Письма в ЖЭТФ, том 120, вып. 6, с. 470 – 474

Субтерагерцовый отклик планарных фосфолипидных мембран в неупругом рассеянии света

С. В. Адищев, Е. А. Добрынина, Н. В. Суровцев[1)]

Институт автоматики и электрометрии Сибирского отделения РАН, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 23 июля 2024 г.
После переработки 20 августа 2024 г.
Принята к публикации 21 августа 2024 г.

Методом низкочастотного комбинационного рассеяния света исследованы гидратированные планарные образцы фосфолипидных бислоев при комнатной температуре. Показано, что в субтерагерцовом диапазоне проявляется релаксационный отклик, спектральная форма которого соответствует широкому распределению времени релаксации в пикосекундном диапазоне. Спектральная восприимчивость релаксационного отклика описывается степенной функцией с показателем степени 0.25, одинакова для гелевой и флюидной фаз фосфолипидных бислоев, и не зависит от степени насыщенности углеводородных хвостов различных фосфолипидов. Субтерагерцовый релаксационный отклик может рассматриваться как элементарный акт релаксации, предшествующий более медленным релаксационным движениям, таким как латеральная диффузия, изменения толщины или кривизны фосфолипидного бислоя.

DOI: 10.31857/S0370274X24090243, EDN: HXGHDF

Введение. Самая быстрая релаксация, связанная со смещениями атомов в конденсированных средах, находится в пикосекундном диапазоне. Эта релаксация проявляется в спектральном диапазоне 1–1000 ГГц и может рассматриваться как прекурсор для более медленных релаксационных движений. В случае стеклующихся материалов за этой релаксацией закрепился термин "быстрая релаксация" (fast relaxation) в отличие от структурной релаксации (α relaxation) и некоторых других типов релаксационного отклика. Имеется внушительный набор данных по характеризации быстрой релаксации в стеклующихся материалах и ее взаимосвязи со структурной релаксацией [1–6]. Одним из наиболее доступных методов изучения быстрой релаксации является спектроскопия неупругого рассеяния света с применением решеточных и интерферометрических спектрометров [1, 7, 8]. Наиболее характерной чертой быстрой релаксации является широкое распределение времен релаксации, часто приводящее к степенной зависимости для спектральной восприимчивости

$$\chi''_{LS}(\nu) \propto \nu^{\beta}, \quad (1)$$

где ν – частота, а $0 < \beta \leq 1$. Обзор известного набора экспериментальных данных для быстрой релаксации в стеклующихся материалах, полученных методом неупругого рассеяния света, представлен в [9].

Молекулярные бислои, формирующиеся из фосфолипидов в присутствие воды, активно изучаются различными экспериментальными методами, так как представляют собой основу биологических мембран, а также имеют высокий потенциал применений в медицине как средства доставки лекарственных средств и как объект анализа при изучении экзосом [10–13]. С другой стороны, фосфолипидные бислои представляют собой уникальный физический объект, в котором относительно подвижные и конформационно гибкие молекулы собраны в молекулярный бислой, сочетая свойства трансляционно упорядоченной и неупорядоченной конденсированной среды, имеющей черты двумерного материала [14]. Неясно – как особенности структурной организации фосфолипидных слоев отражаются на их гигагерцовом и терагерцовом отклике, как этот отклик связан с параметрами слоев, их стабильностью, фазовым состоянием, характером взаимодействия с лекарственными и другими молекулами.

