

**Спектроскопия комбинационного
рассеяния света при изучении
липидов в модельных мембранах и
биологических клетках**

Н.В. Суровцев

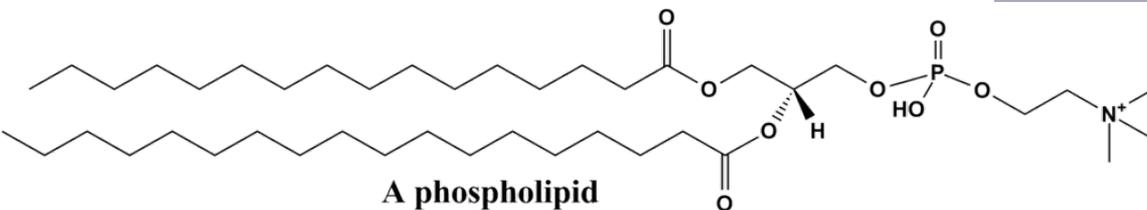
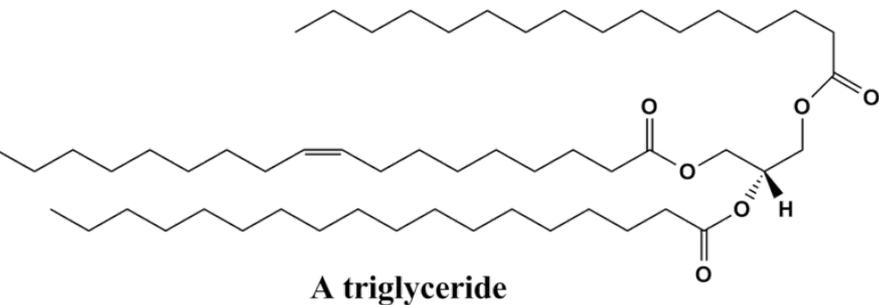
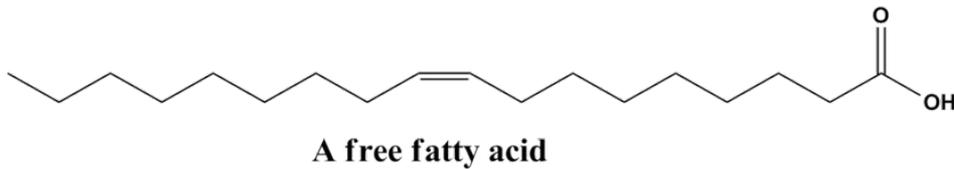
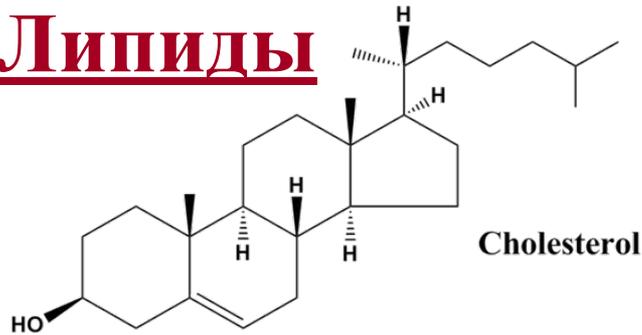
Институт автоматки и электрометрии

СО РАН

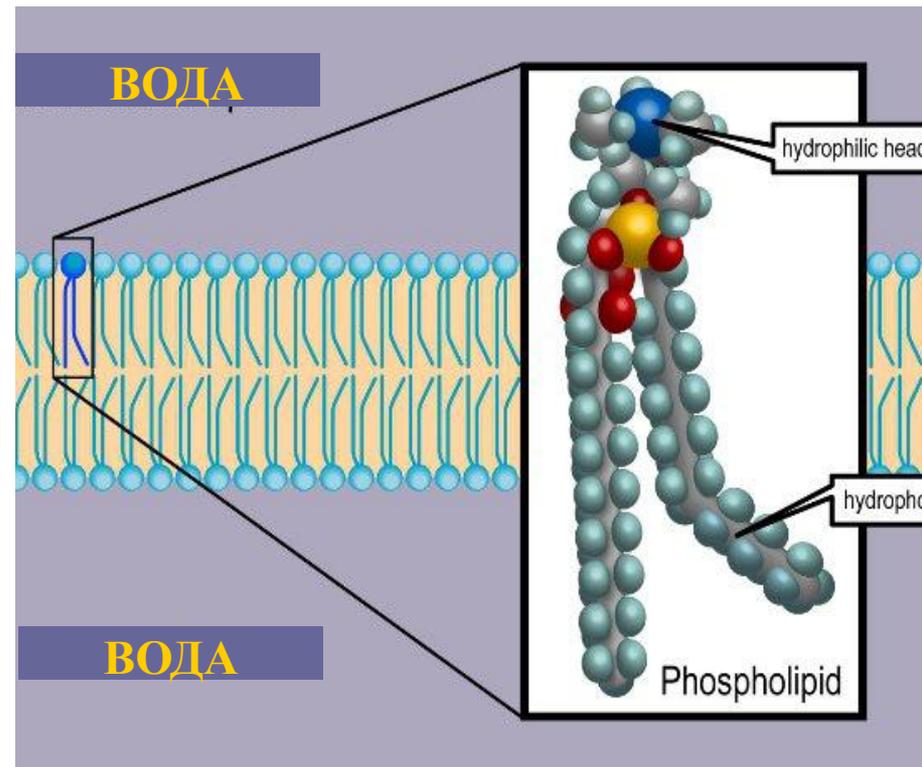
2020 г.

Липиды – широкий класс веществ, включающий жиры. В докладе будет идти речь преимущественно о фосфолипидах, холестерине, триглицеридах

ЛИПИДЫ

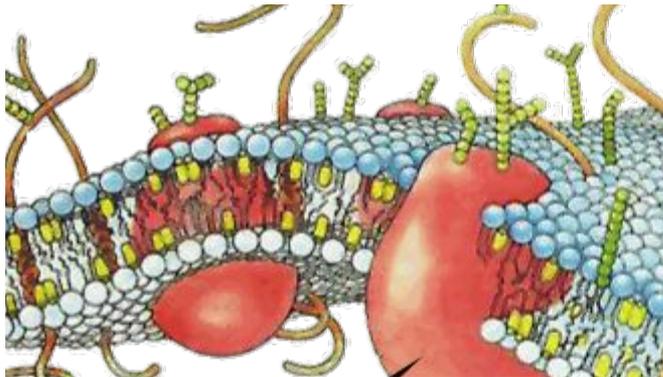


Особенность фосфолипидов заключается в образовании квазиплоского бислоя в воде

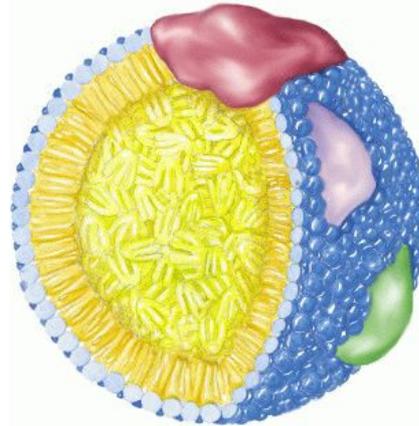


Липидные структуры в биологии

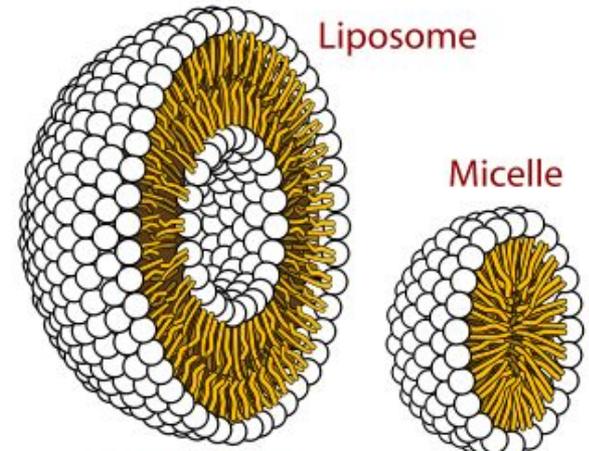
**клеточные
мембраны**



**липидные
капли**



**средства
доставки**

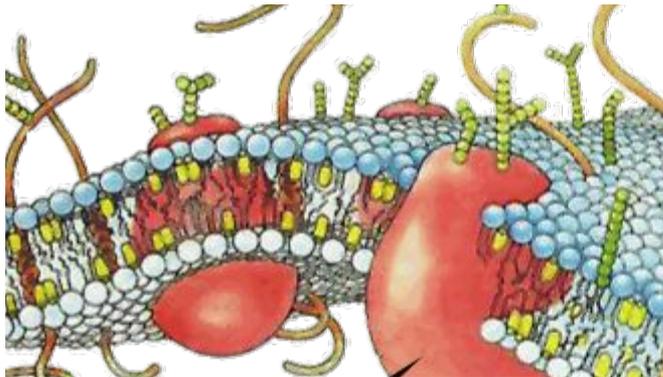


ЗАДАЧИ

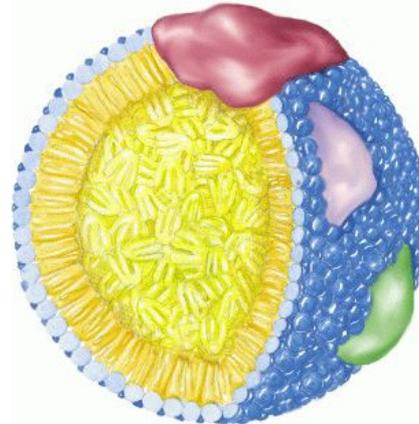
- Идентификация веществ, их пространственного распределения;
- Описание конформационного и фазового состояния молекул, взаимодействия в различных биологических процессах.

