

ТЕМНОВАЯ И ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ПРОВОДИМОСТИ НЕВОДНЫХ ЛИПОСОМ: НОВЫЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ ТЕМПЕРАТУР ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

*С. В. Яблонский**, *В. В. Боднарчук*

*Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника»
Российской академии наук
11933, Москва, Россия*

Поступила в редакцию 30 мая 2018 г.

Разработан новый метод измерения температур структурных фазовых переходов в искусственных фосфолипидных мембранах. Метод основан на исследовании температурной зависимости эффектов темновой и фотоэлектрической проводимостей в симметричной ячейке с токопроводящими электродами из оксида индия–олова (ITO). Внутреннюю фотоэмиссию электронов в тонкий слой липосом индуцировали видимым и ближним ИК-светом непосредственно из ITO-электродов. Метод применили к исследованию лиотропных фаз в дипальметоилфосфатидилхолине (DPPC) и дистероилфосфатидилхолине (DSPC) с этиленгликолем (EG) и глицерином (G). Из результатов время-пролетных измерений была рассчитана подвижность носителей тока в липосомных везикулах. Результаты измерений сравниваются с результатами, полученными методом прямой кондуктометрии на постоянном токе. Впервые в жидкокристаллической фазе обнаружен эффект положительного температурного коэффициента сопротивления. Предложенный метод позволяет детектировать фазовые переходы в лиотропных жидкокристаллических системах и, следовательно, может быть использован при создании биосовместимых носителей лекарств на базе термочувствительных липосом.

DOI: 10.1134/S0044451018100218

1. ВВЕДЕНИЕ

Искусственные липидные мембраны часто используются как модельные системы, частично воспроизводящие свойства плазматических мембран. Природная клеточная плазматическая мембрана — это очень сложный объект, состоящий из липидов, белков, воды и веществ неорганического происхождения. В модельных экспериментах с искусственными мембранами, как правило, используют либо индивидуальные соединения, либо смесевые комбинации различного типа липидов [1]. Липидные амфифильные молекулы в биологическом интервале температур обладают свойством самоорганизации в жидкокристаллические бислоевые макроскопические структуры. В нативной мембране эти слои вы-

полняют барьерную функцию, участвуют в транспорте веществ, а также выполняют специфические функции по связыванию мембранных белков. Специфическим липидным образованиям, так называемым липидным рафтам, приписывают многочисленные свойства, такие как координация клеточных процессов, влияние на текучесть мембраны, организацию центров для сборки сигнальных молекул, регуляцию перемещения мембранных белков, рецепторов, а также регуляцию нейротрансмиссии [2]. Уже относительно давно известно влияние фазового состояния липидной мембраны на ее транспортные свойства. В работе Антонова и др. [3] показано, что главный фазовый переход из гель-фазы в жидкокристаллическую фазу сопровождается нарушением сплошности мембранной поверхности и появлением микроскопических отверстий, значительно увеличивающих проницаемость мембран. Такое поведение плазматической мембраны, по всей видимости, имеет физиологическое значение, а в настоящее время это явление успешно используется

* E-mail: yablonskii2005@yandex.ru

для доставки и освобождения лекарственных препаратов с помощью мембранных везикул — липосом. Липосомы — это микроскопические капсулы, которые в настоящее время широко используются в качестве универсального растворителя как гидрофильных, так и гидрофобных материалов. Таким образом, температура фазового перехода, при которой увеличивается ионная проницаемость мембран, является важнейшим параметром для оптимизации процесса доставки лекарства к очагу болезни.

В настоящее время применяют различные методы для определения температур фазовых переходов в липидных мембранах, в основе которых лежит наблюдение за температурным поведением различных параметров, таких как теплоемкость, показатель преломления, пьезоэлектрические модули, диэлектрические и электрические характеристики и т. д. [4–7].

В данной работе исследуется температурное поведение темнового и фотоэлектрического токов в тонких слоях неводных (в этиленгликоле и глицерине) дипальметоилфосфатидилхолина (DPPC) и дистеарилфосфатидилхолина (DSPC). Показано, что для случая этиленгликоля и глицерина результаты измерения главного перехода с хорошей точностью совпадают с результатами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). При измерении температур фазовых переходов методом прямой кондуктометрии при постоянном напряжении на образце обнаружены интересные особенности в температурном поведении электропроводности.