Ранее, используя спектроскопию низкочастотного комбинационного рассеяния света (КРС), нами было показано, что в диапазоне 1–6 ТГц спектров водных суспензий фосфолипидных везикул проявляются акустоподобные колебательные состояния [15]. Эти акустические моды проявляются в спектре неупругого рассеяния света из-за нарушения правила отбора по волновому вектору аналогично так называемому бозонному пику в случае стеклующихся материалов или спектру TA мод в кристаллах с на-

[1)]e-mail: snv@iae.nsk.su

рушением кристаллического порядка [16]. Поведение терагерцовых спектров КРС от фосфолипидных бислоев разумно согласуется с ожиданиями от кривых дисперсий, полученных методами неупругого рассеяния нейтронов [17] или синхротронного излучения [18]. Спектры низкочастотного КСР несколько отличаются для упорядоченного (гелевого) и неупорядоченного (флюидного) фазовых состояний фосфолипидного бислоя, что открывает перспективы использования низкочастотного КРС для задач определения сосуществующих латеральных доменов [19]. Неожиданной особенностью низкочастотных спектров КРС в работах [15, 19] оказался пик в спектре восприимчивости в районе 0.3 ТГц, который не показывал разумной концентрационной зависимости в двухкомпонентных везикулах. Кроме того, авторам [15, 19] не удалось получить достоверную информацию о спектре фосфолипидных бислоев для частот ниже 0.3 ТГц. По-видимому, неопределенность в спектрах была связана с необходимостью вычитания заметного вклада от воды в случае водных суспензий.

С другой стороны, поляризумость воды для терагерцовых отстроек в спектре КРС заметно меньше, чем у молекул фосфолипида, и если бы фосфолипидные слои содержали только гидратирующую воду между бислоями, то ее вкладом можно было бы пренебречь. Такую ситуацию можно реализовать с помощью гидратации фосфолипидных бислоев через насыщенный водяной пар. Более того, использование планарных образцов позволило бы определить поляризационные свойства терагерцовых спектров КРС. Эта идея была реализована в настоящей работе по низкочастотному КРС от гидратированных планарных образцов фосфолипидных бислоев.

Образцы и экспериментальная техника. Было исследовано четыре различных фосфолипида, включающих DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) и DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) с насыщенными углеводородными хвостами длиной 16 и 14 углеродов соответственно; POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine), один из углеводородных хвостов содержит двойную (ненасыщенную) связь, и DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), у которого оба углеводородных хвоста содержат ненасыщенную связь. Эти фосфолипиды отличаются температурой перехода гель-флюид и при комнатной (298 K) температуре DMPC, POPC, DOPC находятся во флюидном фазовом состоянии, а DPPC находится в гелевом состоянии. Планарные образцы фосфолипидных слоев были приготовлены методом осаждения из суспензии однослойных везикул микронного размера на тонкие (170 мкм) подложки силикатного стекла, как описано в [20]. Толщина осажденного фосфолипидного материала составляла несколько микрон. Для спектроскопических экспериментов образцы помещались в герметичную камеру со 100 % влажностью, наполненную аргоном, полная гидратация образцов была проверена по температуре перехода гель–флюид.

Эксперименты по низкочастотному КРС проводились в так называемой геометрии 90A, когда возбуждающий лазерный луч проходит через образец, рассеянный свет собирается под прямым углом, а плоскость тонкого образца делит этот прямой угол пополам. Длина волны лазера 532 нм, регистрация спектров КРС использовала трехрешеточный спектрометр с многоканальной камерой, методика регистрации низкочастотных спектров в целом была аналогична работе [21], но добавлена вертикальная диафрагма 150 мкм на входной щели спектрометра, позволяющая существенно подавлять вклад от подложки. Для вычитания оставшегося вклада силикатной подложки спектры подложек были независимо измерены. В работе использовались вращатели поляризации и поляризационные анализаторы, позволившие исследовать чувствительность спектров к различным поляризационным условиям. Для представления данных в виде восприимчивости для неупругого рассеяния света $\chi''_{LS}(\nu)$ спектры КРС образцов фосфолипидов $I(\nu)$ были поделены на фактор Бозе–Эйнштейна $n(\nu, T)$,

$$\chi''_{LS}(\nu) = \frac{I(\nu)}{n(\nu, T) + 1}.$$

Экспериментальные результаты и обсуждение. На рисунке 1 представлены спектры КРС гидратированных планарных мембран DOPC для трех поляризационных геометрий: VV, VH и HH, где V и H соответственно обозначают вертикальную и горизонтальную поляризации относительно плоскости рассеяния. Спектры нормированы на величину максимума в $\chi''_{LS}(\nu)$. Видно, что форма спектра одинакова для всех поляризационных геометрий. Это означает, что в смещениях атомов, дающих вклад в спектр, доминирует поперечный или ориентационный тип движения. На рисунке 1 представлено также сравнение с низкочастотным спектром DOPC, полученным для суспензии везикул в работе [19]. Видно в целом хорошее согласие за исключением отсутствия моды на 0.3 ТГц, названной “слоевой модой” в [19].