Липидные структуры в биологии

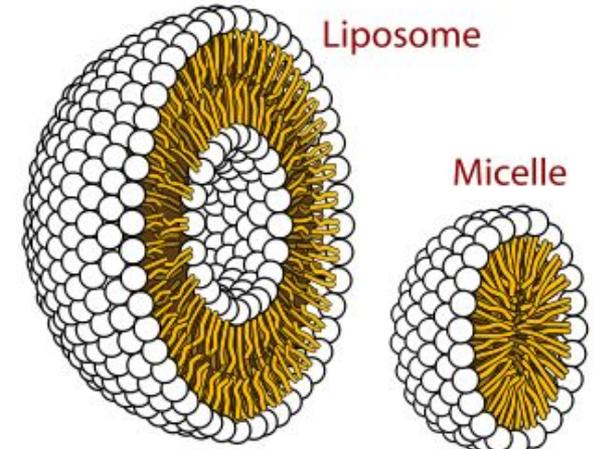
**клеточные
мембраны**



**липидные
капли**

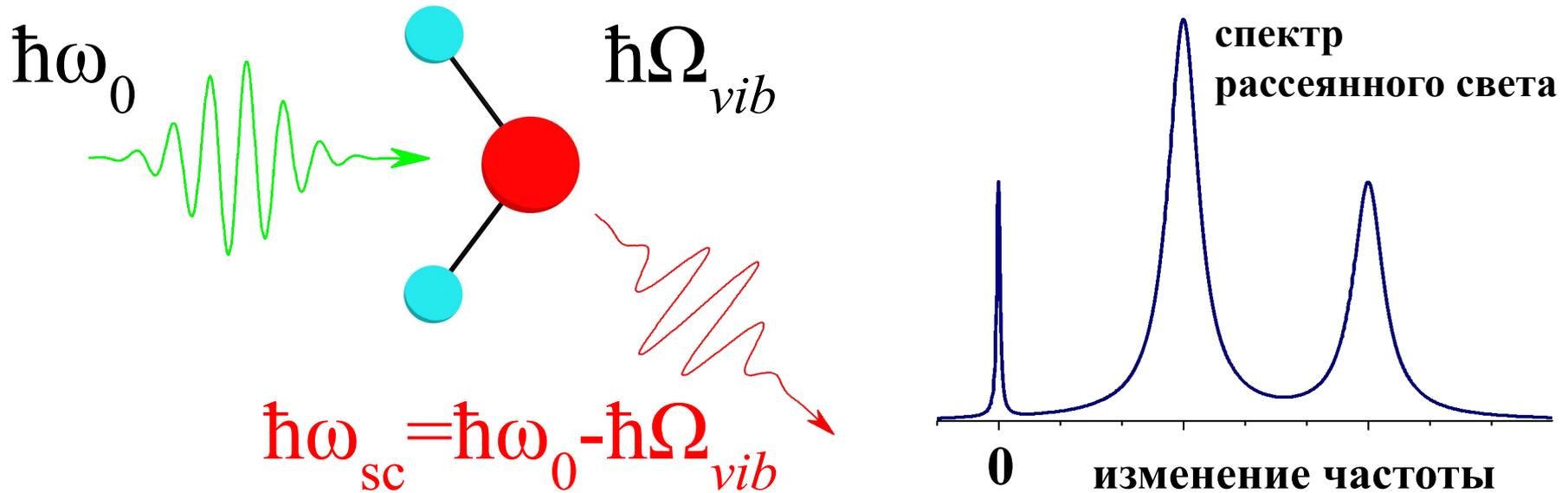


**средства
доставки**



Модельные (биомиметические) структуры имеют более простой состав и служат заменой реальным структурам в эксперименте

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС)



Спектр КРС отражает колебательный спектр материала и содержит информацию о его химическом составе и фазовом состоянии

Основное применение спектроскопии КРС:

Идентификация вещества, его фазового состояния

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС)

Что мы хотим узнать о липидах?

1). Связь внутренних и внешних степеней свободы со спектром КРС.

— Возможность характеризовать состояние молекул по спектрам КРС для различных задач биофизики.

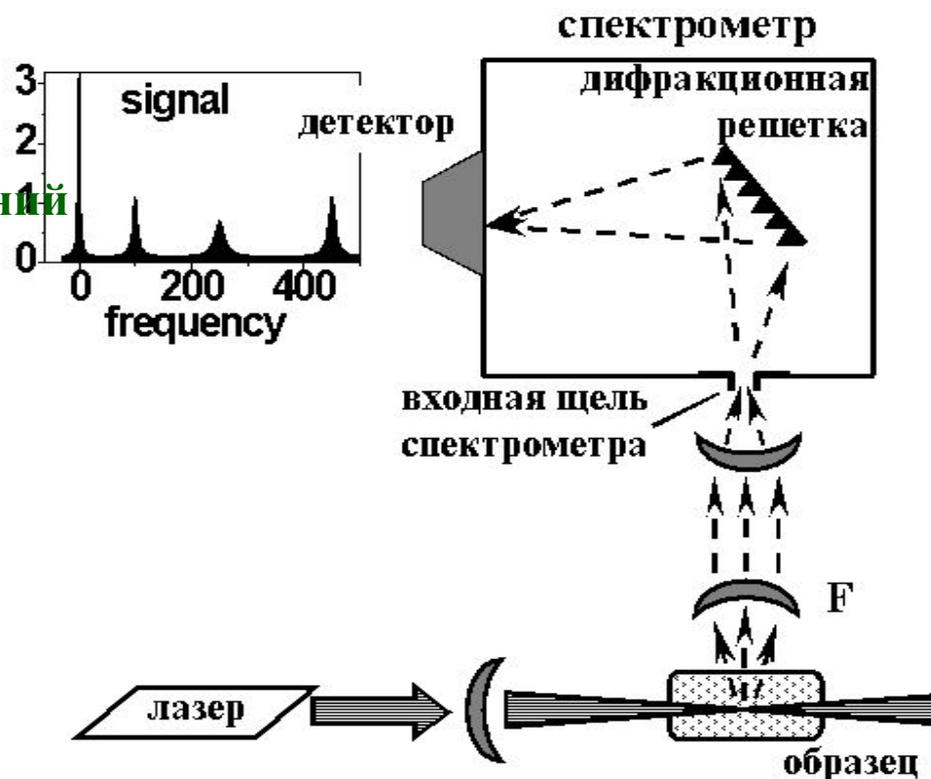
2). Связь спектров КРС и организации липидных структур на нанометровом масштабе.

— Изучение нанометровой структуры липидных мембран

3). Идентификация молекул, их фазового состояния и пространственного распределения в биологических образцах по спектрам КРС.

