

УДК 53.084

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРИЕНТАЦИИ ФОСФОЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ В ПЛАНАРНЫХ СТРУКТУРАХ ПО СПЕКТРАМ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

© К. А. Окотруб¹, В. А. Зыкова¹, С. В. Адищев¹, Н. В. Суровцев^{1,2}

¹ *Институт автоматизации и электрометрии СО РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Коптюга, 1*

² *Новосибирский государственный университет,
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2
E-mail: lab21@iae.nsk.su*

Предложен метод определения ориентации фосфолипидных молекул в планарных структурах по спектрам неполяризованного комбинационного рассеяния света. Метод использует чувствительность интенсивности линий комбинационного рассеяния света на колебаниях групп CH_2 к ориентации молекул фосфолипида. Работоспособность метода проиллюстрирована на планарном образце насыщенного фосфолипида, приготовленном путём высушивания из раствора. Показано, что для анализа пространственного распределения ориентации молекул в образце удобно применять метод главных компонент.

Ключевые слова: комбинационное рассеяние света, фосфолипидный бислой, планарная структура, ориентация молекул.

DOI: 10.15372/AUT20190512

Введение. В водной среде фосфолипиды образуют бислой — тонкую (~ 5 нм) плоскую структуру, состоящую из двойного слоя фосфолипидных молекул, в котором гидрофильные части молекул соприкасаются с водой, а гидрофобные находятся внутри двойного слоя. Слои из фосфолипидных молекул являются основой мембранных структур биологических клеток. Изучение фосфолипидных слоёв различного состава позволяет смоделировать свойства биологических мембран, понять их фазовое поведение, изучить взаимодействие с другими молекулами (например, с лекарственными средствами или с генетическим материалом). Таким образом, исследование поведения фосфолипидных бислоёв в различных условиях является важной задачей современной биофизики. Один из наиболее распространённых подходов в этой области — использование в качестве исследуемого объекта многослойных планарных структур, состоящих из большого количества ориентированных фосфолипидных бислоёв. Такие планарные структуры обычно формируются на твёрдой подложке и могут достигать толщины десятков микрон.

Для формирования планарных фосфолипидных структур используются преимущественно два метода. Первый метод заключается в растворении фосфолипидов в органическом растворителе, нанесении капли раствора на твёрдую подложку и последующем испарении растворителя [1]. При условии благоприятных внешних факторов (влажность и температура окружающей среды, подходящая концентрация раствора и др.) в результате испарения растворителя происходит «самосборка» фосфолипидных бислоёв, ориентация молекул в которых задаётся свойствами твёрдой поверхности. Вторым методом формирования планарных структур состоит в осаждении везикул микронного и субмикронного размера из водной суспензии на твёрдую поверхность [2]. Возможность образования планарных фосфолипидных структур в ходе описанных протоколов была подтверждена структурными методами.

В настоящее время для экспериментальных исследований планарных фосфолипидных структур их синтез, как правило, проводится по одному из протоколов [3–5]. Однако очень часто полученная в результате синтеза структура не проверяется на соответствие упорядоченной упаковке бислоев. Это связано с тем, что применение в полном масштабе структурных методов (дифракционная картина синхротронного излучения) для определения порядка в синтезированных образцах требует больших экспериментальных затрат. При этом учёные, специализирующиеся на синтезе планарных структур, отмечают, что качество образцов сильно зависит от большого числа факторов, в том числе и трудно контролируемых [6]. Таким образом, неясно, насколько упорядоченными являются эти планарные структуры?

В работе [7] показано, что с помощью метода комбинационного рассеяния света (КРС) можно охарактеризовать конформационное и латеральное упорядочение фосфолипидных слоёв. Это позволяет определить порядок в расположении молекул и их фазовое состояние (гелевое или флюидное), но остаётся вопрос, как ориентированы молекулы относительно поверхности подложки?

