

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра материаловедения, технологии
и управления качеством

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕНГМЮРОВСКИХ МОНОСЛОЁВ DPPC –
МОДЕЛЕЙ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

магистранта 2 курса 209 группы
направления 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов»
профиль «Материаловедение фармацевтического и медицинского назначения»
факультета нано- и биомедицинских технологий

Яшиной Наталии Юрьевны

Научный руководитель
доцент, к.ф.-м.н.

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

Е.Г. Глуховской

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой
профессор, д.ф.-м.н.

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

С.Б. Вениг

инициалы, фамилия

Саратов 2019

Введение. Как известно, плёнки Ленгмюра-Блоджетт (LB) находят различные практические применения в разных областях науки и техники: в электронике, оптике и биохимии. Кроме того, поскольку живые организмы содержат много компонентов, которые используются для получения плёнок Ленгмюра-Блоджетт (жирные кислоты, фосфолипиды, белки), стало возможным создание систем между традиционными материалами и биоматериалами для создания биосенсоров. Свойства плёнок можно легко изменить, поменяв структуру амфифильной молекулы, состав монослоя. В настоящей работе исследуется попытка получить плёнки Ленгмюра-Блоджетт с биологически и оптически активными кислотой (олеиновая кислота) и фосфолипидом (Дипальмитоилфосфатидилхолин - DPPC) в качестве объектов, который имитирует клеточные мембраны. Одними из самых важных составляющих клеточных мембран являются фосфолипиды — амфифильные вещества [1]. Они состоят из полярной «головки», в состав которой входит глицерин или другой многоатомный спирт, отрицательно заряженный остаток фосфорной кислоты и часто несущая положительный заряд группа атомов, и двух неполярных «хвостов» из остатков жирных кислот. Главная особенность фосфолипидов состоит в том, что «головка» у них гидрофильна, а «хвосты» гидрофобны. Это позволяет при нахождении в толще водной среды образовывать бислой — двойной слой фосфолипидных молекул, где гидрофильные головы с обеих сторон соприкасаются с водой, а гидрофобные хвосты упрятаны внутрь бислоя и тем самым защищены от контакта с водой способность формировать липосомы и биологические мембраны (липидный бислой). Многими авторами подтверждено, лекарственные препараты, заключённые в липосомы, могут проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), для дальнейшей терапии [2,3].

Сегодня хорошо известен ряд наноструктур, используемых в качестве носителей лекарственных препаратов: липосомы, полимерные наночастицы и ряд других [4,5]. Актуальными в настоящее время являются задачи изучения липидных мембран, взаимодействия мембран, с другими биомолекулами,

влияют на молекулярный механизм различных заболеваний. Изучение монослоёв в настоящее время представляет большой интерес. В качестве исследования преимущественно используются монослои липидов (фосфолипидов), потому, что они широко используются в качестве модельных мембранных систем и представляют собой основу для изучения взаимодействий между различными биомолекулами и сложными биологически активными материалами (например, витаминами, лекарственными препаратами, гормонами, ферментами и т. д.) и липидной мембраной.

Технология Ленгмюра-Блоджетт позволяет создавать конденсированные упорядоченные мономолекулярные слои и управлять их структурой, а также конструировать мультислойные плёнки. «Ленгмюровские плёнки» мономолекулярный слой нерастворимого поверхностно-активного вещества на границе раздела двух фаз, а так же мультимолекулярные структуры, полученные путём последовательного переноса таких мультимолекулярных слоёв на твёрдую подложку. Возможность варьировать их состав и свойства на молекулярном уровне обусловила широкое применение таких структур [6,7].

Целью выпускной квалификационной работы является исследование процессов формирования упорядоченных мономолекулярных слоёв 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина методом изотерм сжатия.