— Решение биологических задач

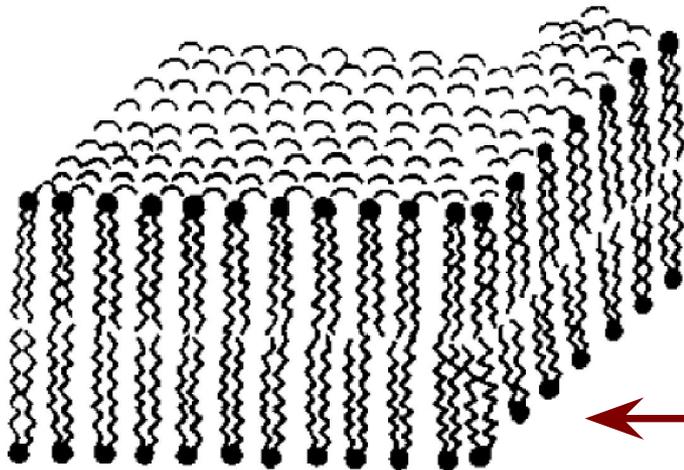
Схема КР-эксперимента



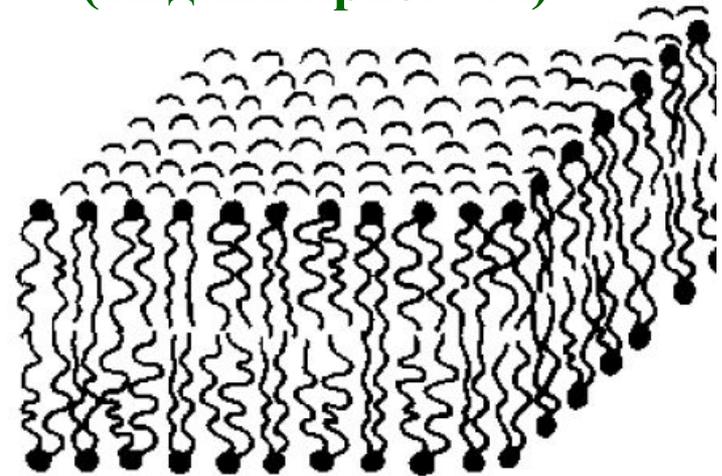
Возможности спектроскопии КРС при изучении конформаций биомолекул

Фазовый переход фосфолипидных мембран

гель



флюид
(жидкий кристалл)



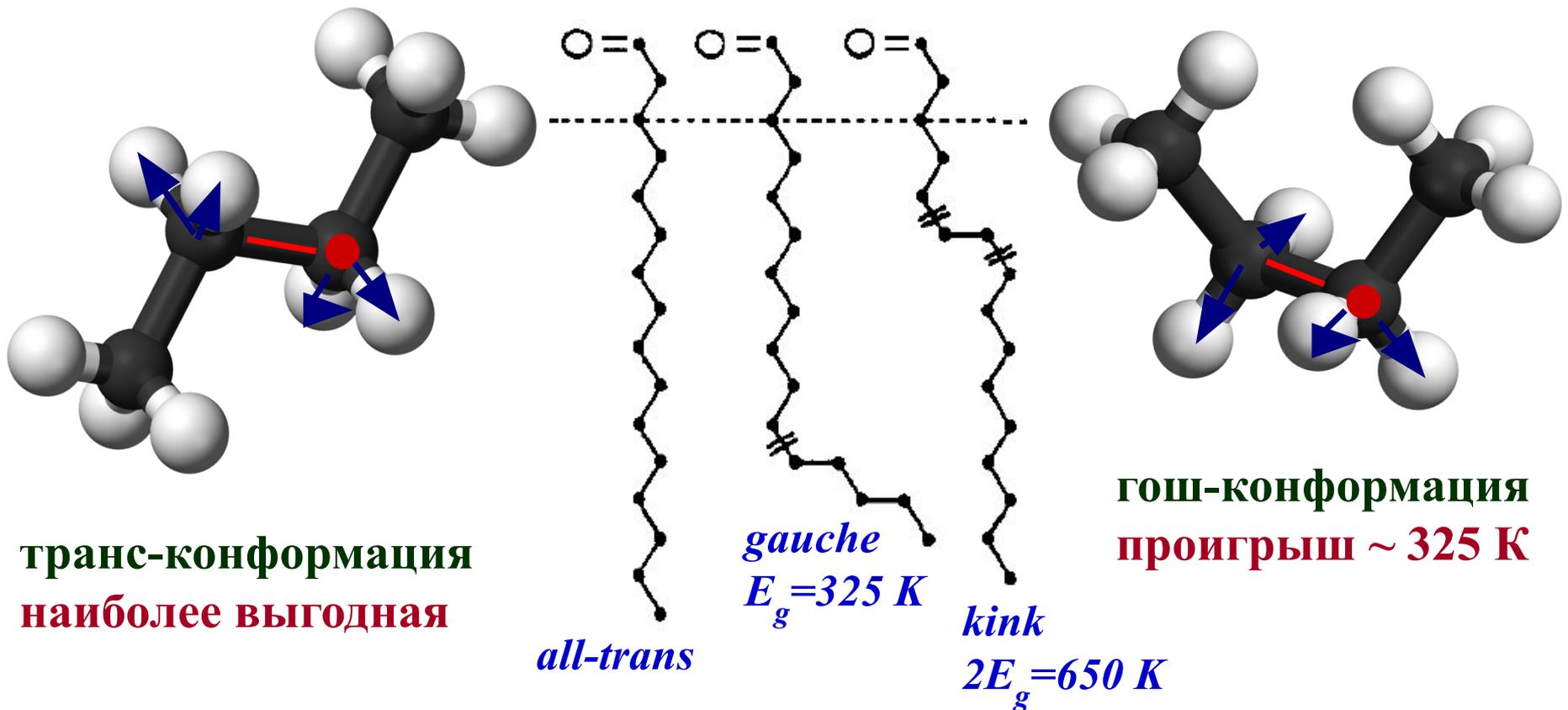
T_m

Как конформационные состояния неполярных хвостов меняются при изменении температуры ниже T_m ?

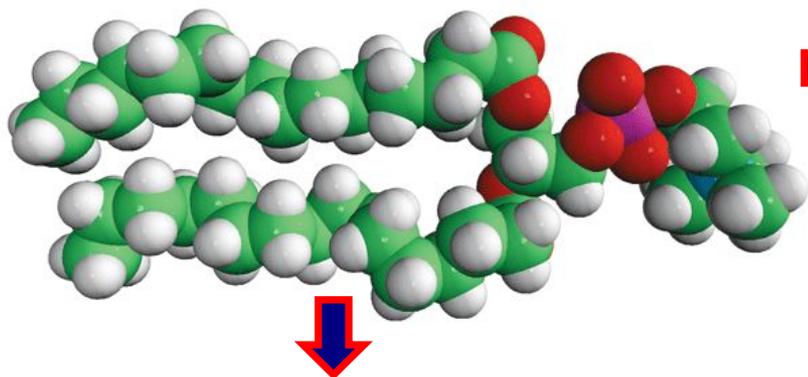
Можно ли на этот вопрос ответить с помощью спектроскопии КРС?

