

УДК 539.23, 529.266

Волков Ю.О., Асадчиков В.Е., Рошин Б.С., Нуждин А.Д., Тихонов А.М.

**ДИНАМИКА СТРУКТУРЫ ЛАМЕЛЛЯРНЫХ МУЛЬТИСЛОЁВ ФОСФОЛИПИДОВ НА ЖИДКОСТИ ПО ДАННЫМ СИНХРОТРОННОЙ РЕНТГЕНОВСКОЙ РЕФЛЕКТОМЕТРИИ**Волков Юрий Олегович<sup>1</sup> — старший научный сотрудник; volkov.y@crys.ras.ruАсадчиков Виктор Евгеньевич<sup>1</sup> — и.о. главного научного сотрудника, заведующий лабораторией;Рошин Борис Сергеевич<sup>1</sup> — старший научный сотрудник;Нуждин Александр Дмитриевич<sup>1</sup> — научный сотрудник;<sup>1</sup> ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН,

Россия, Москва, 119333, Ленинский проспект, дом 57.

Тихонов Алексей Михайлович<sup>2</sup> — ведущий научный сотрудник;<sup>2</sup> Институт Физических Проблем им. П.Л. Капицы РАН,

Россия, Москва, 119334, ул. Косыгина, 2.

*В статье рассмотрено изменение структуры упорядоченных многослойных ламеллярных плёнок фосфолипидов дистеаройл-фосфатидилхолина и димиристойл-фосфатидилсерина, сформированных на поверхности коллоидного раствора кремнезёма, в ходе термотропного фазового перехода плавления, по данным рентгеновской рефлектометрии на синхротронном источнике.*

*Ключевые слова: многослойные структуры, органические пленки, рентгеновская рефлектометрия*

**STRUCTURAL DYNAMICS OF LAMELLAR MULTILAYERS OF PHOSPHOLIPIDS ON A LIQUID BY SYNCHROTRON X-RAY REFLECTOMETRY DATA**Volkov Y.O.<sup>1</sup>, Asadchikov V.E.<sup>1</sup>, Roshchin B.S.<sup>1</sup>, Nuzhdin A.D.<sup>1</sup>, Tikhonov A.M.<sup>2</sup><sup>1</sup> FSRC "Crystallography and photonics" RAS, Moscow, Russian Federation<sup>2</sup> P.L. Kapitza Institute for Physical Problems RAS, Moscow, Russian Federation

*The article discusses structural changes in ordered multilayer lamellar films of phospholipids distearoyl-phosphatidylcholine and dimyristoyl-phosphatidylserine, formed on a surface of colloidal silica solution, during thermotropic melting phase transition, according to data obtained with synchrotron X-ray reflectometry.*

*Key words: multilayer structures, organic films, X-ray reflectometry*

**Введение**

Фосфолипидные бислои в жидкой среде представляют собой простейшую модель биологической мембраны для биофизических исследований. Однако проблема характеристики таких структур осложняется свойством липидов формировать в водных средах макроскопические трёхмерные агрегаты — мицеллы и липосомы. Ввиду этого плоские образцы липидных слоёв, как правило, формируются на твердотельных подложках либо методом Ленгмюра-Блоджетт, либо конденсацией липосом [1].

Ранее было показано [2], что на поверхности коллоидных водных растворов наночастиц оксида кремния (кремнезольей) благодаря уникальным граничным условиям (градиенту поверхностного потенциала) возможно формировать макроскопически плоские упорядоченные слои фосфолипидов. В частности, геометрические параметры таких структур (толщину и количество бислоев) можно изменять, варьируя рН жидкой субфазы. В свою очередь, неразрушающие поверхностно-чувствительные методы, основанные на отражении и рассеянии рентгеновского излучения в скользящем падении, позволяют получить информацию о строении макроскопических плёнок (в том числе жидкофазных) с пространственным разрешением до единиц ангстрем [3].

