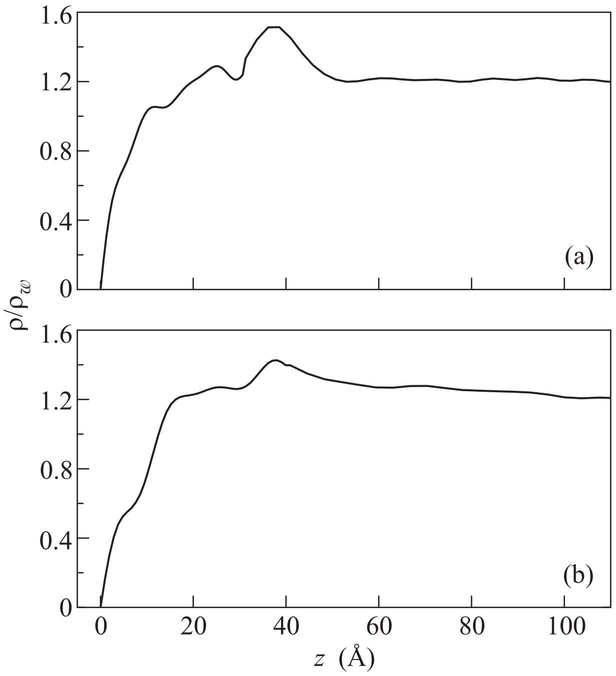

Рис. 4. Восстановленные профили распределений $\rho(z)$, нормированные на электронную концентрацию в воде при нормальных условиях, $\rho_w = 0.333\ e^-/\text{Å}^3$, для мембраны из DSPC (a) и SOPC (b) на подложке с pH ≈ 11.5

К этой границе прилегает более плотный слой толщиной ~ 20 Å. С одной стороны, его толщина немного меньше, а интегральная плотность близка к значению интегральной плотности монослоя DSPC. С другой стороны, толщина этого слоя более чем в два раза меньше характерного диаметра частиц в объеме исходного золя (≈ 5 нм). Если этот слой образован коллоидными частицами, то необходимо предположить, что с увеличением концентрации натрия в растворе их радиус существенно уменьшается. Однако при высокой концентрации Na^+ экспериментально

Таблица 1. Параметры структур на поверхности золя 5-нанометровых частиц SiO_2, стабилизированного NaOH*)

Структура	Фосфолипид	pH	L, Å	A, Å^2
Монослой	DSPC	10	36 ± 2	44 ± 2
Бислой в мультислое	DSPC	10	72 ± 2	41.6 ± 0.7
Бислой в мультислое	DSPC	11	68 ± 1	41.6 ± 0.7
Бислой	DSPC	11.5	60 ± 2	45 ± 2
Бислой	SOPC	11.5	60 ± 2	49 ± 3

*) L – толщина слоя; A – площадь поверхности, приходящаяся на одну молекулу липида.

наблюдается обратный процесс – коагуляция частиц, проявляющаяся, например, в помутнении раствора [7]. Это позволяет интерпретировать данное распределение как профиль липидного бислоя на поверхности гидрозоля.

Для пленки липида SOPC на подложке с pH $\approx$ $\approx$ 11.5 толщина уплотненной области превышает 60 Å (рис. 4b). При этом $\rho(z)$ плавно спадает по глубине, выраженной границы раздела между пленкой и подложкой не наблюдается. Также не обнаружено отчетливого расслоения наночастиц кремнезоля в приповерхностной области. Отметим, что на глубине до 57 Å интегральная плотность всей наблюдаемой структуры более чем в два раза превосходит теоретическое значение для монослоя этого липида. Предположив количество SOPC в пленке равным двум (трем) монослоям, то получим $A = 49 \pm 3$ Å^2 (65 ± 3 Å^2). Только второе значение находится в согласии с оценкой величины A для бислойных стенок везикул SOPC в водных суспензиях [12].

Профили электронной концентрации для пленок DSPC и SOPC на рис. 4 имеют очень схожую структуру. Вместе с тем фосфолипиды DSPC и SOPC имеют различные температуры фазового перехода T_c, связанного с плавлением углеводородных цепей (*chain-melting transition*) [2]. Для первого фосфолипида $T_c \approx 55\,^\circ$C, что объясняет формирование макроскопически плоской кристаллической мембраны ($A = 45 \pm 2$ Å^2). Для SOPC $T_c \approx 6\,^\circ$C, и при этом параметр A на $\sim 10\,\%$ больше, чем у DSPC. Таким образом, при комнатной температуре мембрана SOPC, возможно, находится в жидком агрегатном состоянии.

Отметим, что для последних двух систем интервал z, в котором поверхностная электронная концентрация отличается от объемной, $\rho_b \approx 1.2\rho_w$, шире толщины бислоя (~ 60 Å) на 50–60 Å. Возможно, образование этой переходной области связано с конденсацией наночастиц кремнезема на границе липидной мембраны [11].