В предлагаемой работе показано, что, используя спектры КРС в области полосы, соответствующей валентным колебательным модам групп CH_2 , можно получить информацию об ориентационном порядке молекул фосфолипидов. Идея исследования основана на работах [8, 9] по измерению спектров КРС в кристаллических образцах фосфолипидов. Из анализа спектров, представленных в этих работах, видно, что в случае когда векторы поляризации возбуждающего и рассеянного излучений параллельны оси молекулы фосфолипида, интенсивность линий, соответствующих симметричному и антисимметричному колебаниям группы CH_2 (при 2850 и 2880 см^{-1}), падает по сравнению с линиями CH вблизи 2935 и 2960 см^{-1} . Эти линии соответствуют валентным колебаниям групп CH_3 и CH_2 в полярной части молекулы, которые не должны зависеть от ориентации молекулы относительно векторов поляризации лазерного излучения [10, 11]. Таким образом, можно ожидать, что для случая обратного рассеяния в эксперименте по КРС (наиболее естественная геометрия для тонких образцов на твёрдой подложке) интенсивность линий колебаний группы CH_2 должна быть максимальной по отношению к модам групп CH_3 . Отклонение ориентации молекул фосфолипидов от нормали подложки должно приводить к уменьшению интенсивности линий колебаний CH_2 относительно линий колебаний CH_3 . В данной работе были приготовлены планарные образцы фосфолипида, содержащие дефектные области. В этих образцах измерялись неполяризованные спектры КРС (чтобы результаты не зависели от локальной потери оптического качества образца), пространственное распределение спектров анализировалось методом главных компонент (Principal Component Analysis, PCA), а изменяющаяся часть спектров сопоставлялась с дефектными областями.

Эксперимент. Планарные образцы насыщенного фосфатидилхолина DMPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) были приготовлены из раствора DMPC в изопропанолe с концентрацией 50 мг/мл . Для этого раствор капался на обезжиренную стеклянную подложку и высушивался в течение нескольких часов. Этот протокол приготовления планарных фосфолипидных образцов является одним из наиболее распространённых [6]. В результате формировался слой образца DMPC толщиной в несколько микрон.

Эксперимент по измерению спектров КРС в планарных образцах проводился на стенде, включающем в себя решёточный монохроматор SP2500i и микроскоп, модифицированный для измерения спектров КРС. Латеральное и продольное пространственные разрешения установки составляли 1 и 10 мкм соответственно. Спектральное разрешение составляло $2,5 \text{ см}^{-1}$. Спектры КРС в геометрии обратного рассеяния возбуждались твердотельным лазером с длиной волны $532,1 \text{ нм}$ (мощность лазерного пучка 15 мВт). Спектр рассеянного света измерялся без селекции по поляризации.

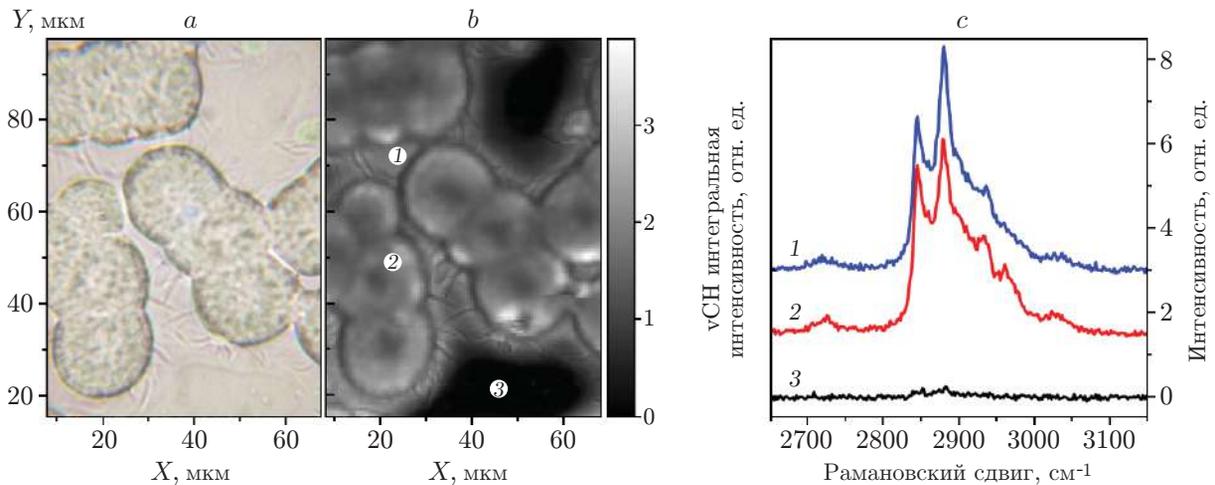


Рис. 1. Сравнение данных оптической микроскопии и КРС-картирования образца DMPC: *a* — изображение исследуемой области образца в оптическом микроскопе, *b* — распределение интегральной интенсивности КРС-полосы валентных колебаний СН, *c* — спектры КРС, соответствующие репрезентативным точкам 1, 2, 3 (*b*); спектры сдвинуты по вертикали для наглядности