На основе поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- поиск и анализ научной информации по теме работы (исследование упорядоченных мономолекулярных слоёв дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) – моделей клеточных мембран);
- освоение методов формирования Ленгмюровских монослоёв на субфазе воды; подготовка реактивов и компонентов;
- исследование влияния модификации монослоёв DPPC методом изотерм сжатия;
- исследование влияния модификации монослоёв олеиновой кислоты (ОА) методом изотерм сжатия.

Дипломная работа занимает 54 страницы, имеет 25 рисунков и 3 таблицы.

Обзор составлен по 37 информационным источникам.

Во введение рассматривается актуальность магистерской работы, устанавливается цель и выдвигаются задачи для достижения поставленной цели.

Первый раздел посвящён аналитическому обзору публикаций по методам получения модифицированной формы фосфолипидов, исследования свойств компонентов клеточных мембран и применения фосфолипидов и жирных кислот. Рассмотрены сенсорные свойства биомолекул, микроскопия под углом Брюстера, инфракрасная отражательно-абсорбционная спектроскопия. Рассмотрено понятие монослоя.

Во втором разделе работы представлены исследования ленгмюровских монослоёв 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, описаны материалы и методы, а так же анализ полученных результатов.

Основное содержание работы. В работе исследовались 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), полученный у компании Sigma-Aldrich и олеиновая кислота (ОА) приобретена у Meligen corp., RF. Все они имели чистоту 99% и использовались в немодифицированном виде после приобретения. В качестве растворителя использовался спектроскопический хлороформ компании Sigma-Aldrich. Воду 1 категории готовили с использованием системы Smart2Pure (Thermoscientific), удельное сопротивление которой составляло 18,2 МОм×см.

Изотермы сжатия монослоёв (π - A) записывались на установке KSV2002 (KSV Instruments Ltd., Финляндия), оснащённым платиновой пластиной Pt Wilhelmy с симметричным сжатием монослоя. Измерения проводятся при температуре 25°C при постоянной скорости движения барьеров. Расширенный слой липидов формируют на субфазе, содержащей озон под действием УФ-излучения, и поверхностное давление измеряется в течение первых 5 минут на неподвижных барьерах. Затем включается движение барьеров для обнаружения изотерм поверхностного давления, т.е. зависимости $\pi = f(A)$, где π представляет

собой поверхностное давление, а A - площадь на молекулу, соответствующую плотности двумерного слоя.

В качестве источника озона служит электронный воздухоочиститель Супер-Плюс-Ион, камера ванны Ленгмюра-Блоджетт насыщается озоном. В качестве источника УФ служит ОУФБ-04, который устанавливается над ванной Ленгмюра-Блоджетт. «ОУФБ-04» компактные бактерицидные лампы - одноцокольные ртутные газоразрядные лампы низкого давления, колба которых изготовлена из специального увиолевого стекла, пропускающего ультрафиолетовое излучение в области УФ-С с максимумом на длине волны 253,7 нм, обладающее бактерицидным действием.

Описание условий формирования монослоёв DPPC и ОА. Изотермы площади поверхности монослоя DPPC были зарегистрированы прибором для осаждения плёнки Ленгмюра-Блоджетт KSV2002 (KSV Instruments Ltd., Финляндия). Для экспериментов DPPC был растворён в хлороформе в концентрации 10^{-3} М DPPC. Распылялся на ванну Ленгмюра-Блоджетт на поверхность субфазы (очищенная вода) с помощью хроматографического шприца (Hamilton Co., США). До начала эксперимента отводится время для испарения растворителя и выравнивания монослоя. После испарения растворителя монослой на границе воздух / вода непрерывно сжимался со скоростью 15 мм/мин для получения (π -A) изотерм.

Озонирование и ультрафиолетовое облучение осуществлялось в коробе установки Ленгмюра-Блоджетт, короб насыщался озонсодержащим кислородом и подвергался УФ - излучению в течение 5 и 15 минут.