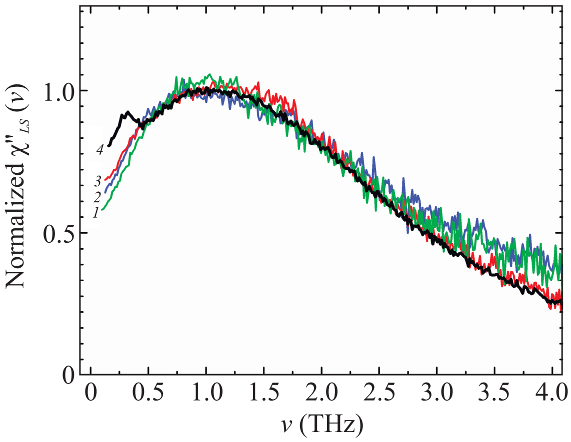

Рис. 1. (Цветной онлайн) Спектры КРС в представлении восприимчивости от гидратированного планарного DOPC для поляризационных геометрий VH (*1*), VV (*2*) и HH (*3*). *4* – спектр DOPC для суспензии везикул из работы [19]

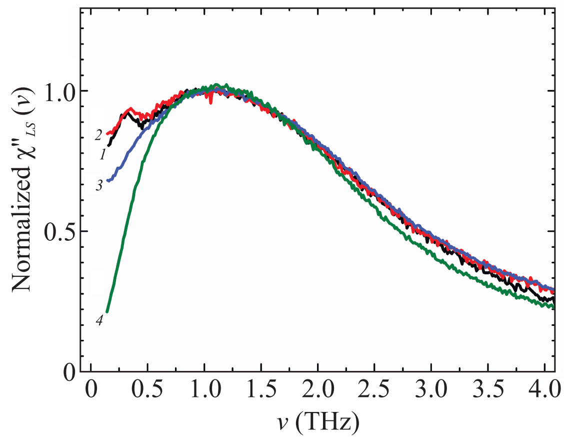

Рис. 2. (Цветной онлайн) Спектры КРС в представлении восприимчивости: *1* – суспензия везикул DOPC; *2* – 100 мкм образец суспензии везикул DOPC; *3* – слой везикул DOPC гидратированных 100 % влажностью; *4* – спектр полиизопрена при 200 K из работы [22], сжатый по оси частот с коэффициентом 0.94

Для выяснения природы слоевой моды были проведены дополнительные исследования, часть результатов которых представлена на рис. 2. Видно, что проявление слоевой моды в спектре КРС не зависит от планарности образца, а зависит от наличия избытка воды по сравнению с водой, гидратирующей фосфолипидный слой. Считается, что отношение межслоевой воды к массе фосфолипида одинакова для суспензий многослойных везикул и фосфолипидных планарных слоев в условиях 100 % влажности [14]. Отметим, что для суспензии везикул на рис. 2 вклад объемной воды был вычтен, как описано в [19], и что спектр объемной воды не содержит этого пика. Предложено объяснение, что слоевая мода запрещена правилами отбора в КРС, которые частично нарушаются изгибными модами фосфолипидного слоя, высвобождаемыми при избытке воды.