Результаты и их обсуждение. Приготовленные планарные образцы были прозрачными и показывали высокое оптическое качество в тесте по поляризованному КРС (аналогично рис. 3 в [7]) при измерении в макроскопическом режиме. Однако наблюдение с помощью оптического микроскопа показало, что образец неоднороден (рис. 1, *a*). На приведённом снимке можно увидеть, что, помимо однородных областей, в образце присутствуют образования размером до 10 мкм, поверхность которых оптически неоднородна. Для более подробного анализа проведено картирование этой области, состоящее в поточечном измерении спектров КРС внутри представленной области с микронным шагом. Спектры КРС для областей, обозначенных на рис. 1, *b* кружками, показаны на рис. 1, *c*. На спектрах видны два острых пика, соответствующих симметричному и антисимметричному колебаниям группы CH_2 (при 2850 и 2880 см^{-1} соответственно), и спектральные особенности на более высоких частотах, которые включают в себя максимумы вблизи 2930 и 2960 см^{-1} , ассоциирующиеся с вкладом от валентных колебаний групп CH_3 [12]. На качественном уровне спектры от различных областей похожи, однако имеют существенно отличающуюся интенсивность (например, на рис. 1, *c* интенсивность линии 2850 см^{-1} в точке 1 на порядок превышает интенсивность этой линии в точке 3).

Различие в интенсивности спектров КРС связано с разной толщиной образца в локальных точках. Распределение фосфолипида по образцу можно визуализировать по интенсивности линий КРС в области СН-мод. Результат экспериментального исследования этого распределения показан на рис. 1, *b*. Видно, что неоднородности, заметные в оптическом изображении, соответствуют «скоплению» молекул фосфолипида. Условно будем называть эти скопления шарообразными дефектами. Между этими неоднородностями также могут располагаться области с интенсивным сигналом КРС от фосфолипида (точка 1 на рис. 1, *b*). Заметим, что шарообразные дефекты и липидный слой между ними демонстрируют приблизительно одинаковый уровень сигнала КРС. Это связано с тем, что при фокусировке лазерного излучения вглубь дефектов возникают aberrации, приводящие к снижению сигнала.

Шарообразный вид дефектов на рис. 1, *a*, *b* позволяет предположить, что они отображают зоны роста осаждённого материала из точки. Исходной точкой может служить

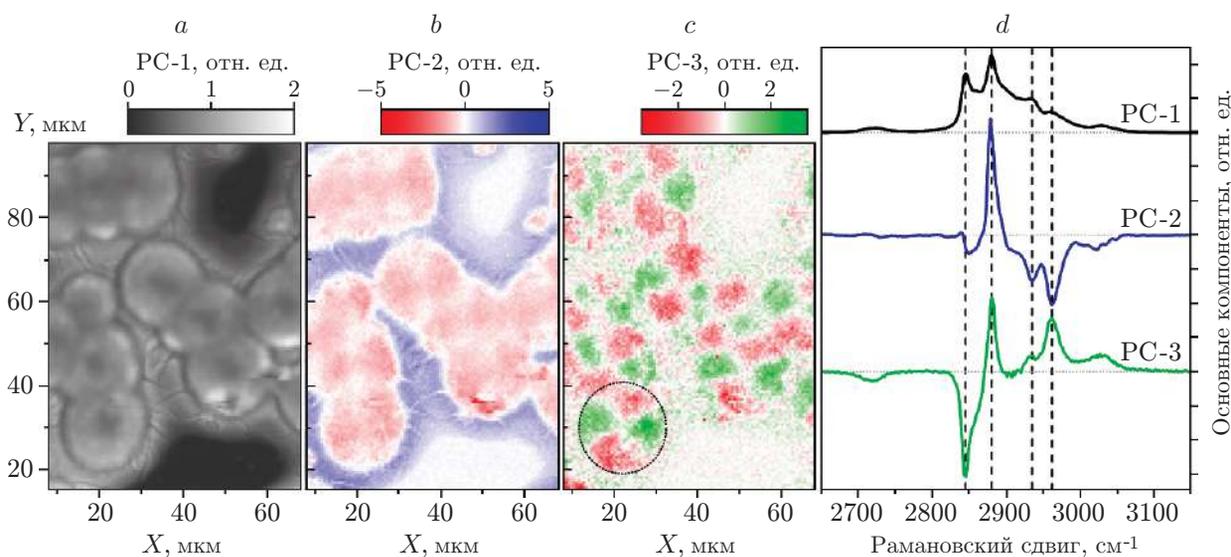


Рис. 2. Анализ данных КРС-картирования методом главных компонент. Пространственное распределение амплитуд первой (a), второй (b) и третьей (c) главных компонент, спектры первых трёх главных компонент (d); спектры сдвинуты по вертикали для наглядности