«Дискретная» характеристика конформационного состояния

Есть наиболее выгодные взаимные ориентации мономеров углеводородной цепочки

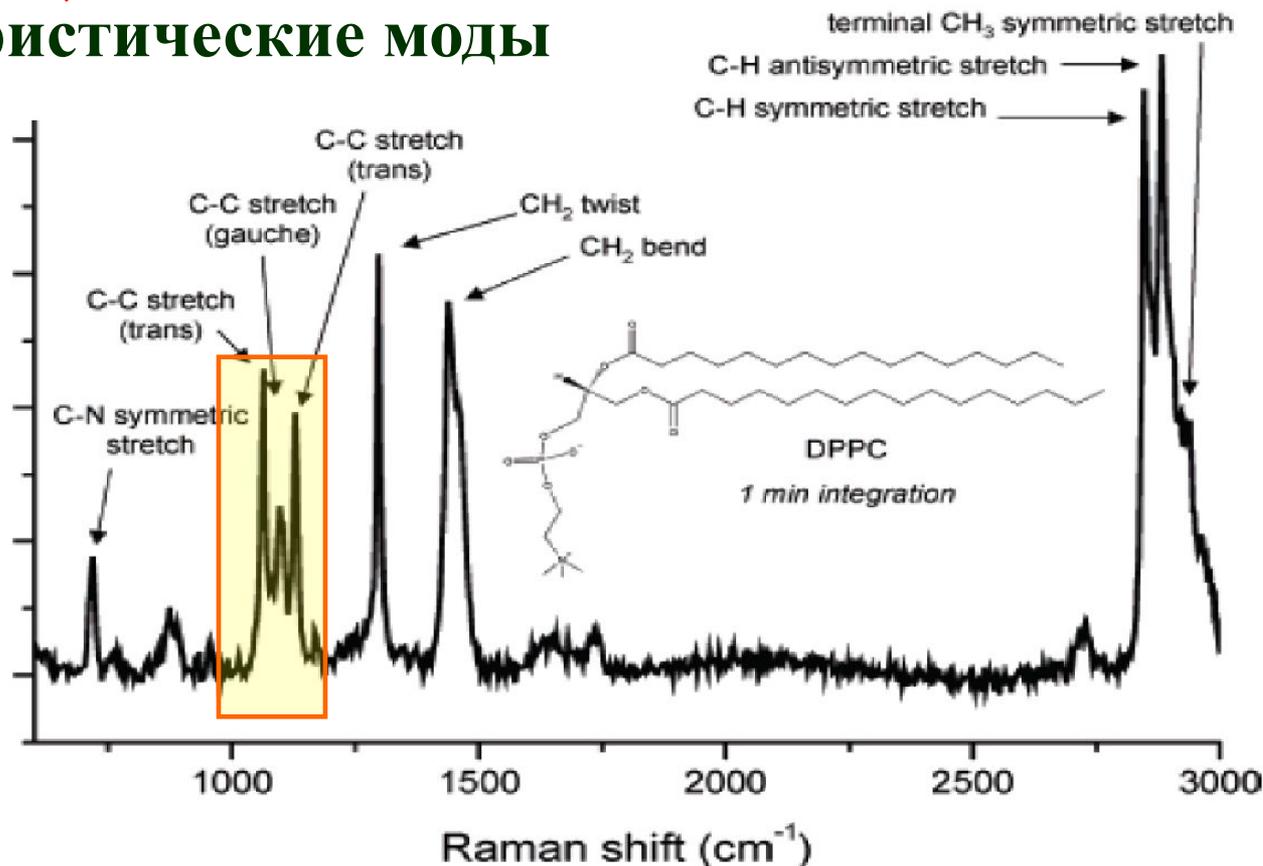


Колебательная задача



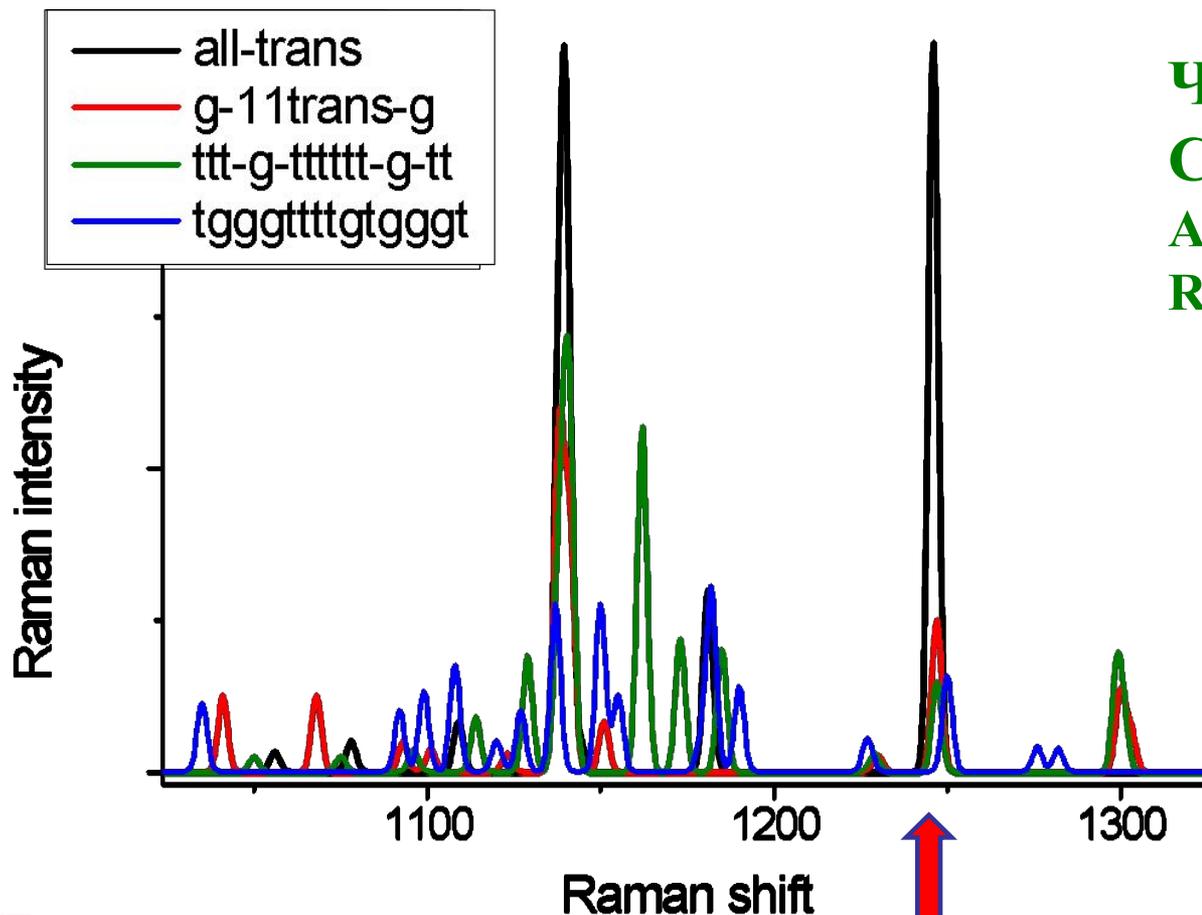
→ $3N-6$ колебаний ($N = 130$)
распределение колебательных мод и их КР-интенсивность зависят от конформации

характеристические моды



C.B. Fox *et al*
J.Phys.Chem.B
2007

СС моды – зависимость от конформации

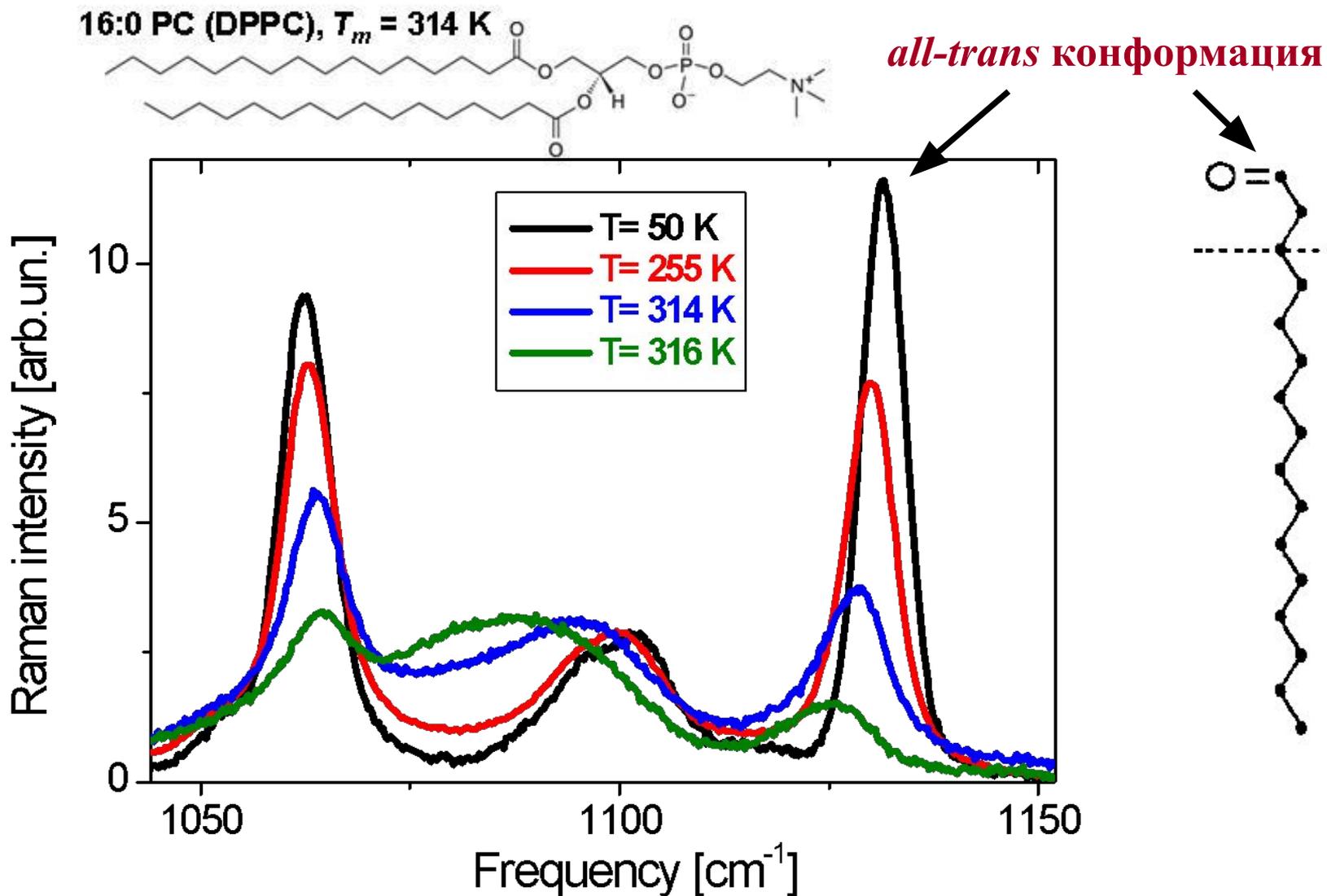


Численный счет для
 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$
Адаптация из
R.J. Meier // Polymer, 2002

Идея:

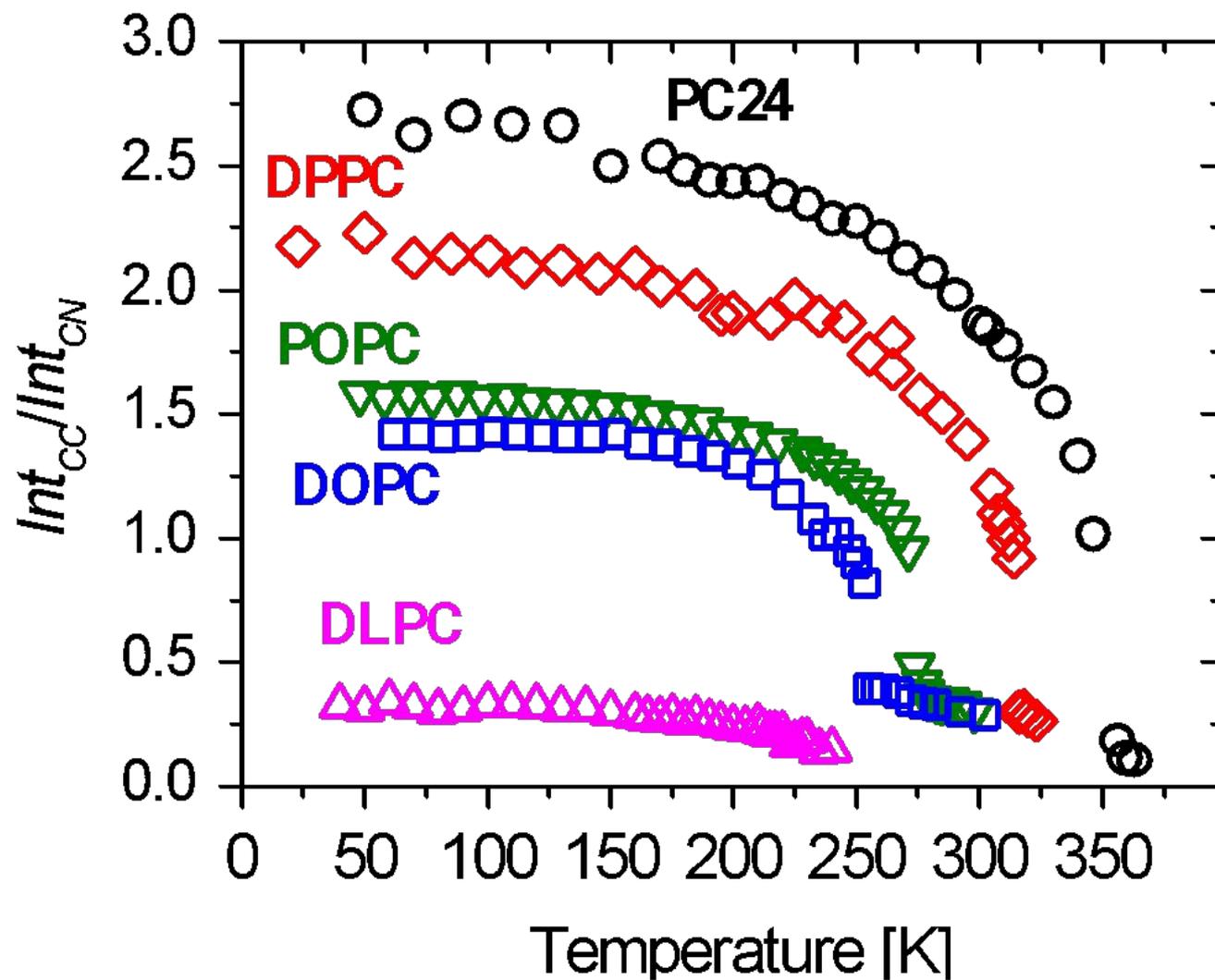
Интенсивность высокочастотной СС-моды отражает число молекул в «основном» состоянии