Для формирования липосом были выбраны наиболее часто встречающиеся в природе цвиттер-ионные липиды DPPC и DSPC. В данной работе исследовали рацемическую смесь DPPC (1,2-Dipalmitoyl-rac-glycero-3-phosphocholine) и левовращающий энантиомер DSPC (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) фирмы Sigma без предварительной очистки. В качестве неводного растворителя использовали этиленгликоль (EG) категории Ч согласно ГОСТ 10164-75 и аптечный глицерин (G). Оба растворителя — это широко известные проникающие криопротекторы, т. е. вещества, предотвращающие кристаллизацию мембранной жидкости в области отрицательных температур. Таким способом удается значительно увеличить сроки хранения носителей лекарств на основе липосом без нарушения их биологических функций [8]. Для приготовления неводного лиотропного жидкого кристалла в соотношении 1:1 соответствующее количество одного из растворителей добавляли к 5 мг сухого липида, помещенного

на дно бутылочки с завинчивающейся пробкой. Гомогенную смесь сухого липида и растворителя получали путем перетирания, нагревания и многократного центрифугирования с угловой скоростью 6000 об/мин для достижения равновесия. Конечное соотношение липида и растворителя могло немного отличаться от первоначального соотношения из-за частичного испарения растворителей, хотя и незначительно, вследствие их высокой температуры кипения T_b (T_b этиленгликоля и глицерина равны соответственно 196 °C и 290 °C). В эксперименте использовали этиленгликоль и глицерин с удельными сопротивлениями $\rho_{EG} = 10^4$ Ом·м и $\rho_G = 10^5$ Ом·м.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Схема экспериментальной установки показана на рис. 1а. На ячейку 1 подавали постоянное напряжение смещения. Постоянное электрическое напряжение получали от источника стабилизированного напряжения 9. В основном эксперименте измерялся фотоэлектрический ток, индуцируемый в ячейке при поглощении в ИТО-электроде импульса света различной формы и различной длительности. Липидные спиртовые смеси в исследуемом диапазоне длин волн оптически прозрачны, поэтому основной и единственной причиной импульсного тока в данном случае являлась внутренняя фотоэлектронная эмиссия из тонких ИТО-электродов ($d = 100$ нм) в липидный слой толщиной 10 мкм, находящийся при постоянном электрическом смещении. Толщина липидного слоя фиксировалась тефлоновыми прокладками. Для фотонного возбуждения тока использовали инфракрасный лазер ЛТИ-ПЧ (YAG), работающий на длине волны света 1.06 мкм (длительность импульса $\tau = 100$ мкс) в режиме свободной генерации, а также арсенид галлиевые светодиоды (GaAs) с длинами волн 450, 660 и 940 нм и прямоугольной формой световых импульсов (8). Длительность прямоугольных импульсов изменялась в пределах $\tau = 10^{-5}$ –1 с. Ток измеряли с помощью измерительного оборудования Z-Lab (г. Зеленоград) на основе масштабного усилителя 2 и аналогоцифрового преобразователя 3 с дальнейшей регистрацией на компьютерном осциллографе 4, входящем в измерительный комплекс PhysLab. Напряжение смещения U_{bias} в процессе эксперимента варьировалось в пределах 1.6–31 В. В качестве электродов использовали вырожденный полупроводник — оксид индия-олова (так называемый ИТО), спектр по-