фосфолипидная везикула, рост которой энергетически должен быть более выгодным по сравнению с образованием плоского слоя. Можно ожидать, что дефекты нашего образца имеют существенное отклонение ориентации молекул фосфолипида относительно нормали к подложке. Детальная информация об этом получена из анализа данных методом PCA.

Метод PCA редуцирует размерность экспериментальных данных путём их представления в виде малоразмерного базиса ортогональных векторов (главных компонент), отражающих наиболее значимые вариации данных [13]. Результат PCA для массива экспериментальных спектров заключается в получении набора базисных спектров (главных компонент), при этом первая компонента соответствует среднему спектру КРС по всему набору данных. Следующие компоненты отражают отклонения отдельных спектров от среднего спектра, при этом они нумеруются по убыванию средней амплитуды отклонений. Каждый экспериментальный спектр представляется в виде линейной комбинации главных компонент с соответствующими амплитудами, и набор значений амплитуд является характеристикой спектра в рамках рассматриваемого набора данных. Кроме первой компоненты, амплитуды остальных компонент являются знакопеременными (т. е. разные спектры отклоняются от среднего спектра в разные стороны).

Результаты PCA-анализа показаны на рис. 2. Первая компонента PC-1 соответствует среднему значению спектра КРС (рис. 2, d), и её амплитуда в значительной мере отражает распределение фосфолипидов по образцу (см. рис. 1, a, b и 2, a). Вторая компонента PC-2 знакопеременная по спектру (см. рис. 2, d), при этом её амплитуда максимальна для шарообразных дефектов и областей между ними, но с противоположным знаком (рис. 2, b). Таким образом, именно вторая компонента отличает области визуальных дефектов и однородных областей. Значение амплитуды второй компоненты приближается к нулю для областей, в которых вклад фосфолипидов мал. Пространственное поведение третьей компоненты PC-3 более сложное. Эта компонента также знакопеременная (см. рис. 2, d), но внутри шарообразного дефекта её амплитуда образует кресты, направление которых связано с поляризацией возбуждающего лазерного излучения (рис. 2, c). Эти кресты напоминают коноскопическую картину для одноосных кристаллов при освещении вдоль полярной оси.

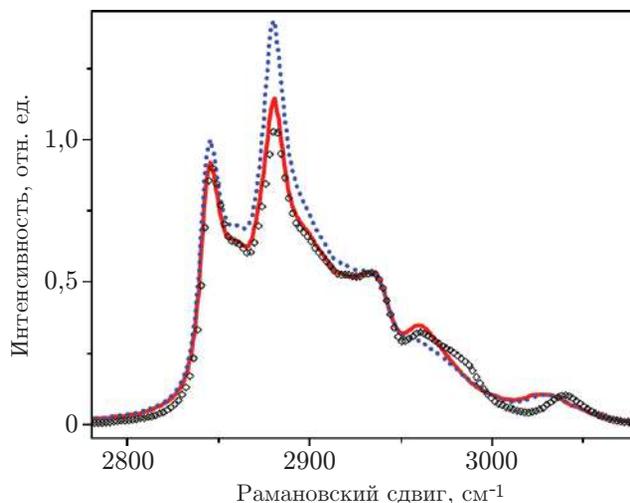


Рис. 3. Спектры КРС в областях, соответствующих различным амплитудам второй главной компоненты. Сплошная линия относится к шаровым дефектам, точечная — к областям между ними. Символами показан спектр КРС водной суспензии везикул DMPC

На рис. 3 показаны спектры КРС в областях, наиболее сильно отличающихся по второй компоненте при анализе PCA. Согласно рис. 2 эти области совпадают с шарообразными дефектами и областями между ними. На рис. 3 спектры КРС нормированы на интенсивность пиков, ассоциированных с вкладом от полярной части молекул. Видно, что в области дефектов интенсивность симметричной и антисимметричной мод от колебаний групп CH_2 ниже, чем в областях между дефектами. Используя спектры КРС, приведённые в работах [8, 9], можно сделать вывод, что ориентация молекул фосфолипида в шарообразных дефектах существенно отклоняется от направления нормали к твёрдой подложке. Этот вывод хорошо соответствует ожиданию и позволяет заключить, что по интенсивности линий КРС от колебаний групп CH_2 по сравнению с вкладом колебательных мод полярной части молекулы можно судить об ориентации молекул фосфолипида.