Изотермы площади поверхности монослоя олеиновой кислоты (ОА, oleic acid) были зарегистрированы прибором для осаждения плёнки Ленгмюра-Блоджетт KSV2002 (KSV Instruments Ltd., Финляндия). Раствор ОА был приготовлен с использованием хлороформа в качестве растворителя. Необходимое количество раствора ОА осторожно вводили (распыляли) на ванну Ленгмюра-Блоджетт, заполненную очищенной водой, с помощью хроматографического шприца (Hamilton Co., США). До начала сжатия

отводится время для испарения растворителя и выравнивания поверхностной концентрации ПАВ. После испарения растворителя монослой на границе воздух / вода непрерывно сжимался со скоростью 15 мм/мин для получения (π - A) изотерм.

Озонирование и ультрафиолетовое облучение осуществлялось в коробе установки Ленгмюра-Блоджетт, короб насыщался озонсодержащим кислородом и подвергался УФ - излучению в течение 5 минут.

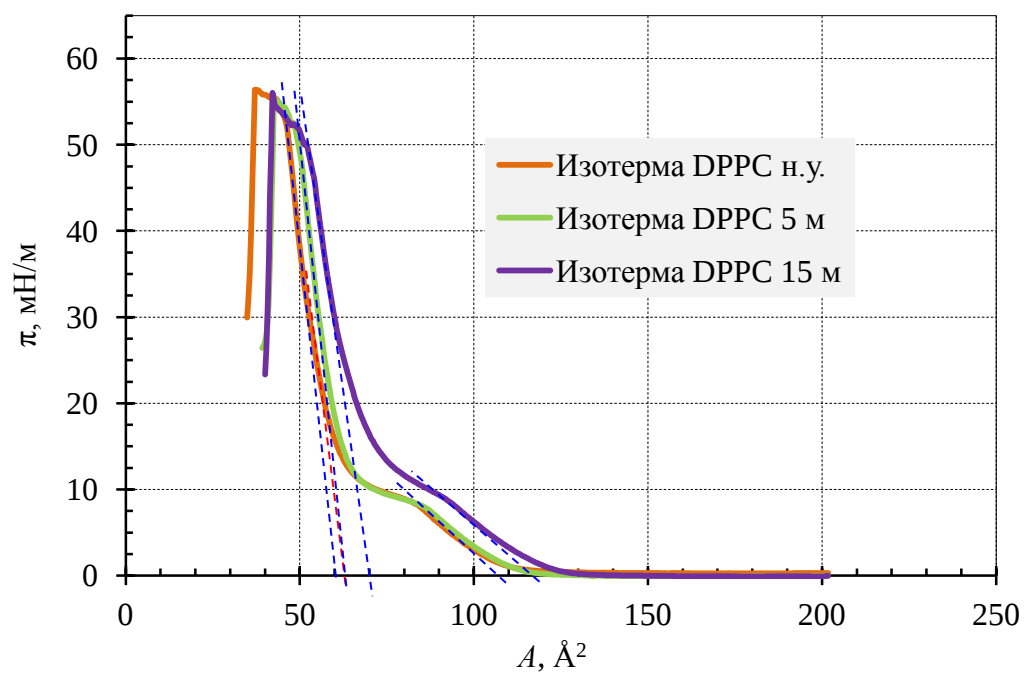
Анализ полученных результатов. В экспериментах были получены изотермы сжатия (зависимости поверхностного натяжения или давления π от площади A , приходящейся на одну молекулу) не модифицированных и модифицированных форм DPPC и ОА. Модифицированные формы получились в результате процессов озонирования и УФ – излучения на поверхности субфазы – чистая вода.