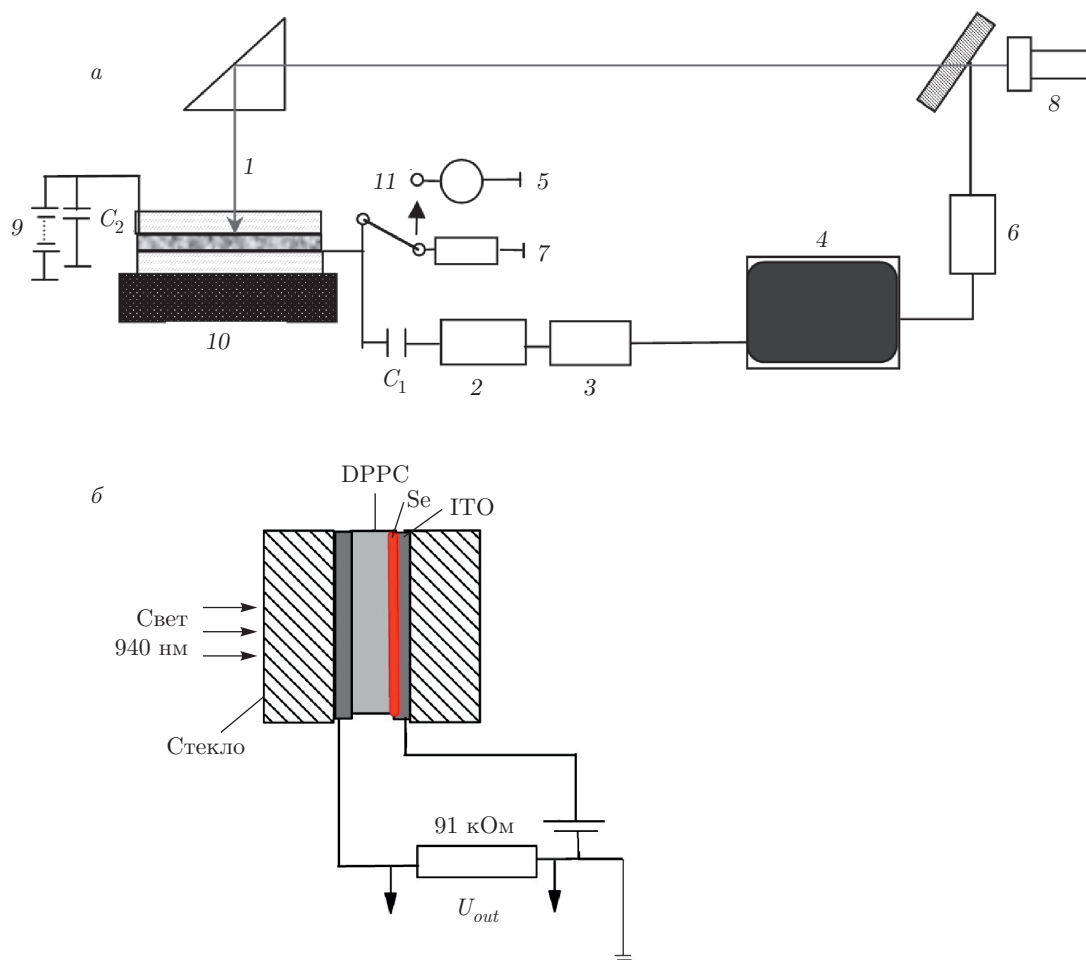


Рис. 1. *а)* Экспериментальная установка для измерения импульсного фототока в режиме фотопроводимости и постоянного темнового тока: 1 — ячейка с липосомами, 2 — масштабный усилитель, 3 — аналого-цифровой преобразователь, 4 — компьютер с пакетом программ PhysLab, 5 — электрометрический усилитель У5-11, 6 — фотоумножитель для контроля формы светового импульса, 7 — нагрузочное сопротивление $R_l = 91$ кОм, 8 — импульсный лазер (YAG, $\lambda = 1060$ нм), арсенид-галлиевые светодиоды (GaAs, $\lambda = 940, 660, 450$ нм), 9 — стабилизированный блок питания постоянного тока ТЕС-18, 10 — нагревательный столик (столик системы METLER или массивный нагреватель без термостабилизации), 11 — переключатель на два положения. *б)* Эквивалентная схема симметричной ячейки с селеном Se

глощения которого показан на рис. 2. Одновременно ячейка с липидным слоем нагревалась до температуры фазового перехода и выше. Температуру регистрировали с помощью медь-константановой термопары. Температурное поведение импульсного тока фотопроводимости и постоянного темнового тока изучали как в процессе нагревания, так и при охлаждении. Процесс нагревания и процесс охлаждения в большинстве случаев проводили без термостабилизации, но из-за большой тепловой инерции нагревателя 10 (рис. 1а) и малой скорости нагрева температуру тонкого слоя липосом определяли с приемлемой точностью: не хуже, чем 0.5°C .

В некоторых случаях использовали также нагревательный столик FP-82НТ системы “Metler-FP-90”. С указанной точностью результаты измерений ячейки без термостабилизации и с использованием нагревательного столика совпадали при скоростях нагрева и охлаждения 1 град/мин. На рис. 1б показана стандартная схема эксперимента при фотоинъекции носителей тока с использованием фоточувствительного тонкого слоя селена [9]. Существенным отличием и одновременно важным преимуществом предлагаемого нами подхода является именно отсутствие необходимости использования дополнительного фоточувствительного слоя.