Для определения степени ориентационной разупорядоченности молекул фосфолипида в шаровых дефектах были измерены спектры КРС суспензий везикул DMPC, которые могут служить примером наибольшего ориентационного разупорядочения. Для этого образцы были приготовлены по методике, описанной в [14]. На рис. 3 спектры КРС суспензии сравнены со спектрами планарного образца в двух областях. Видно, что спектры КРС шарообразных дефектов близки к случаю изотропного распределения ориентаций молекул (хотя некоторый элемент планарного упорядочения у них сохраняется — интенсивность мод CH_2 в них выше, чем в суспензии).

На рис. 4, а изображены спектры КРС в областях, различающихся по амплитуде третьей компоненты PCA (см. рис. 2, с). Эти области находятся внутри шарообразных дефектов. Сравнение с поляризованными спектрами липидов в [7] наводит на мысль, что спектры отличаются по поляризационным условиям (мода симметричных колебаний проявляется только в поляризованном КРС, в то время как антисимметричная мода одинаково интенсивна и в поляризованном, и в деполаризованном КРС). Для прояснения ситуации были получены изображения области планарного образца DMPC в оптическом микроскопе в скрещённых поляризациях (рис. 4, б). Наблюдаемые особенности в виде крестов хорошо соответствуют коноскопической картине, когда необыкновенная оптическая ось образца перпендикулярна рассматриваемой плоскости. Это свидетельствует о том, что шарообразные дефекты имеют анизотропию в направлении, перпендикулярном к плоскости подлож-

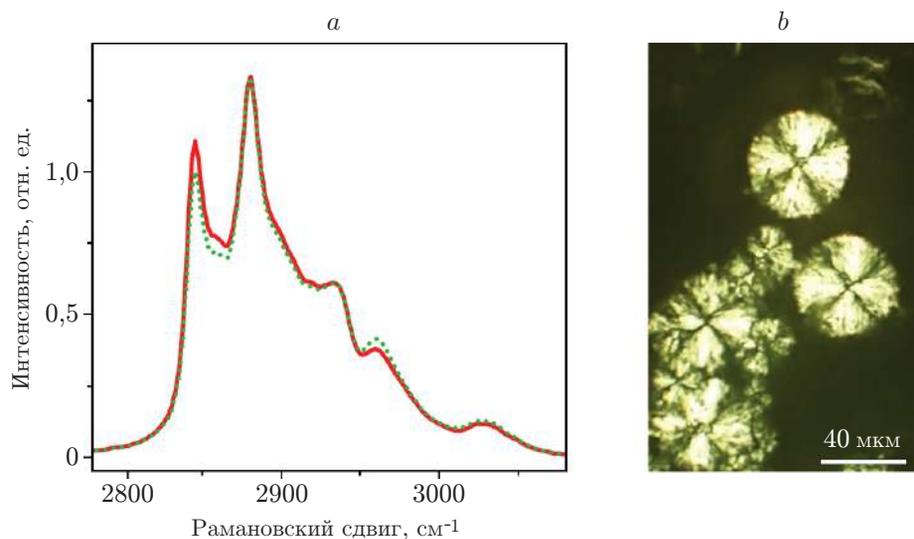


Рис. 4. Проявление оптической анизотропии в планарном образце DMPC: *a* — спектры КРС в областях, соответствующих различным амплитудам третьей главной компоненты (сплошная линия относится к спектру КРС с менее интенсивным поляризованным вкладом, точечная — с более интенсивным), *b* — изображение области планарного образца DMPC в оптическом микроскопе в скрещённых поляризациях

ки. Появление аналогичных крестов в распределении третьей компоненты в РСА связано с поворотом плоскости поляризации падающего излучения аналогично случаю наблюдения коноскопической картины. Из-за различия чувствительности спектрометра к поляризации света (параллельно или перпендикулярно входной щели) поворот плоскости поляризации даёт преимущество при регистрации либо поляризованного рассеяния, либо деполаризованного (области разных цветов на рис. 2, *c*). Таким образом, появление компоненты РСА вида, как на рис. 2, *c* (или подобных кривых при анализе разностных спектров), может рассматриваться как индикатор оптической анизотропии исследуемого планарного образца.