По экспериментальным данным π и A строится изотерма сжатия, и по ним строится график производной $d\pi/dA$, который позволяет определить участок изотермы сжатия с максимальным наклоном, где касательная, построенная к этому участку, имеет максимальный наклон. На графике производной, диапазон значений A , где касательная к изотерме имеет максимальный наклон, может быть найден как участок, где производная $d\pi/dA$ имеет минимальные значения. Excel (приложение Microsoft Office) позволяет сразу показать уравнение касательной и коэффициент R^2 (коэффициент детерминации) – один из показателей, описывающих совпадение экспериментальной кривой и линии тренда, построенной согласно показываемому уравнению. Этот параметр также называют величиной достоверности аппроксимации. С его помощью можно определить уровень точности прогноза. В зависимости от уровня коэффициента детерминации, принято разделять модели на три группы: 0,8-1 это модель хорошего качества, то есть уравнение прямой, построенной к экспериментальным точкам, выбрано с оптимальными параметрами, максимально близко проходит к экспериментальным значениям. 0,5-0,8 – модель приемлемого качества. 0-0,5 – модель плохого качества, иногда говорят

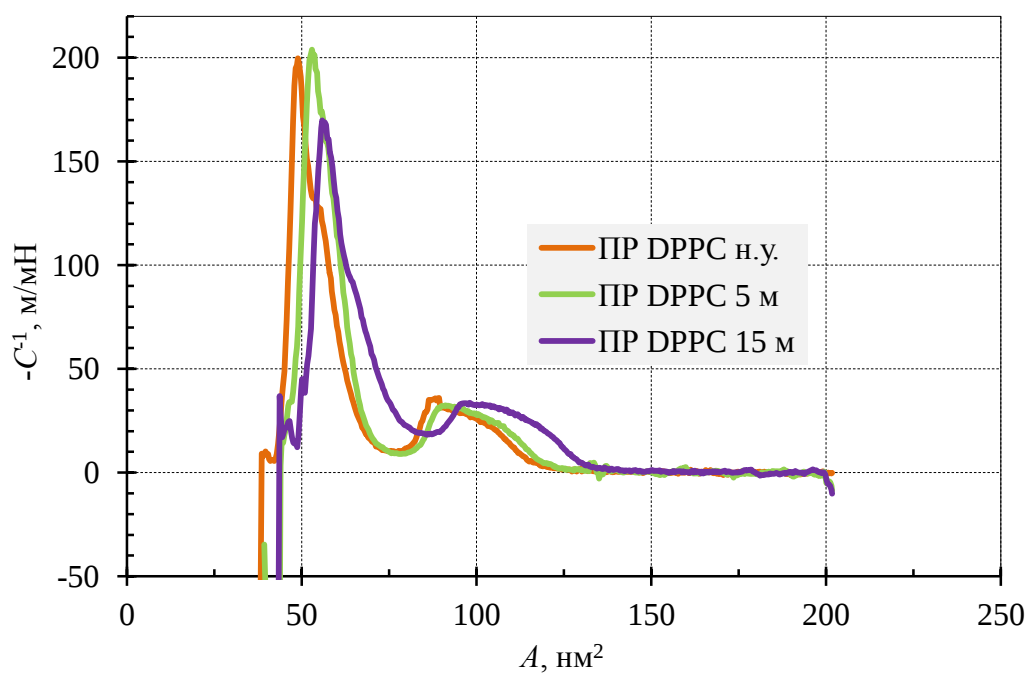
о невозможности использования моделей для прогнозов. Для участков, определяемых таким образом, анализировались коэффициенты a , b , A_0 , K_0 , χ , где a и b – коэффициенты из уравнения касательной построенной к изотерме с максимальным наклоном. A_0 – точка, где касательная построенная на этом участке пересекает ось X . A_0 для такого случая является минимальным, что так же соответствует наиболее плотно упакованному состоянию монослоя. Во всех других случаях, в других диапазонах касательная, построенная к другим участкам, отсекает на оси X значения A_0 больше, чем A , построенная к этому участку с максимальным наклоном. Кроме этого анализировались χ (сжимаемость) и K_0 (модуль сжатия). По своему смыслу χ (м/мН) говорит о том, на сколько сжимается или деформируется монослой при увеличении нагрузки на одну единицу давления. Величина K_0 (мН/м) говорит о том, насколько увеличивается упругое сопротивление монослоя при деформации его на единицу площади.