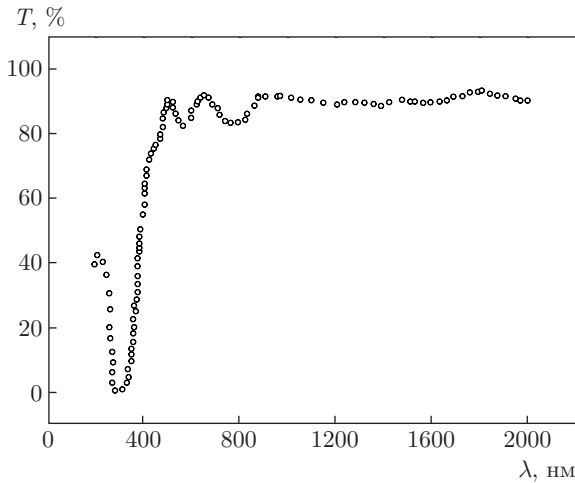


Рис. 2. Зависимость пропускания тонкого слоя вырожденного полупроводника ИТО от длины волны света λ

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Типичные фотоэлектрические отклики на импульсы инфракрасного YAG-лазера и световые импульсы прямоугольной формы арсенид-галлиевого светодиода (GaAs-светодиод, 940 нм) показаны на рис. 3а,б. При освещении ИТО-электрода прямоугольным импульсом света в ячейку инжектируются электроны и, согласно теореме Рамо–Шоккли, в замкнутой цепи генерируется фотоэлектрический ток, линейно изменяющийся во времени [10, 11]. При постоянном смещении на ячейке вследствие электролитической очистки значительно возрастают приповерхностные сопротивления, что существенно увеличивает время интегрирования. После процесса интегрирования напряжение на ячейке будет пропорционально заряду на обкладках конденсатора, являясь квадратичной функцией времени, как это и показано на рис. 3в, причем точка экстремума соответствует времени пролета заряженной частицей, ионом или сольватированным электроном расстояния между двумя ИТО-электродами. Подставив числовые данные $\tau = 1.2$ мс, $d = 10$ мкм, $U_{bias} = 31$ В в формулу $\mu = d^2/U\tau$ для вычисления дрейфовой подвижности заряженной частицы, получим следующее значение подвижности в слое неводных липосом: $\mu = 0.33 \cdot 10^{-8}$ м²/В·с, которое меньше характерных значений подвижности ионов в жидкой фазе почти на порядок. По-видимому, такое существенное снижение дрейфовой подвижности носителей тока связано с препятствиями для ионного транспорта в виде хаотически распределенных в пространстве мембранных стенок. На данном этапе