спектры КРС С-С мод фосфолипидных мембран

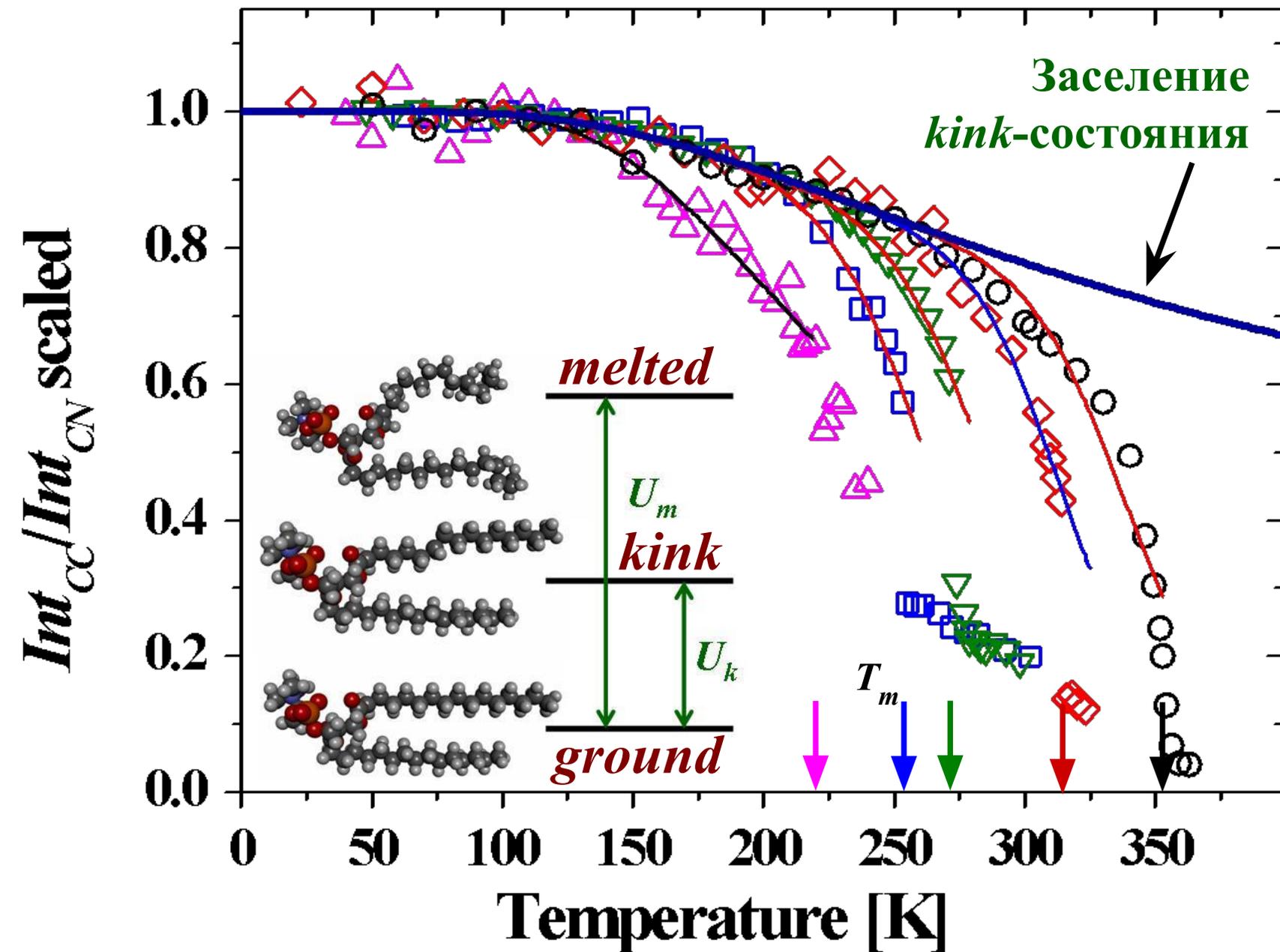


Анализ конформационных состояний по температурному поведению линии 1130 cm^{-1}

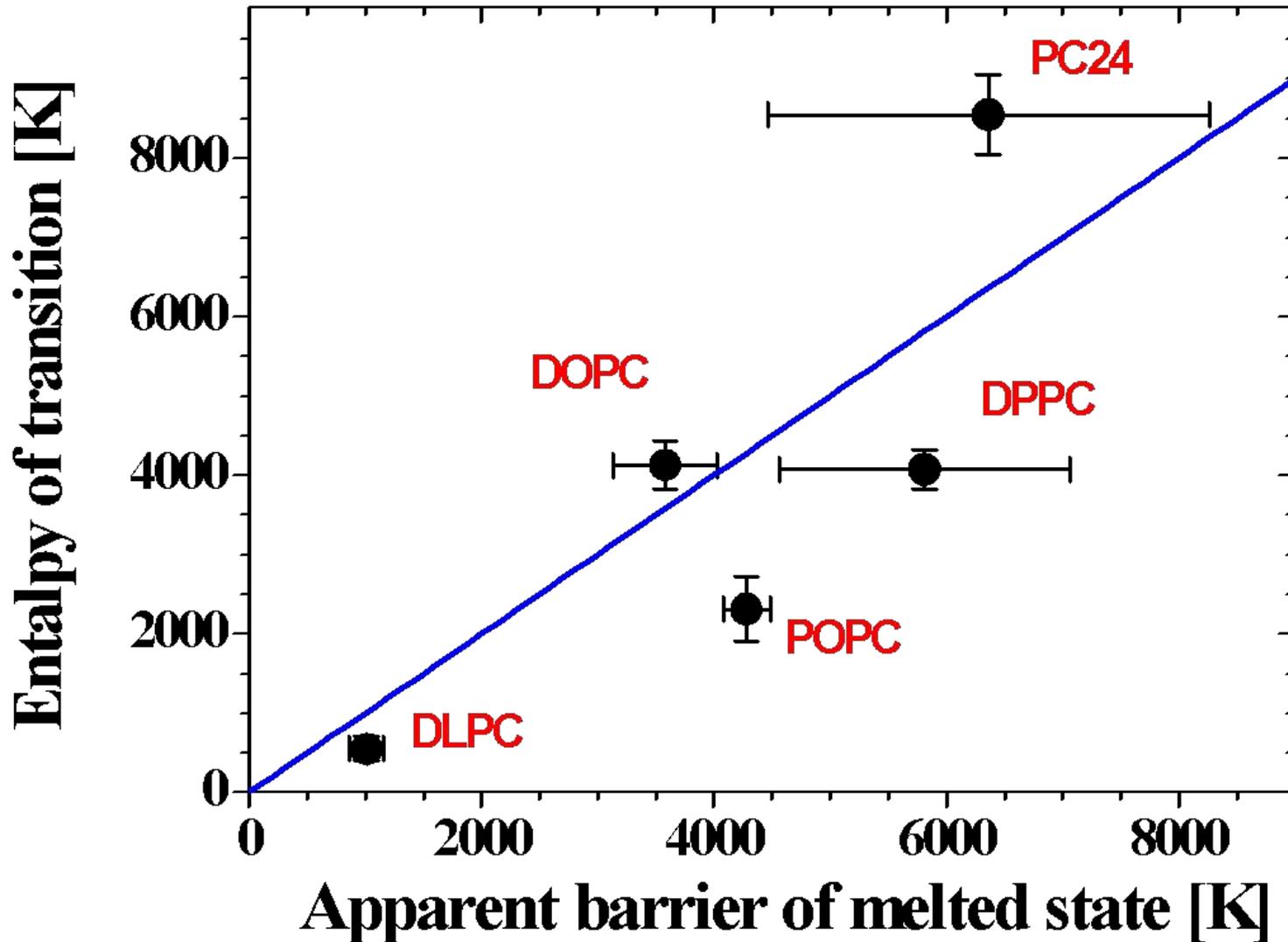
Температурные зависимости КР-интенсивности C-C мод фосфолипидных мембран



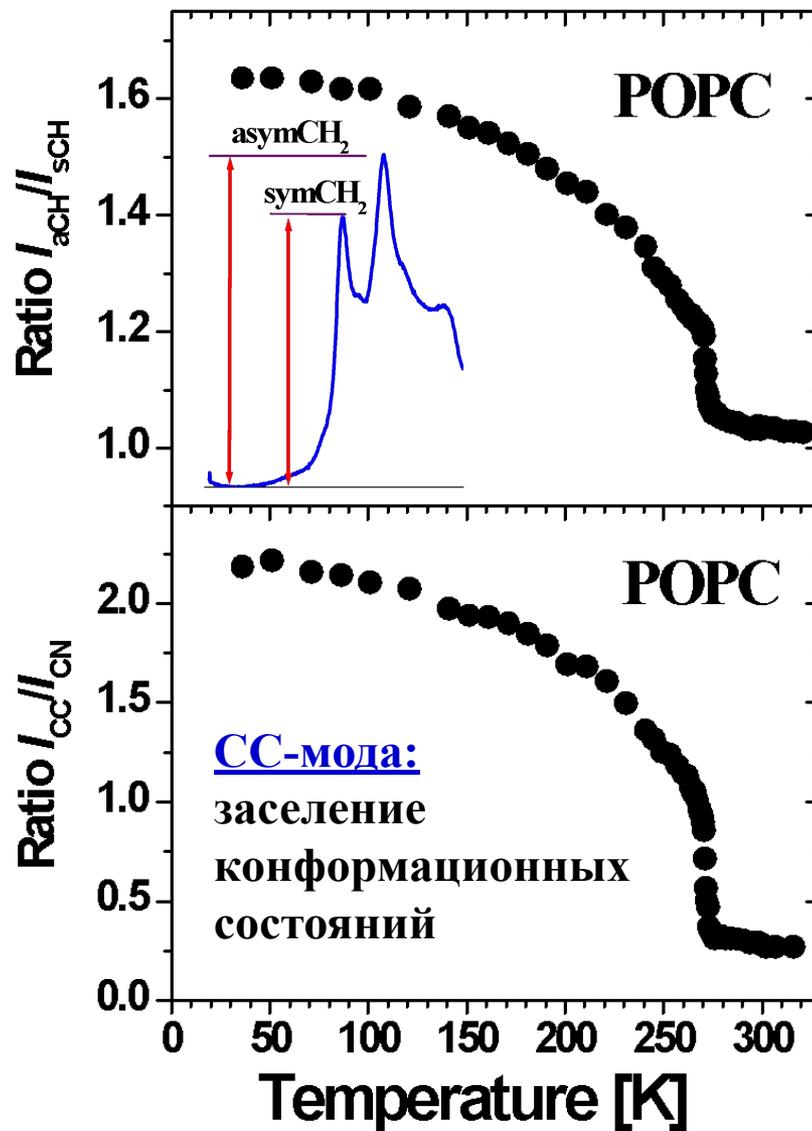
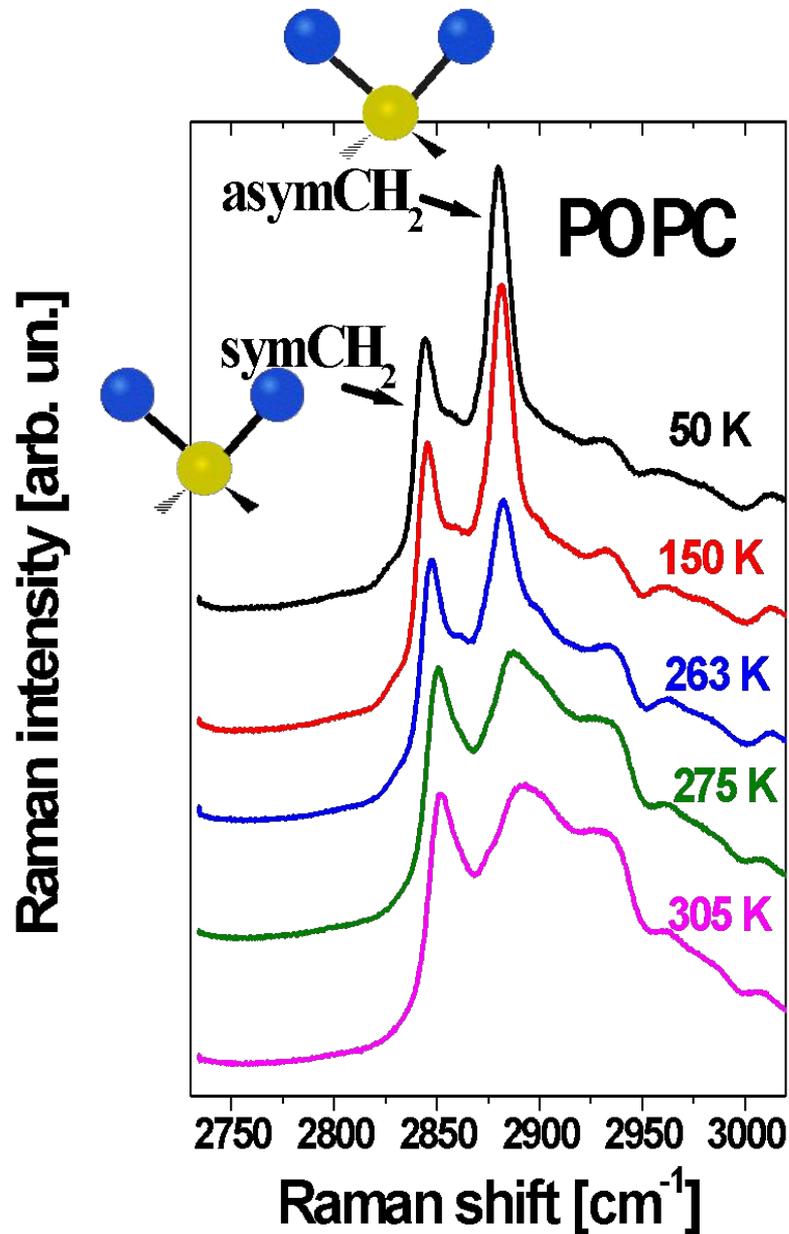
Температурная зависимость интенсивности С-С моды