В настоящей работе было исследовано термотропное поведение ламеллярных мультислоёв фосфолипидов 1,2-дистеаройл-*sn*-глицеро-3-фосфохолина C<sub>44</sub>H<sub>88</sub>NO<sub>8</sub>P (DSPC) и 1,2-димиристойл-*sn*-глицеро-3-фосфо-L-серина C<sub>34</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>10</sub>PNa (DMPS), сформированных на поверхности кремнезоля 5-нм наночастиц SiO<sub>2</sub>. Оба липида при повышении температуры выше критического значения T<sub>c</sub> = 55°C и 37°C соответственно претерпевают фазовый переход плавления, с переходом структуры в объёме в жидкое состояние [4]. Информация о распределении плотности образцов по глубине была получена методом рентгеновской рефлектометрии — измерением коэффициента зеркального отражения при различных углах скольжения. Информация о поверхностной упаковке липидных молекул была получена методом скользящей дифракции — измерением интенсивности рассеянного излучения в азимутальной плоскости при фиксированном угле падения.

**Материалы и методы**

Образцы липидных плёнок приготавливались капельным методом во фторопластовой тарелке диаметром 100 мм, размещённой в герметизируемом одноступенчатом термостате [5] с точностью по температуре в пределах 0.5°C. Раствор липида в хлороформе (Avanti Polar Lipids) наносился

калиброванным шприцом на поверхность кремнезоля (Ludox, диаметр наночастиц ~5 нм, объёмная концентрация ~16%, pH ~ 9.5). После приготовления образец выдерживался при температуре 23°C в течение часа для стабилизации исходной плёнки. Последующие измерения проводились в интервале температур от 23°C до 60°C.

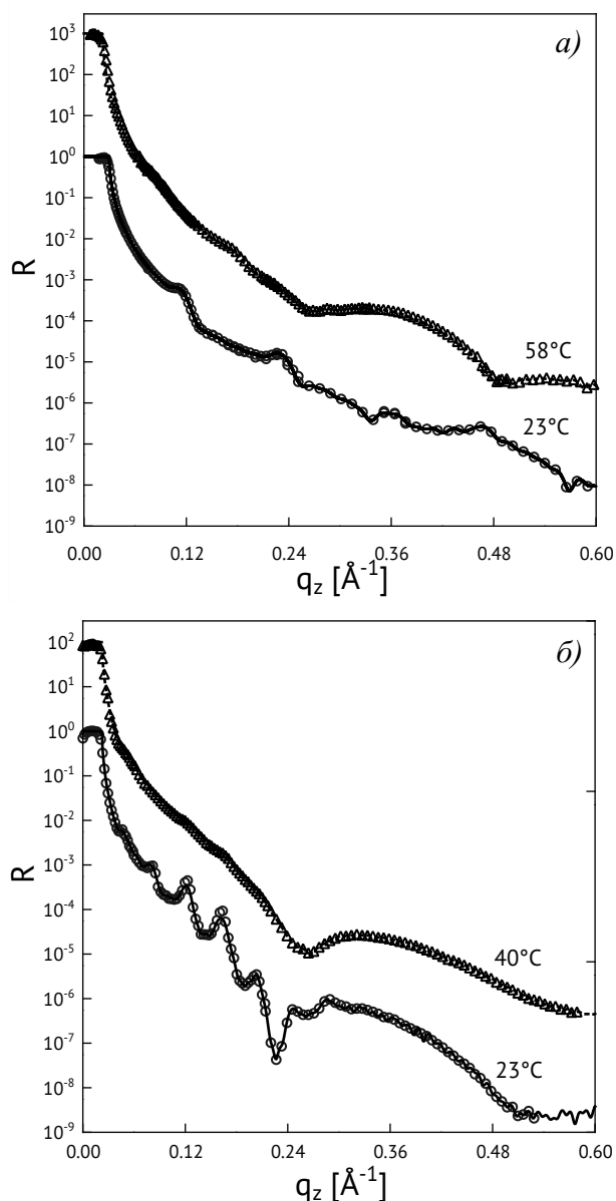


Рис.1. Экспериментальные (точки) и расчётные (линии) кривые отражения, измеренные для мультислоёв фосфолипида DSPC (а) и DMPS (б) при температурах выше и ниже точки плавления. Для ясности кривые смещены по вертикали.

Рентгеновские измерения проводились на станции ID31 синхротрона ESRF [6] при энергии фотонов 71 кэВ (длина волны  $\lambda \approx 0.175 \text{\AA}$ ). Пучок сечением 10x250 мкм обеспечивал интегральную интенсивность  $I_0 \sim 10^{10}$  имп/с. Экспериментальные зависимости коэффициента отражения  $R = I_{\text{exp}}/I_0$  от волнового вектора рассеяния  $q_z = 4\pi \sin\alpha/\lambda$  (где  $\alpha = \beta$  — углы скольжения и отражения), полученные при температурах ниже и выше критической температуры плавления  $T_c$ , представлены на Рис. 1.