Отсутствие вклада слоевой моды в случае планарных образцов дает уникальную возможность изучить область ниже 0.5 ТГц, в которой ожидается доминирование релаксационного вклада. Сравнение с характерными колебательными спектрами стеклующихся материалов показывает, что на частотах выше 0.5 ТГц спектр фосфолипида похож на спектр бозонного пика, который определяется локализованными акустоподобными колебательными модами (на рис. 2 показано сравнение со спектром полиизопрена при 200 K, когда вкладом быстрой релаксации можно пренебречь [22], для наглядности спектр полиизопрена сжат по оси частот с коэффициентом 0.94). Отметим, что в условиях полной гидратации и при температурах выше 0 °C не проявляются моды, которые хорошо соответствуют собственным колебаниям фосфолипидного слоя как целого, наблюдаемых в предыдущих работах [21, 23, 24].

Отклонение кривой *3* на рис. 2 от ожидания для бозонного пика при частотах ниже 0.5 ТГц свидетельствует о преобладании релаксационного вклада в этой области.

На рисунке 3 проведено сравнение низкочастотного спектра КРС для различных фосфолипидов, исследованных в настоящей работе. Спектры на рис. 3 нормированы на максимум $\chi''_{LS}(\nu)$ и представлены в двойном логарифмическом масштабе. Видно, что низкочастотные спектры совпадают для различных фосфолипидов во флюидной фазе, несмотря на различия в насыщенности углеводородных хвостов и ожидаемыми несоответствиями в статистике различных конформационных состояний.

Двойной логарифмический масштаб, использованный на рис. 3, позволяет визуализировать, что на частотах ниже 0.6 ТГц релаксационный вклад хорошо описывается степенной функцией с показателем степени существенно меньше единицы. Следовательно, релаксационный отклик в субтерагерцовом диапазоне определяется очень широким распределением времен релаксации.

Степенная функция с той же степенью 0.25 разумно описывает и низкочастотную часть спектра DPPC, находящегося в гелевой фазе (рис. 3). Различие в амплитуде по сравнению с флюидными фазами может быть отнесено к выбранному способу нормировки, который чувствителен к изменению колеба-

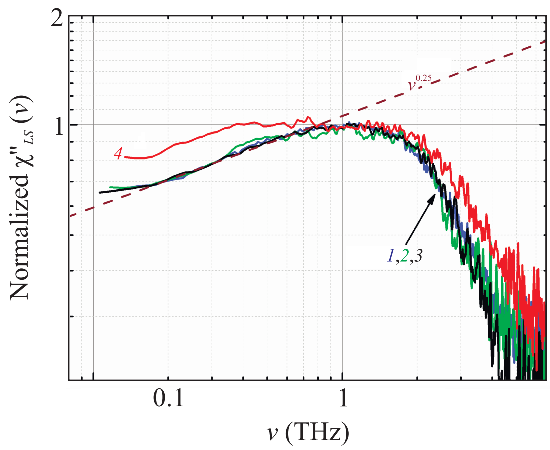

Рис. 3. (Цветной онлайн) Спектры КРС в представлении восприимчивости от гидратированных планарных фосфолипидов: *1* – DOPC; *2* – POPC; *3* – DMPC; *4* – DPPC. Штриховая линия – функция $\nu^{0.25}$

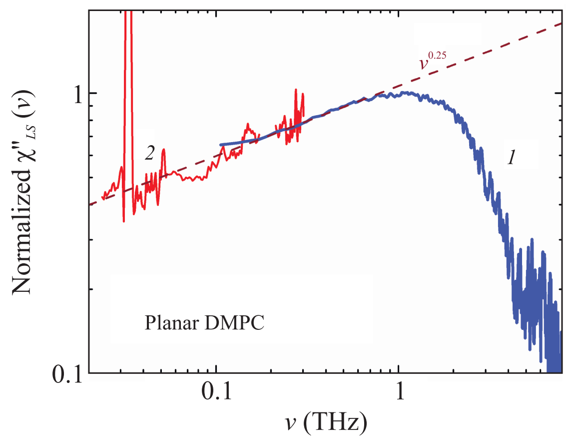

Рис. 4. (Цветной онлайн) Спектры неупругого рассеяния в представлении восприимчивости от гидратированных планарных бислоев DMPC: *1* – спектр решеточного спектрометра; *2* – спектр тандема интерферометров Фабри–Перо. Штриховая линия – функция $\nu^{0.25}$

тельного спектра в более упорядоченной гелевой фазе по сравнению со случаем флюидной фазы [19].