Заключение. В данной работе предложен метод определения ориентации фосфолипидных молекул в планарных структурах. Для его иллюстрации исследованы спектры неполяризованного КРС колебаний СН планарного образца насыщенного фосфолипида. Образец синтезирован методом высушивания раствора, широко применяемым в областях физики и химии липидов, и охарактеризован методом оптической спектроскопии. Неоднородности микронного размера в оптическом изображении сопоставлены со спектрами КРС. Показано, что по интенсивности линий КРС от колебаний групп CH_2 по сравнению с вкладом от мод полярной части молекулы можно судить об ориентации молекул фосфолипида. Для анализа пространственного распределения удобно применять метод главных компонент, при этом вторая компонента позволяет получать информацию о пространственном распределении ориентации молекул относительно нормали к твёрдой подложке.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-12-00127).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Tristram-Nagle S. A., Zhang R., Suter R. M. et al.** Measurement of chain tilt angle in fully hydrated bilayers of gel phase lecithins // *Biophys. Journ.* 1993. **64**, N 4. P. 1097–1109.

2. **Akesson A., Lind T., Ehrlich N. et al.** Composition and structure of mixed phospholipid supported bilayers formed by POPC and DPPC // *Soft Matter*. 2012. **8**, N 20. P. 5658–5665.
3. **Rheinstädter M. C., Ollinger C., Fragneto G. et al.** Collective dynamics of lipid membranes studied by inelastic neutron scattering // *Phys. Rev. Lett.* 2004. **93**, N 10. 108107.
4. **Tielrooij K. J., Paparo D., Piatkowski L. et al.** Dielectric relaxation dynamics of water in model membranes probed by terahertz spectroscopy // *Biophys. Journ.* 2009. **97**, N 9. P. 2484–2492.
5. **Wanderlingh U., D'Angelo G., Branca C. et al.** Multi-component modeling of quasielastic neutron scattering from phospholipid membranes // *Journ. Chem. Phys.* 2014. **140**, Is. 17. 174901.
6. **Tristram-Nagle S. A.** Preparation of oriented, fully hydrated lipid samples for structure determination using X-ray scattering // *Methods in Membrane Lipids. Methods in Molecular Biology*. 2007. **400**. P. 63–75.
7. **Адищев С. В., Дуда Т. А., Зайцева Ю. В. и др.** Спектр колебаний CH_2 как мера конформационного и латерального порядков в слоях жирных кислот и фосфолипидов // *Автометрия*. 2018. **54**, № 6. С. 12–20.
8. **Asher S. A., Stearns R. E., Urabe T., Pershan P. S.** Raman and X-ray studies of single crystals of dipalmitoylphosphatidylcholine // *Molecular Cryst. Liquid Cryst.* 1981. **63**, Is. 1. P. 193–203.
9. **Harrand M.** Polarized Raman spectra of oriented dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). I. Scattering activities of skeletal stretching and methylene vibrational of hydrocarbon chains // *Journ. Chem. Phys.* 1983. **79**, Is. 11. P. 5639–5651.
10. **Gaber B. P., Peticolas W. L.** On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta*. 1977. **465**, N 2. P. 260–274.
11. **Gaber B. P., Yager P., Peticolas W. L.** Deuterated phospholipids as nonperturbing components for Raman studies of biomembranes // *Biophys. Journ.* 1978. **22**, N 2. P. 191–207.
12. **Czamara K., Majzner K., Pacia M. Z. et al.** Raman spectroscopy of lipids: a review // *Journ. Raman Spectroscopy*. 2015. **46**, Is. 1. P. 4–20.
13. **Jolliffe I. T.** *Principal Component Analysis*. N. Y.: Springer-Verlag, 2002. 488 p.
14. **Leonov D. V., Adichtchev S. V., Dzuba S. A., Surovtsev N. V.** Vibrational layer eigenmodes of binary phospholipid-cholesterol bilayers at low temperatures // *Phys. Rev. E*. 2019. **99**, N 2. 022417.

Поступила в редакцию 21.06.2019

После доработки 25.07.2019

Принята к публикации 07.08.2019