Ранее показано, что на границе воздух–кремнезоль существует чрезвычайно широкий переходный слой (электрический двойной слой), возникающий благодаря разнице в потенциалах сил электрического изображения для катионов Na^+ и отрицательно заряженных наночастиц кремнезема (макроионов) [13]. Его ширина определяется дебаевской длиной экранирования Λ_D в объеме раствора [1]. Добавление в состав золя гидроксида натрия приводит к смещению в нем химического равновесия, сопровождающемуся ростом значения pH раствора, или объемной концентрации c^- ионов OH^-. Поскольку $\Lambda_D \propto 1/\sqrt{c^-}$, увеличение pH приводит к сужению поверхностного двойного слоя [14].

Совокупность полученных нами данных свидетельствует о том, что полная толщина адсорбированного мультислоя DSPC $\sim \Lambda_D$ (см. табл. 1). Обогащение гидрозольной подложки NaOH приводит к уменьшению в несколько раз максимальной толщины адсорбированного липидного слоя в соответствии с уменьшением Λ_D. При pH $\approx$ 10 ($\Lambda_D \sim 300$ Å) на поверхности гидрозоля формируется самый толстый (~ 450 Å) мультислой из шести бислоев DSPC, при pH $\approx$ 11 ($\Lambda_D \sim 100$ Å) мультислой толщиной ~ 300 Å состоит из четырех бислоев, а при pH ≈ 11.5 ($\Lambda_D \sim 50$ Å) образуется один бислой. При этом ориентированная упаковка молекул внутри каждого бислоя соответствует двумерному кристаллу фосфолипида.

Таким образом, восстановленные с помощью модельно-независимого подхода профили электронной концентрации демонстрируют, что толщина адсорбированной на поверхности гидрозоля пленки DSPC по порядку величины совпадает с дебаевской длиной экранирования в подложке. При объемной концентрации NaOH ~ 0.5 моль/л и pH $\approx$ 11.5 на поверхности гидрозоля формируется макроскопически плоская фосфолипидная мембрана толщиной ~ 60 Å с величиной A, характерной для двумерного кристалла (гексагональная фаза $P_{\beta'}$ [2, 4]). В случае

SOPC A как минимум на $\sim 10\,\%$ больше, чем для бислоя DSPC. В этом случае возможно образование жидкой мембраны толщиной $\sim 60\,\text{Å}$ (фаза L_α [2]).

Синхротрон NSLS использовался при поддержке Департамента энергетики США по контракту # DE-AC02-98CH10886. Станция X19C финансировалась из фондов ChemMatCARS, Университета Чикаго, Университета Иллинойса в Чикаго и Университета Стони Брук. Авторы благодарны компании Grace Davison за предоставление растворов коллоидного кремнезема Ludox. Работа частично поддержана РФФИ (грант # 15-32-20935).

1. A. W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, 3rd ed., John Wiley & Sons, N.Y. (1976).
2. D. M. Small, *The Physical Chemistry of Lipids*, Plenum Press, N.Y. (1986).
3. Д. А. Лось, *Десатуразы жирных кислот*, Научный мир, М. (2014).
4. А. М. Тихонов, Письма в ЖЭТФ **92**, 394 (2010).
5. I. V. Kozhevnikov, Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A **508**, 519 (2003).
6. I. V. Kozhevnikov, L. Peverini, and E. Ziegler, Phys. Rev. B **85**, 125439 (2012).
7. J. Depasse and A. Watillon, J. Coll. Int. Sci. **33**, 430 (1970).
8. M. L. Schlossman, D. Synal, Y. Guan, M. Meron, G. Shea-McCarthy, Z. Huang, A. Acero, S. M. Williams, S. A. Rice, and P. J. Viccaro, Rev. Sci. Instrum. **68**, 4372 (1997).
9. J. Nocedal and S. Wright, *Numerical Optimization*, 2nd ed., Springer (2006).
10. B. L. Henke, E. M. Gullikson, and J. C. Davis, Atomic Data and Nuclear Data Tables **54**, 181 (1993).
11. В. Е. Асадчиков, В. В. Волков, Ю. О. Волков, К. А. Дембо, И. В. Кожевников, Б. С. Рощин, Д. А. Фролов, А. М. Тихонов, Письма в ЖЭТФ **94**, 625 (2011).
12. N. Kučerka, M.-P. Mieh, and J. Katsaras, Bio. Bio. Acta **1808**, 2761 (2011).
13. A. M. Tikhonov, J. Phys. Chem. C **111**, 930 (2007).
14. A. M. Tikhonov, J. Chem. Phys **124**, 164704 (2006).