Построенные кривые и их производные показаны на Рисунках 1 и 2 с разным временем воздействия УФ-излучения и озонирования.

Изотермы сжатия полученные для нормальных условий никак не отличаются от литературных данных. Изотерма олеиновой кислоты похожа на изотерму исследований А. Адамсона [8], а изотерма DPPC на изотерму исследований А. Aroti [9].

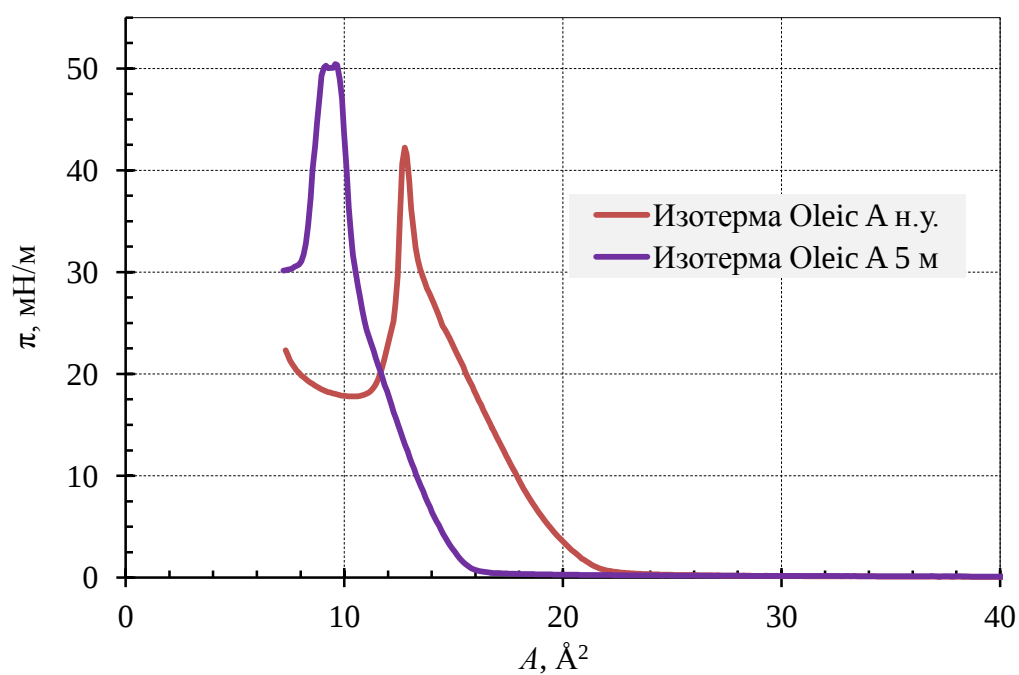


a)