Анализ экспериментальных данных и расчёт распределений плотности по глубине проводились в рамках модельно-независимого подхода [7], основанного на экстраполяции асимптотики угловой зависимости отражения в область больших  $q_z$ . Ключевое преимущество подхода заключено в том, что он не требует априорных предположений о внутренней структуре образца и позволяет извлечь распределение плотности по глубине  $\rho(z)$  непосредственно. Рассчитанные распределения плотности приведены на Рис. 2. Далее для оценки количественных структурных параметров профили  $\rho(z)$  были аппроксимированы стандартными структурными моделями липидного бислоя [2]. Полученные параметры приведены в Табл. 1.

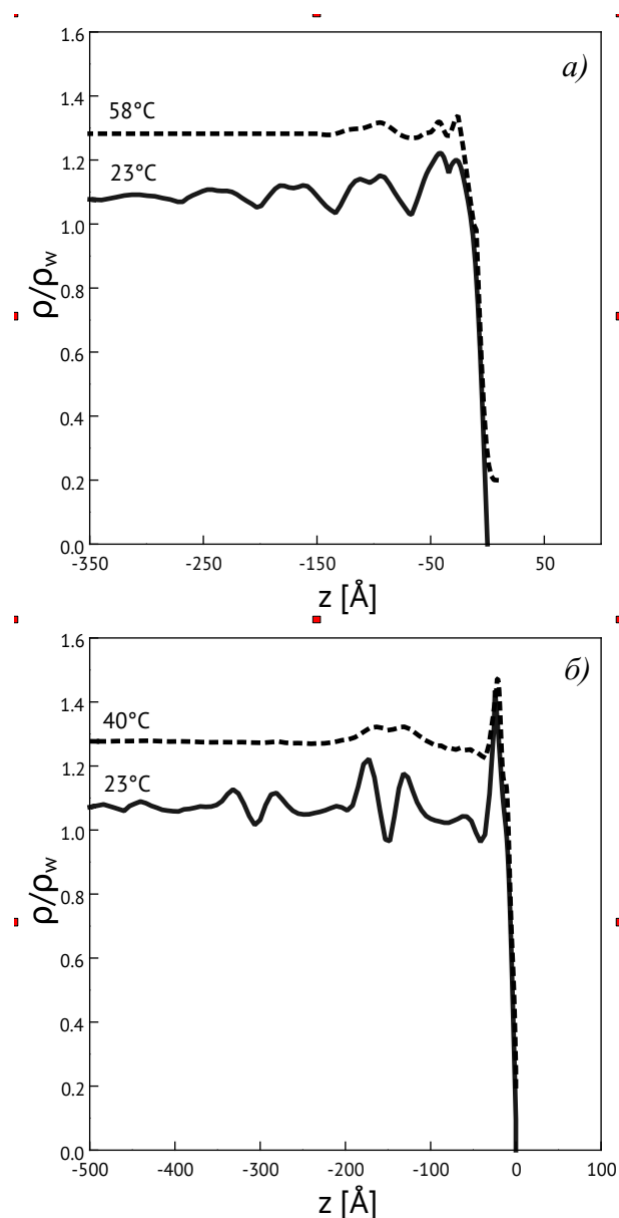


Рис. 2. Распределения плотности по глубине, нормированные на табличную электронную плотность воды  $\rho_w = 0.333 \text{\AA}^{-3}$ , рассчитанные по данным рефлектотрии для мультислоёв фосфолипида DSPC (а) и DMPS (б) при температурах выше и ниже точки плавления. Для ясности кривые смещены по вертикали на 0.2.