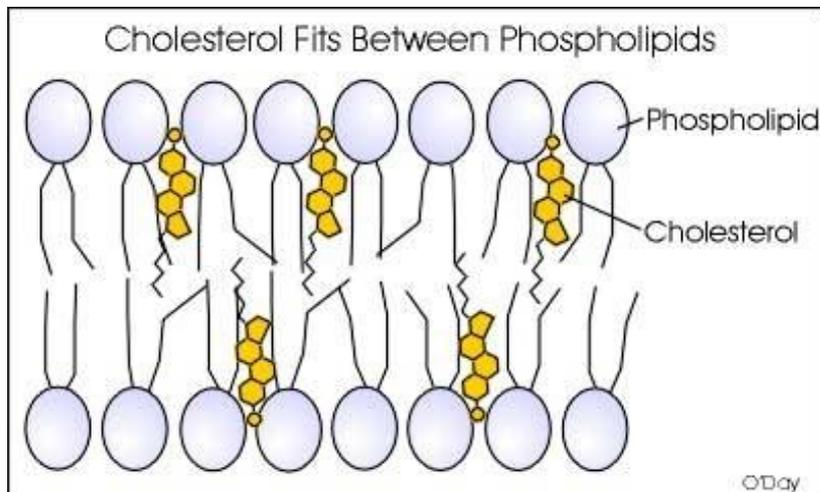
Сравнение барьера для *melted* состояний и энтальпии перехода гель-флюид



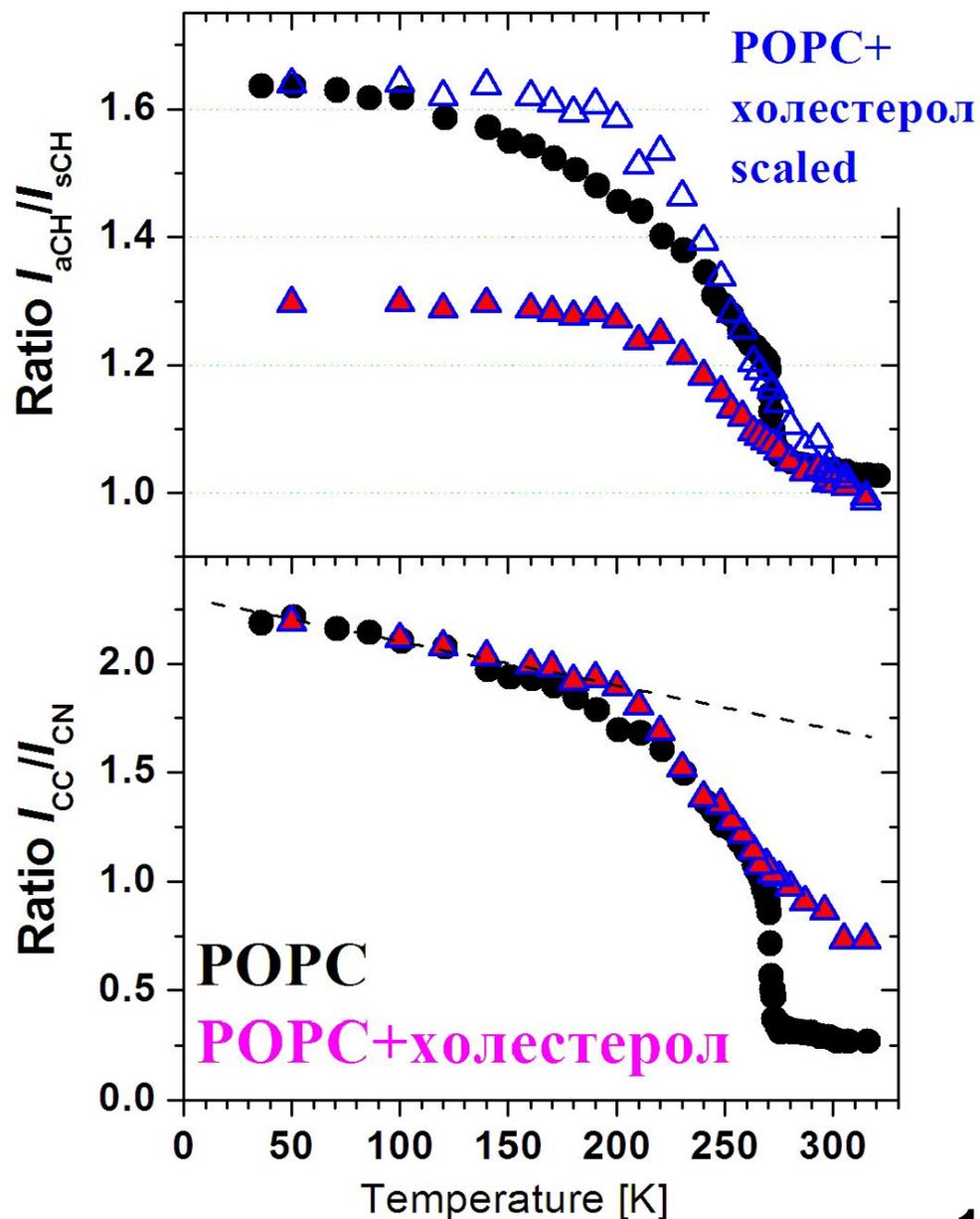
Температурная зависимость интенсивности CH_2 мод



Температурная зависимость интенсивности CH_2 мод



Поведение CH_2 -мод чувствительно не только к конформационному состоянию цепи, но и к латеральному порядку



-Поведение СС мод в спектре КРС позволяет описать конформационное состояние неполярных хвостов фосфолипидных мембран.

- Сравнение поведения СС и СН₂ мод в спектре КРС позволяет делать выводы о характере латерального порядка.

Перспективы применения этих знаний:

- для многокомпонентных мембран и к проблеме латеральных неоднородностей в этих мембранах (проблема «рафтов»);**
- для исследования лекарственных средств с модельными мембранами;**
- для описания фазовых изменений в биологических объектах при замораживании.**

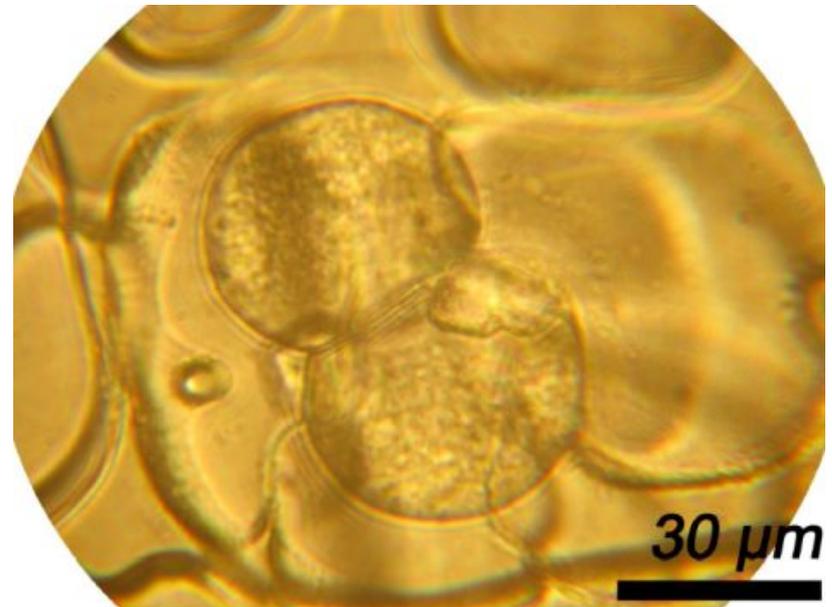
Применение спектроскопии КРС для
характеризации замораживаемых эмбрионов
млекопитающих

Совместно с Сектором криоконсервации и
репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН