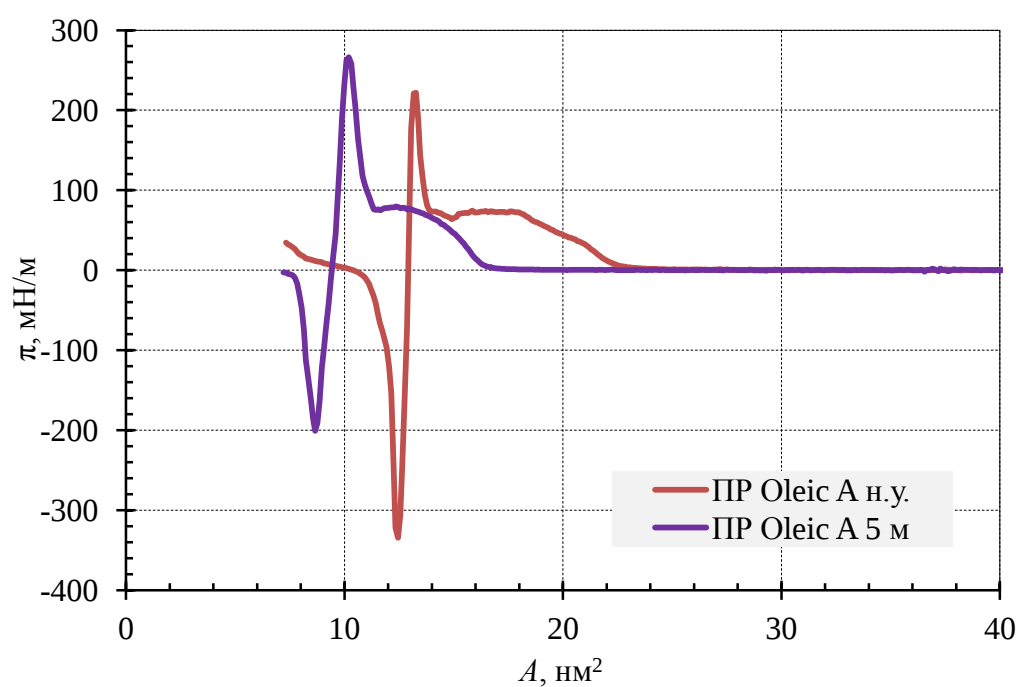


б)

Рисунок 1 – Изотермы (a) и производные к ним (б) для DPPC



a)



б)

Рисунок 2 – Изотермы (a) и производные к ним (б) для Oleic acid

Если на монослой действовать УФ-излучением в течение какого-то времени, то можно наблюдать следующую закономерность. Изотерма олеиновой кислоты при облучении меньше занимает площадь, чем до облучения в течение 5 минут. Смещение изотермы происходит как в твёрдой

фазе, так и в жидко-конденсированной фазе. Предположительно, часть молекул олеиновой кислоты может, например, фрагментироваться по двойной связи, разорваться. Оторвавшийся алифатический хвост, который уже можно считать, как углеводородный (C_9), уже не связан с водой он может «улететь» полностью, кроме того хвост молекулы может растворяться. Л. М. Блинов в своём исследовании [7] отмечает, если количество молекул воды уменьшилось на поверхности за счёт их растворения или частичном растворении, потому что не все молекулы стали короткими, то можно сказать, что монослой занимает меньшую площадь, чем исходный необлучённый олеиновой кислоты. Из Рисунка 2 (а) можно рассчитать, примерно, на 25% происходит смещение изотермы. В полупроводниковой технологии известен способ чистки поверхности подложек от загрязнения углеводородами (УВ) и органикой с помощью жёсткого ультрафиолета в присутствии кислорода [10]. УВ при этом, разлагаясь до газообразных продуктов, «улетают» и поверхность подложки становится чистой.

У изотерм DPPC площади значительно превосходят площади олеиновой кислоты, но сдвиги однозначно есть. Возможно, происходит аналогичная картина, как и у олеиновой кислоты. У DPPC два алифатических хвоста, они лучше, чем у олеиновой кислоты, у них нет ненасыщенных связей. Поэтому деструкция алифатической части происходит в меньшей степени, чем деструкция у олеиновой кислоты. Но тем не менее есть изменения в параметрах. То есть изотерма DPPC, при воздействии на монослой УФ-облучением и озонированием в течение 15 минут, «уходит» влево (Рисунок 1 а), это можно трактовать как разные конденсации двух участков твёрдо-кристаллического состояния и жидко-конденсированного состояния. Возможно, в данном случае происходит отжиг дефектов [10]. Происходит зарядка головной (фосфорной) группы из-за чего заряженное состояние формирует гидратную оболочку, это можно посчитать с помощью моделирования, радиус головной части с гидратной оболочкой или без гидратной оболочки. У этой фосфорной группы дипольный момент приводит к