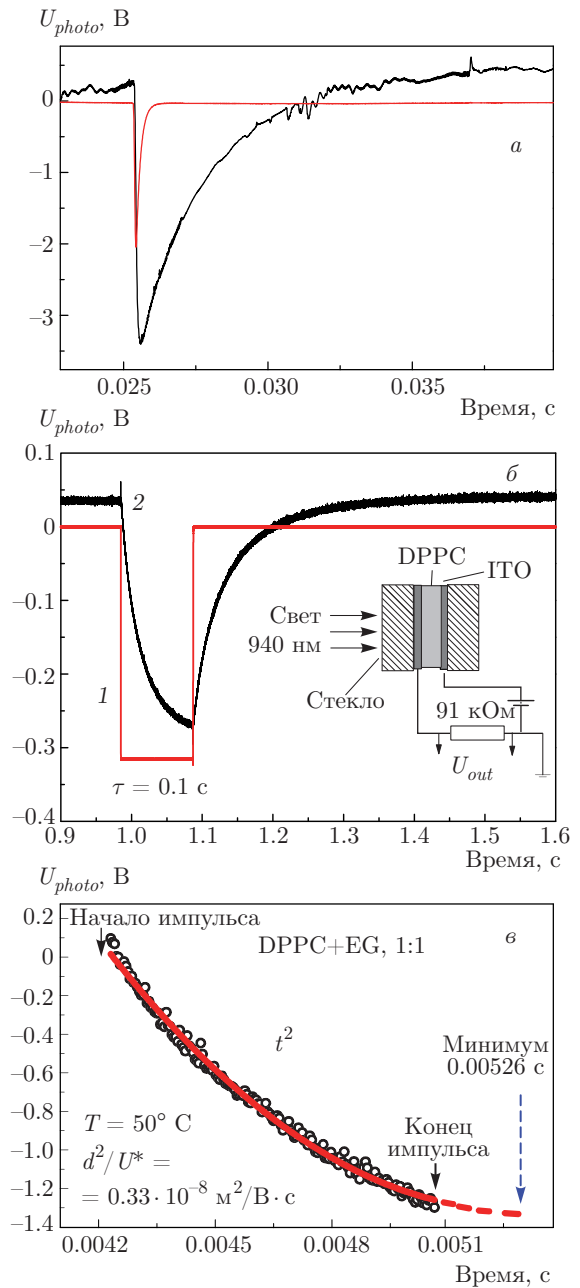


Рис. 3. (В цвете онлайн) а) Фотоэлектрический отклик смеси 40 % DPPC + 20 % холестерин + 40 % ЕГ. Лазер ЛТИ-ПЧ (YAG), $\lambda = 1.06$ мкм, длительность импульса $\tau = 100$ мкс, коэффициенты усиления усилителя и предусилителя $k_1 = 52$ и $k_2 = 10$, напряжение на накопителе $U = 750$ В, сопротивление нагрузки $R_l = 91$ кОм, напряжение смещения $U_{bias} = 31$ В, температура образца $T = 55$ °С. Красной линией показана форма лазерного импульса. б) Фотоэлектрический отклик смеси DPPC + EG (1:1). Светодиод GaAs, $\lambda = 940$ нм, длительность импульса $\tau = 0.1$ с, сопротивление нагрузки $R_l = 91$ кОм, напряжение смещения $U_{bias} = 31$ В, температура образца $T = 45$ °С. Прямоугольная форма импульса светодиода показана красной линией. в) Интерполяция фотоэлектрического импульса полиномом второй степени

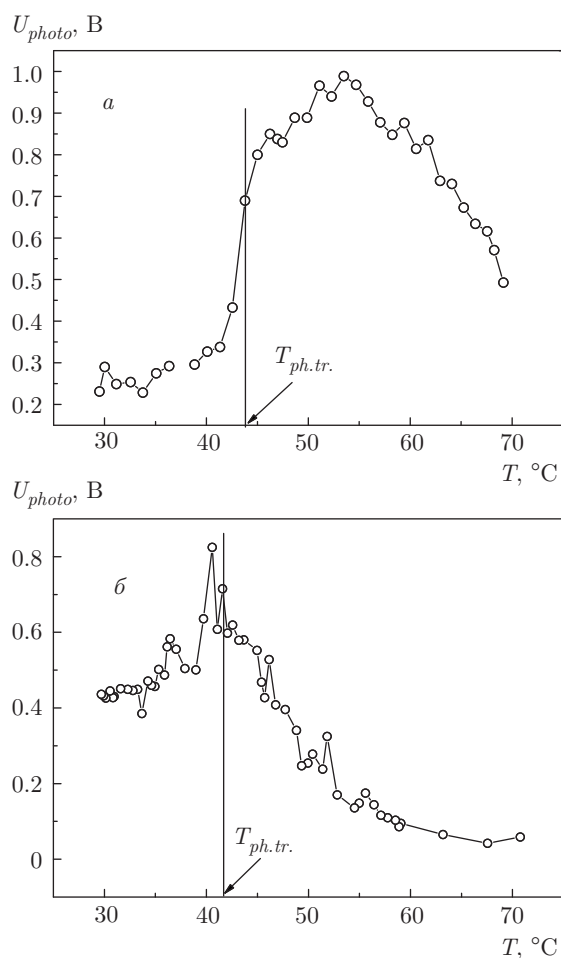


Рис. 4. а) Фотоэлектрическое напряжение U_{photo} на нагрузочном сопротивлении $R_l = 91$ кОм в зависимости от температуры; DPPC + EG (1:1); толщина слоя липосом $d = 10$ мкм. Инфракрасное излучение $\lambda = 940$ нм, $U_{bias} = 29$ В, температура фазового перехода $T_{ph.tr.} = 45 \pm 1$ °С. б) Температурная зависимость фотоэлектрического напряжения U_{photo} для системы DPPC + G (1:1); $d = 10$ мкм. Инфракрасное излучение $\lambda = 940$ нм, $U_{bias} = 20$ В, $T_{ph.tr.} = 42.5 \pm 1$ °С

остается открытым очень интересный вопрос о природе носителей тока. Поскольку в сложных спиртах энергия сродства электронов отрицательна, термализованный электрон может либо существовать в сольватированном состоянии, либо присоединиться к примеси, чаще всего в виде O_2^- [12]. Нельзя исключать также присутствие носителей тока одновременно как в виде ионов, так и в виде сольватированных электронов.