Представляется интересным рассмотреть поведение релаксационного отклика гидратированных фосфолипидных бислоев для более низких частот. Экспериментально это требует применение многопроходного интерферометра Фабри–Перо, который измеряет сигнал в одноканальном режиме, что делает затруднительным накопление сигнала для тонких фосфолипидных образцов. Второй проблемой является необходимость подавления вклада от линий Мандельштама–Бриллюэна. Тем не менее, используя шестипроходной тандем интерферометров Фабри–Перо, очень длительные времена накопления (несколько десятков часов на один спектр) и объединение данных от спектров с разным значением области свободной дисперсии, мы смогли получить достоверный спектр от гидратированных бислоев DMPC для рассеяния с поворотом поляризации, позволяющим максимально подавить вклады от пиков продольных фононов. На рисунке 4 изображены спектры от решеточного спектрометра и от тандема интерферометров Фабри–Перо. Острый пик возле 30 ГГц соответствует остаточному вкладу от акустического фонона стеклянной подложки. Рисунок 4 позволяет оценить, что степенная функция $\nu^{0.25}$ описывает релаксационный спектр в диапазоне от 600 ГГц и до частот порядка 20 ГГц.

Рассматриваемые в предыдущих работах релаксационные движения фосфолипидных бислоев включают латеральную подвижность молекул, изгибы и протрузии слоев, флуктуации толщины бислоя, вращения и качания молекул как целого [25–27]. Считается, что эти движения происходят в нано- и микросекундном временных диапазонах. Быстрая релаксация, обнаруженная в настоящей работе в диапазоне 20–600 ГГц, определяется быстрыми движениями (из условия максимума восприимчивости для экспоненциальной релаксации $2\pi\nu\tau = 1$, 1 нс соответствует 0.16 ГГц). По аналогии с быстрой релаксацией в стеклующихся материалах, эти движения могут быть связаны с релаксацией от акустоподобных мод поперечного типа. Можно предположить, что в случае фосфолипидов ангармоничность потенциала либрационных движений для конформации углеводородного хвоста определяет эту релаксацию. Как более быстрая, субтерагерцовая релаксация предшествует более медленным релаксациям и взаимодействует с ними. Интересно отметить, что методы молекулярной динамики предсказывают неэкспоненциальное затухание релаксационного отклика, начиная с 0.1 пс [28], что согласуется с нашим выводом о широком распределении времен релаксации.

Заключение. В спектрах неупругого рассеяния гидратированных планарных фосфолипидных бислоев обнаружен релаксационный вклад, который преобладает на частотах ниже 0.6 ТГц. Наблюдаемый вклад для фосфолипидных бислоев может рассматриваться как аналог быстрой релаксации в стеклующихся материалах. Этот релаксационный отклик соответствует широкому распределению времен релаксации и в представлении восприимчивости описывается степенной функцией с показателем степени 0.25 по крайней мере до частот порядка 20 ГГц. Релаксационный спектр фосфолипидных бислоев имеет похожую спектральную форму для гелевой и флюидной фазы. Субтерагерцовая релаксация является самой короткой в фосфолипидных слоях, она предшествует более медленным релаксационным движениям, связанными с латеральной диффузией, изменениями толщины или кривизны фосфолипидного бислоя.

Финансирование работы. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект # 23-22-00221).