Таблица 1. Оценочные структурные параметры липидных слоёв

липид	T	$L_h, \text{Å}$	$\rho_h/\rho_w$	$L_t, \text{Å}$	$\rho_t/\rho_w$	$\sigma_{\text{eff}}, \text{Å}$	$A, \text{Å}^2$	$\Gamma_{\text{H}_2\text{O}}$
DSPC	23°C	15.3	1.38	10.5	1.01	3.6	41.6	2±1
	58°C	9.1	1.12	17.5	0.97	5.2	—	3±2
DMPS	23°C	11.6	1.53	14.7	1.03	3.8	40.8	5±1
	40°C	12.8	1.27	12.1	0.92	>10	—	14±1

### Результаты и обсуждение

Как следует из полученных распределений плотности, при нормальных условиях ( $T < T_c$ ) плёнки обоих липидов формируют упорядоченный мультислой, состоящий из совокупности ламеллярных бислоёв. Отметим, что липид DSPC формирует достаточно плотную периодическую структуру, в то время как в плёнке липида DMPS бислои, по-видимому, отделены друг от друга прослойками несвязанной воды. Такое качественное различие потенциально значимо для моделирования липидных мембран и требует более тщательного изучения. Также на поверхности плёнки DMPS, по-видимому, присутствует дополнительный упорядоченный монослой, аналогичный ленгмюровскому. Оценочное значение площади на молекулу липида  $A$  по данным скользящей дифракции составляет  $41.6 \text{ Å}^2$  для липида DSPC и  $40.8 \text{ Å}^2$  для липида DMPS, что соответствует известным в литературе значениям для жидкокристаллической ленгмюровской фазы; в сочетании с оценочными структурными параметрами это указывает на высокую упорядоченность молекул липида в мультислоях. При этом характерная степень гидратации  $\Gamma$  (число молекул воды в пересчёте на каждую молекулу липида, аккумулированных непосредственно в объёме бислоя) составляет  $\sim 2$  для плёнки DSPC и  $\sim 5$  для плёнки DMPS.

При температуре  $T > T_c$  в результате плавления заметно существенное сокращение плотности в приповерхностном липидном монослое и разрушение глубинных бислоёв. При этом оценочная структурная плотность полярных групп  $\rho_h$  в бислое существенно снижается, а параметр межслойной шероховатости  $\sigma_{\text{eff}}$  возрастает, что также свидетельствует о разупорядочении структуры. Отметим, что для липида DMPS оценочное значение  $\sigma_{\text{eff}}$  в жидкой фазе существенно превосходит физически допустимое по модели шероховатости капиллярных волн [8] при сохранении интегральной

плотности алифатических хвостов, что может быть объяснено дополнительной гидратацией молекул липида в жидкой фазе ( $\Gamma \sim 15$ ).

*Авторы выражают благодарность В. Хонкимаки (ESRF) за помощь в проведении экспериментов, а также И.В. Кожевникову (ФНИЦ КиФ РАН), Х. Райхерту (ESRF) и Ю.А. Ермакову (ИФХЭ РАН) за полезные обсуждения результатов работы. Эксперименты на станции ID31 проводились в рамках проектов ESRF SC4246 и SC4461.*

### Список литературы

1. Théato P.; Zentel R. Formation of Lipid Bilayers on a New Amphiphilic Polymer Support. // *Langmuir* - 2000 - V. 16 - P. 1801.
2. Тихонов А.М. Мультислой фосфолипидных мембран на гидрозольной подложке. // *Письма в ЖЭТФ* - 2010 - Т. 92 - С. 394.
3. Delcea M.; Helm C.A. X-ray and Neutron Reflectometry of Thin Films at Liquid Interfaces. // *Langmuir* - 2019 - Vol. 35 - P. 8519.
4. Small D.M. *The Physical Chemistry of Lipids*. NY: Plenum Press, 1986. — 672 pp.
5. Тихонов А.М. Термостатная камера для рентгеновских исследований тонкоплёночных структур на жидких подложках. // *Приборы и техника эксперимента* - 2021 - №1 - С. 146.
6. Honkimäki V.; Reichert H.; Okasinski J.S.; Dosch H. X-ray Optics for Liquid Surface/Interface Spectrometers. // *J. Synchrotron Radiation* - 2006 - V. 13 - P. 426.
7. Kozhevnikov I.V.; Peverini L.; Ziegler E. Development of a Self-consistent Free-form Approach for Studying the Three-dimensional Morphology of a Thin Film // *Physical Review B* - 2012 - V. 85 - Iss. 12 - P. 125439.
8. Braslau A.; Deutsch M.; Pershan P.S.; Weiss A.H.; Als-Nielsen J.; Bohr J. Surface Roughness of Water Measured by X-ray Reflectivity. // *Physical Review Letters* - 1985 - V. 54 - P. 114.