На рис. 4 показаны температурные зависимости фотоэлектрического напряжения U_{photo} , снимаемого с нагрузки $R_l = 91$ кОм, для систем DPPC + EG (1:1) и DPPC + G (1:1). В эксперименте регистри-

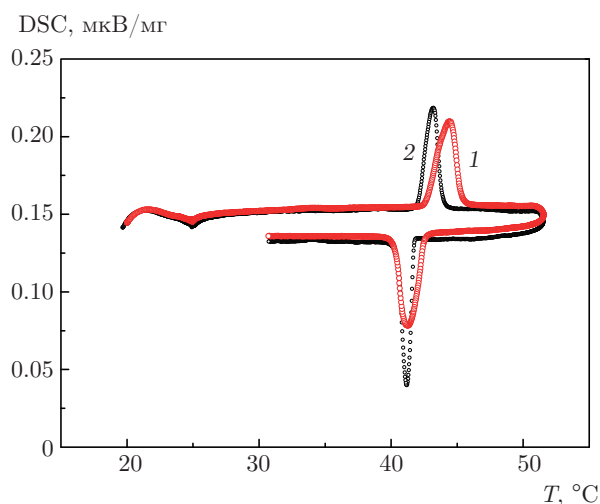


Рис. 5. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) для систем DPPC + G и DPPC + EG (1:1). Кривая 1 — DPPC + G, кривая 2 — DPPC + EG

ровали максимальную амплитуду фотоэлектрического отклика как функцию температуры. В окрестности главного фазового перехода, $P_{\beta'}-L_{\alpha}$, появляется характерная особенность, позволяющая определить температуру фазового перехода подобно тому, как это имеет место в методе ДСК. Температуры фазовых переходов неводных липосом, измеренных фотоэлектрическим методом, оказались в хорошем согласии с температурами фазовых переходов, измеренными с помощью ДСК. В качестве примера на рис. 5 показаны результаты ДСК для систем DPPC + G и DPPC + EG (1:1). На рис. 4 ниспадающие ветви фотопроводимости соответствуют так называемому «позисторному» эффекту [13], т. е. положительному температурному коэффициенту электрического сопротивления, наличие которого согласно [14] соответствует сегнетоэлектрическому переходу в параэлектрическую фазу. Температурная зависимость диэлектрической проницаемости $\epsilon'(1$ кГц) для структуры DPPC + G (1:1) в окрестности главного фазового перехода также имеет аномальную особенность (скачком уменьшается) [14], что в соответствии с известным уравнением Борна для электростатической энергии приводит к уменьшению проницаемости мембраны [15]. В точке сегнетоэлектрического фазового перехода всегда происходит резкое уменьшение диэлектрической проницаемости вещества, однако уменьшение диэлектрической проницаемости при переходе из упорядоченной фазы в менее упорядоченную фазу бывает также и в случае обычного структурного фазового перехода, как, например, в случае фазового перехо-