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

1. G. Li, W. M. Du, X. K. Chen, H. Z. Cummins, and N. J. Tao, Phys. Rev. A **45**(6), 3867 (1992).
2. E. Rössler, V. N. Novikov, and A. P. Sokolov, Phase Transit. **63**(1–4), 201 (1997).
3. K. L. Ngai, J. Phys. Condens. Matter **12**(29), 6437 (2000).
4. N. Petzold, B. Schmidtke, R. Kahlau, D. Bock, R. Meier, B. Micko, D. Kruk, and E. A. Rossler, J. Chem. Phys. **138**, 12A510 (2013).
5. L. Zella, J. Moon, D. Keffer, and T. Egami, Acta Mater. **239**, 118254 (2022).
6. Q. Wang, J. J. Liu, Y. F. Ye, T. T. Liu, S. Wang, C. T. Liu, J. Lu, and Y. Yang, Mater. Today **20**(6), 293 (2017).
7. A. Brodin, L. Börjesson, D. Engberg, L. M. Torell, and A. P. Sokolov, Phys. Rev. B **53**(17), 11511 (1996).
8. N. V. Surovtsev, J. A. H. Wiedersich, V. N. Novikov, E. Rossler, and A. P. Sokolov, Phys. Rev. B **58**(21), 14888 (1998).
9. S. V. Adichtchev, N. V. Surovtsev, J. Wiedersich, A. Brodin, V. N. Novikov, and E. A. Rossler, J. Non-Cryst. Solids **353**(16–17), 1491 (2007).
10. G. van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **9**(2), 112 (2008).
11. T. Yasuda, H. Tsuchikawa, M. Murata, and N. Matsumori, Biophys. J. **108**(10), 2502 (2015).
12. G. van Niel, G. d'Angelo, and G. Raposo, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **19**(4), 213 (2018).
13. N. Marasini, K. A. Ghaffar, M. Skwarczynski, and I. Toth, in *Micro and Nanotechnology in vaccine Development*, ed. by M. Skwarczynski and I. Toth, William Andrew Publishing, Amsterdam (2017), p. 221.
14. J. F. Nagle and S. Tristram-Nagle, Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembr. **1469**(3), 159 (2000).
15. N. V. Surovtsev and S. V. Adichtchev, J. Raman Spectrosc. **51**(6), 952 (2020).
16. J. Jäckle, in *Amorphous Solids: Low-Temperature Properties*, ed. by W. A. Phillips, Springer-Verlag, Berlin (1981), p. 135.
17. M. C. Rheinstadter, C. Ollinger, G. Fragneto, F. Demmel, and T. Salditt, Phys. Rev. Lett. **93**(10), 108107 (2004).
18. T. M. Weiss, P. J. Chen, H. Sinn, E. E. Alp, S. H. Chen, and H. W. Huang, Biophys. J. **84**(6), 3767 (2003).
19. N. V. Surovtsev and S. V. Adichtchev, Phys. Rev. E **104**, 054406 (2021).
20. E. A. Dobrynina, V. A. Zykova, and N. V. Surovtsev, Chem. Phys. Lipids **256**, 105335 (2023).
21. D. V. Leonov, S. V. Adichtchev, S. A. Dzuba, and N. V. Surovtsev, Phys. Rev. E **99**, 022417 (2019).
22. H. Svajdlenkova, O. Sausa, S. V. Adichtchev, N. V. Surovtsev, V. N. Novikov, and J. Bartos, Polymers **13**(2), 294 (2021).
23. E. Jürgens, J. Geurts, W. Richter, and E. Sackmann, J. Chem. Phys. **84**, 3726 (1986).
24. N. V. Surovtsev, A. A. Dmitriev, and S. A. Dzuba, Phys. Rev. E **95**, 032412 (2017).
25. S. Gupta, J. U. De Mel, and G. J. Schneider, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. **42**, 121 (2019).
26. L. Lautner, K. Pluhackova, N. K. H. Barth, T. Seydel, W. Lohstroh, R. A. Bockmann, and T. Unruh, Chem. Phys. Lipids **206**, 28 (2017).
27. V. K. Sharma and E. Mamontov, Prog. Lipid Res. **87**, 101179 (2022).
28. E. Lindhal and O. Edholm, J. Chem. Phys. **115**, 4938 (2001).