более сильному взаимодействию с молекулами воды, которые её окружают. Первая гидратная оболочка становится более жёсткой, более привязанной к головной части. К тому же происходит увеличение заряженности головной группы и силы взаимодействия головных групп увеличиваются, то есть увеличилось кулоновское отталкивание или радиус дальнего действия, т.е. силы отталкивания становятся «более дальнедействующими» примерно на 10%, что видно из Рисунка 1 а. Дальнейший поиск ответа может быть связан с моделированием. Мы можем промоделировать молекулу в состоянии, когда фиксируется более жёсткая гидратная оболочка.

Заключение. В ходе выполнения работы была собрана и проанализирована научная информация по теме работы (исследование упорядоченных мономолекулярных слоёв дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) – моделей клеточных мембран).

Освоены методы формирования Ленгмюровских монослоёв на субфазе воды. Исследованы процессы формирования упорядоченных мономолекулярных слоёв 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина методом изотерм сжатия. Исследовано влияние модификации монослоёв DPPC методом изотерм сжатия. Исследовано влияние модификации монослоёв олеиновой кислоты (ОА) методом изотерм сжатия.

Для исследования преимущественно использовались монослои липидов, потому, что они широко используются в качестве модельных мембранных систем и представляют собой стабильную основу для изучения взаимодействий между различными биомолекулами и сложными биологически активными материалами (например, витаминами, лекарственными препаратами, гормонами, ферментами и т. д.) и липидной мембраной. В настоящей работе исследуется попытка получить плёнки с биологически и оптически активными кислотой (олеиновая кислота) и фосфолипидом (DPPC) в качестве объектов, который имитирует клеточные мембраны.

Список использованных источников

- 1 Koolman, J. Taschenatlas der Biochemie / J. Koolman, K. - H. Rohm. – N. Y.: Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1998. – P.56-57.
- 2 Orhmann, A. Improving the transport of chemotherapeutic drugs across the blood-brain barrier / A. Orhmann, I. Fichter, R. Zeizing // Expert Rev. Clin. Pharmacol. – 2011. – V. 4, № 4. – P. 477-480.
- 3 Orhmann, A. Treatment of experimental brain metastases with MTO-Liposomes: impact of fluidity and LPR-targeting on the therapeutic result / A. Orhmann // Pharm. Res. – 2012. – V. 29, № 7. – P. 1949-1959.
- 4 Газит, Э. Нанобиотехнология – необъятные перспективы развития / Э. Газит. – М.: Научный мир, 2011. – С. 150.
- 5 Гельперина, С. Э. Системы доставки лекарственных веществ на основе полимерных наночастиц / С. Э. Гельперина, В. И. Щвец // Б. м. Биотехнология. – 2009. – № 3. – С. 8–23.
- 6 Goshtasby, A. A. 2-D and 3-D Image registration for Medical, Remote Sensing, and Industrial Applications / A. A. Goshtasby // Wiley-interscience. –2005. –P. 259.
- 7 Блинов, Л. М. Лэнгмюровские плёнки / Л. М. Блинов // Б. м. Успехи физ. наук. – 1988. – Т. 155, вып. 3. – С. 443.
- 8 Адамсон, А. Физическая химия поверхностей / А. Адамсон. – М.: Мир, 1979. — С. 568.
- 9 Aroti, A. Effects of Hofmeister Anions on DPPC Langmuir Monolayers at the Air–Water Interface / A. Aroti, E. Leontidis, E. Maltseva // J. Phys. Chem. B. – 2004. – V. 108, № 39. P. 15238–15245.
- 10 Ультрафиолетовое излучение : официальный научный обзор по воздействию УФ излучения на окружающую среду и состояние здоровья с упоминанием о глобальном истощении озонового слоя. – Женева : Всемирная организация здравоохранения : Ж : Изд-во Медицина, 1995. С. 91-95.