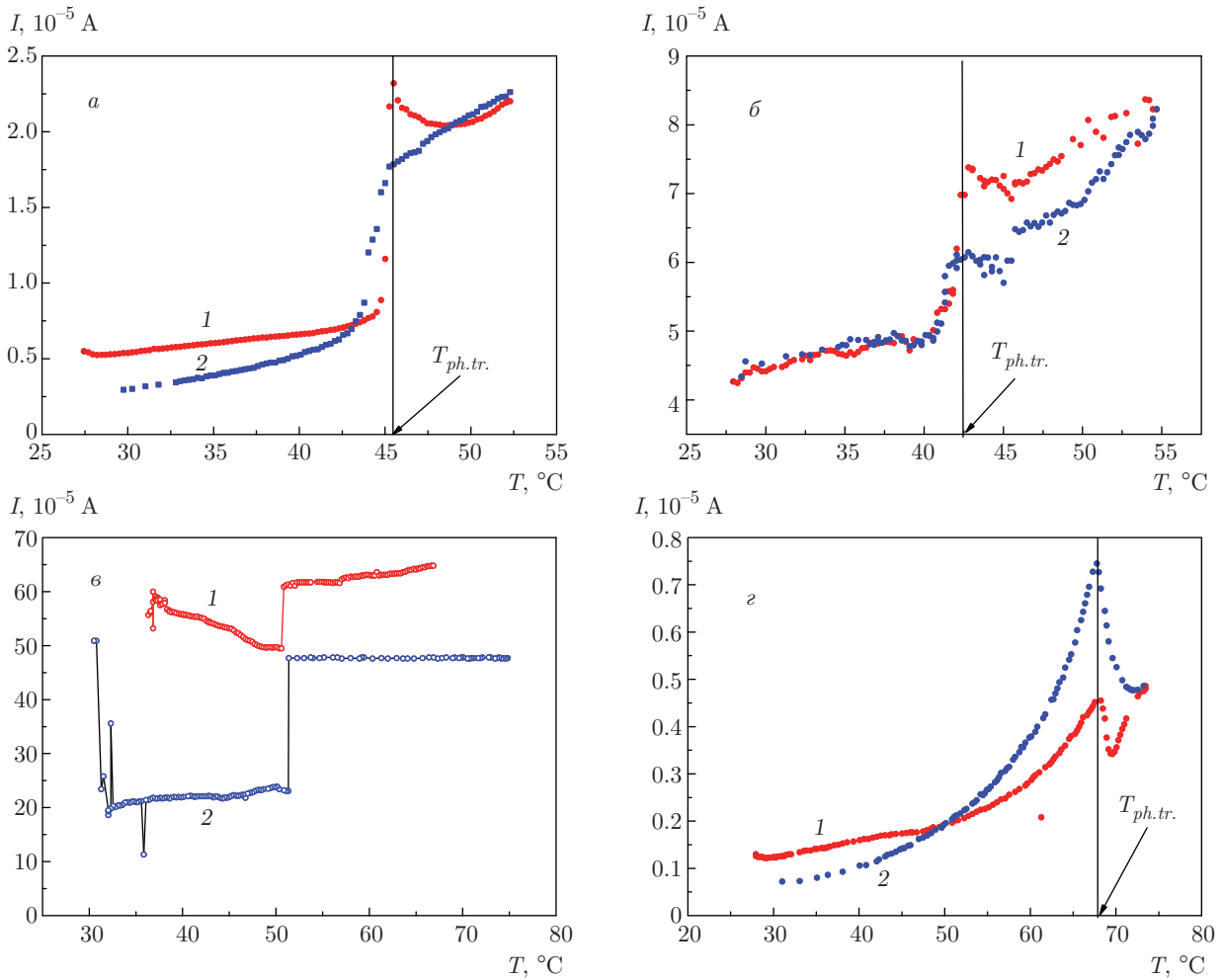


Рис. 6. а) Зависимости постоянного тока I от температуры T для системы DPPC + EG (1 : 1). Кривая 1 — нагрев, кривая 2 — охлаждение, $T_{ph.tr.} = 45.5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. б) $I(T)$ для системы DPPC + G (1 : 1). Кривая 1 — нагрев, кривая 2 — охлаждение, $T_{ph.tr.} = 42.5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. в) $I(T)$ для системы DSPC + EG (1 : 1). Кривая 1 соответствует напряжению смещения $U_{bias} = 4.9 \text{ В}$, кривая 2 — $U_{bias} = 1.6 \text{ В}$, $T_{ph.tr.} = 51 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. г) $I(T)$ для системы DSPC + G (1 : 1). Кривая 1 — нагрев, кривая 2 — охлаждения, $T_{ph.tr.} = 67.5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

да лед–вода [16]. Отметим, что ранее сегнетоэлектрическое переключение в наклонной $P_{\beta'}$ -фазе было обнаружено в неводных DPPC, легированных холестерином [17]. Симметрия допускает сегнетоэлектрическое упорядочение в наклонных хиральных системах подобно тому, как это имеет место в жидкокристаллических смектических C^* -фазах [18]. Для одной из наших систем хиральность обеспечивается не хиральной добавкой, а выбором в качестве липида соответствующего энантиомера (в нашем случае левого энантиомера для DSPC). Наклонная гель-фаза $P_{\beta'}$ представляет собой структуру, промежуточную между кристаллом с дальним позиционным порядком и жидким кристаллом, поэтому нельзя исключать также возможности сегнетоэлектрического

упорядочения в гель-фазе в том числе и для нехиральных объектов, таких, например, как используемая в эксперименте рацемическая смесь DPPC.

На рис. 6 показаны температурные кондуктометрические данные для систем DPPC, DSPC (+EG, 1 : 1) и DSPC, DSPC (+G, 1 : 1). Примечательно, что на рис. 6а,б,г также имеются ниспадающие участки, соответствующие положительному температурному коэффициенту сопротивления, а температурные скачки тока с хорошей точностью коррелируют с температурами главных фазовых переходов, измеренных независимым методом, а именно, с помощью ДСК. Следует отметить, что «позисторный» эффект, наблюдаемый в неравновесных условиях рис. 4 и в равновесных рис. 6 выражают темпера-

турные зависимости дрейфовых подвижностей носителей заряда в неводных липосомах в равновесных и неравновесных условиях соответственно. В общем случае эти дрейфовые подвижности могут значительно различаться численно на несколько порядков величин [9]. Максимальные значения фотоэлектрического и омического токов на температурной шкале соответствует появлению пор в липидных везикулах. В то время как резкое уменьшение проницаемости мембран с ростом температуры можно связать с влиянием гибких хвостов липидных молекул в L_α -фазе, значительно увеличивающих, как ни странно, омическое сопротивление мембраны.

4. ВЫВОДЫ

Предлагается новый метод исследования температур структурных фазовых переходов неводных липосом, основанный на исследовании температурного хода темновой и фотоэлектрической проводимостей. Метод позволяет измерять температуры главного фазового перехода неводных липосом, а также измерять подвижности носителей заряда, участвующих в фотоэлектрической проводимости.

Отметим, что предлагаемый метод достаточно прост и при соответствующей оптимизации параметров эксперимента (таких как смещающее напряжение на электродах, толщина липидного слоя, скорость нагрева образца и мощность возбуждающего света) точность определения температур фазового перехода может быть существенно улучшена, а сам метод может быть вполне конкурентоспособен рутинному методу дифференциального температурного анализа. Результаты измерений главного фазового перехода с точностью (1°C) совпали с результатами прямых кондуктометрических измерений и с результатами ДСК для системы DPPC+EG, DPPC+G и DSPC+EG, DSPC+G. Впервые обнаружен так называемый «позисторный» эффект в жидкокристаллической лиотропной фазе, возможно свидетельствующий о сегнетоэлектрическом характере главного фазового перехода. Эффект нуждается в более глубоком изучении с привлечением специфических методов исследования сегнетоэлектрических материалов, таких как пироэлектрический эффект, эффекты сегнетоэлектрического переключения и диэлектрическая спектроскопия. Природа носителей фотоэлектрического тока в средах с отрицательным сродством к электрону имеет фундаментальный

интерес для моделирования биологических процессов с переносом электрона, реакций переноса электрона в организованных системах (липосомах и мицеллах), для понимания роли гидратированного электрона в биологических процессах. Работа по исследованию состава носителей тока должна быть также продолжена с привлечением современных методов, чувствительных к спиновому состоянию электронной подсистемы.

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства научных организаций (соглашение № 007-ГЗ/ЧЗ363/26).

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Antonella and M. Giancarlo, *Peptide Science* **104**, 462 (2015).
2. J. A. Allen, R. A. Halverson-Tamboli, and M. M. Ransnick, *Nature Publ. Group* **8**, 128 (2007).
3. V. F. Antonov, V. V. Petrov, A. A. Molnar, D. A. Predvoditelev, and A. S. Ivanov, *Nature (London)* **283**, 585 (1988).
4. A. G. Petrov, A. T. Todorov, B. Bonev, L. M. Blinov, S. V. Yablonski, D. B. Subachyus, and N. Tsvetkova, *Ferroelectrics* **114**, 415 (1991).
5. J. Harden, N. Diorio, A. G. Petrov, and A. Jakli, *Phys. Rev. E* **79**, 011701 (2009).
6. С. В. Яблонский, Л. М. Блинов, *Письма в ЖТФ* **10**, 1513 (1984).
7. С. В. Яблонский, В. В. Боднарчук, *Жидкие кристаллы и их практическое использование* **17**(4), 106 (2017).
8. K. Muldrew, *Cryobiology — A Short Course*, Univ. Calgary, Canada (1999).
9. Ю. В. Плесков, А. Р. Тамеев, В. П. Варнин, И. Г. Теремецкая, А. М. Баранов, *Физика и техника полупроводников* **31**, 1142 (1997).
10. S. Ramo, *Proc. IRE* **27**, 584 (1939).
11. W. Shockley, *J. Appl. Phys.* **9**, 635 (1938).
12. И. Адамчевский, *Электрическая проводимость жидких диэлектриков*, Энергия, Ленинград (1972).

13. W. Heywang, *Sol. St. Electron.* Pergamon Press Ltd. **3**(1), 51 (1961); DOI: 10.1016/0038-1101(61)90080-6.
14. S. V. Yablonskii, V. V. Bodnarchuk, V. V. Grebenev, and A. R. Geivandov, *Proc. 27th Int. Liquid Crystal Conf. (ILCC 2018)*, p. P2-C2-10 (2018).
15. J. P. Dilger, G. McLaughlin, T. J. McIntosh, and S. A. Simon, *Science* **206**(4423), 1196 (1979).
16. N. Bjerrum, *Science* **115**, 385 (1952).
17. Л. М. Блинов, С. А. Давидян, А. Г. Петров, А. Т. Тодоров, С. В. Яблонский, *Письма в ЖЭТФ* **48**, 259 (1988).
18. С. А. Пикин, *Структурные превращения в жидких кристаллах*, Наука, Москва (1981).