$T=+18\text{ }^{\circ}\text{C}$

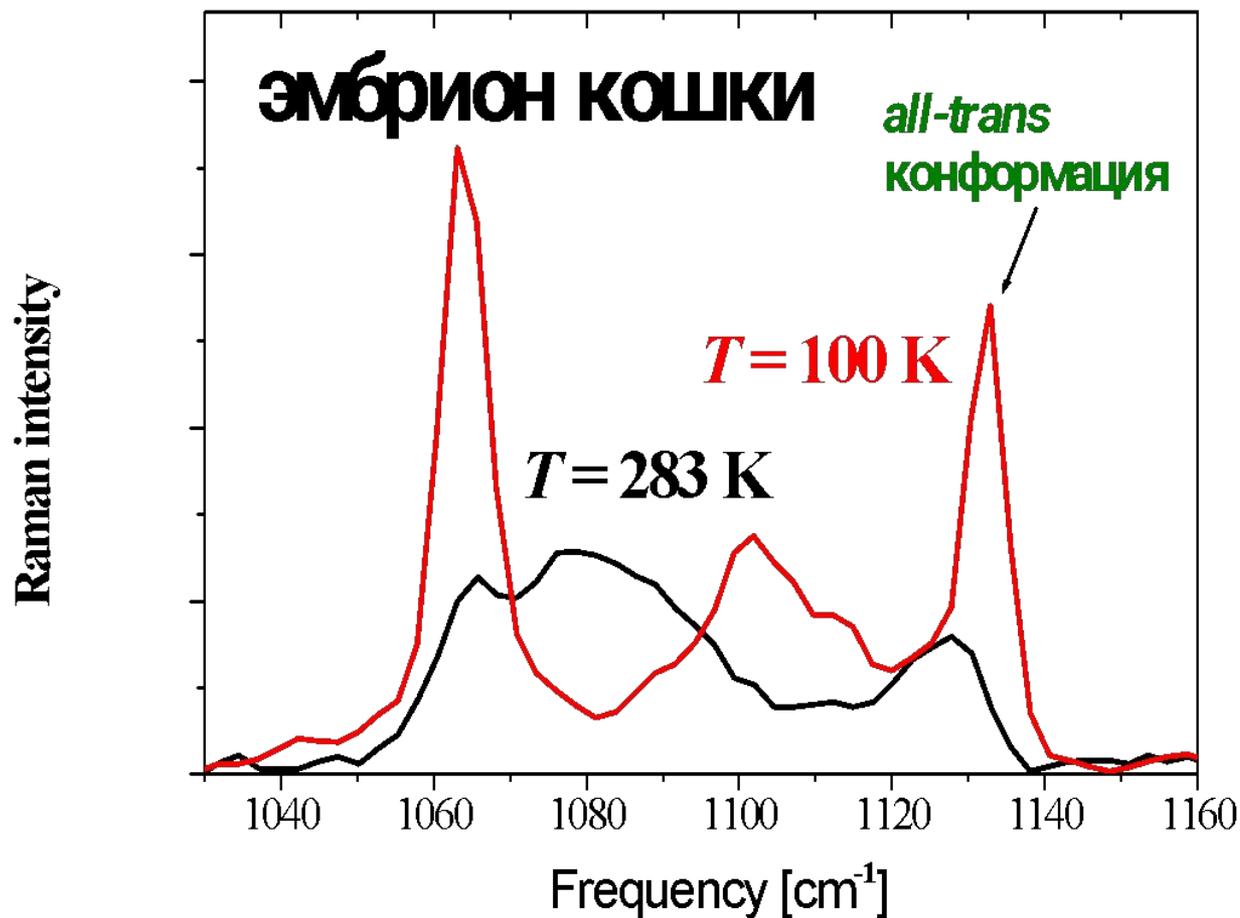


$T=-120\text{ }^{\circ}\text{C}$



Замораживаемые эмбрионы лабораторных мышей

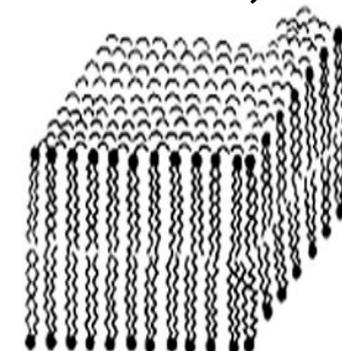
Изменение фазового состояния липидных структур в эмбрионах при изменении температуры



$T = +10 \text{ }^\circ\text{C}$, флюид

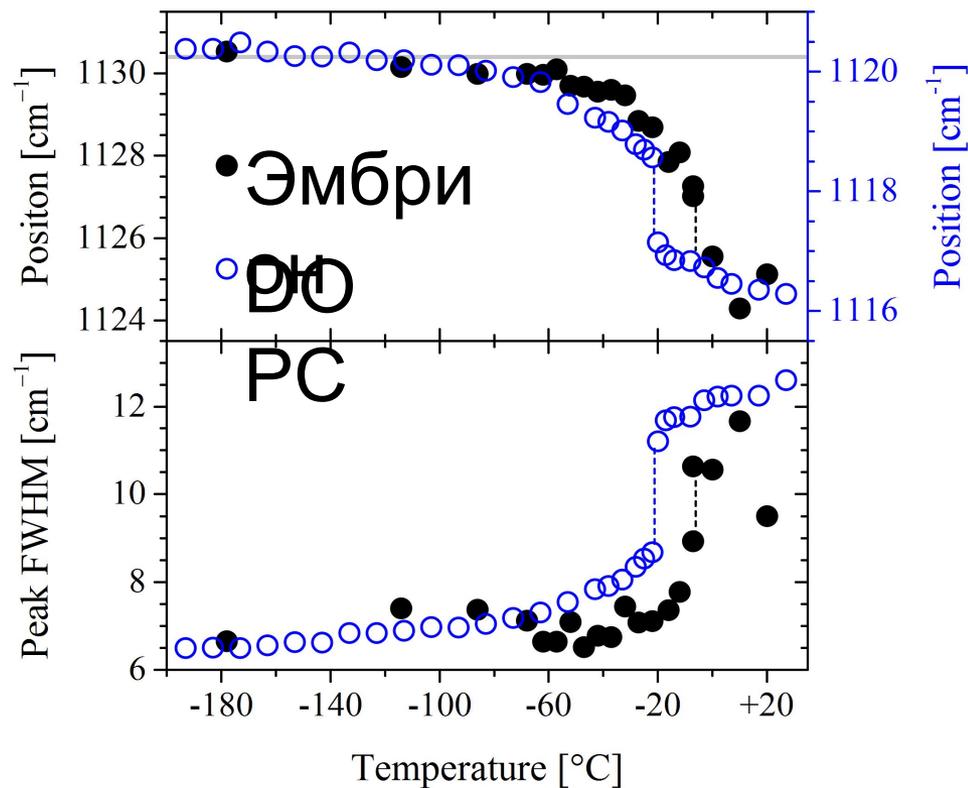
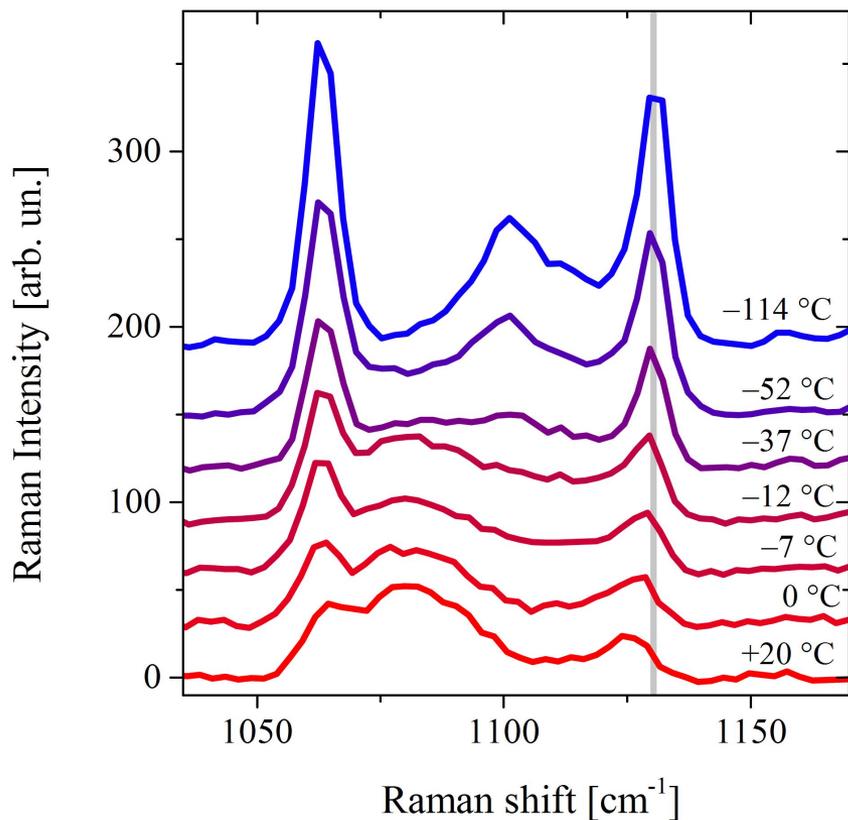


$T = -170 \text{ }^\circ\text{C}$, гель



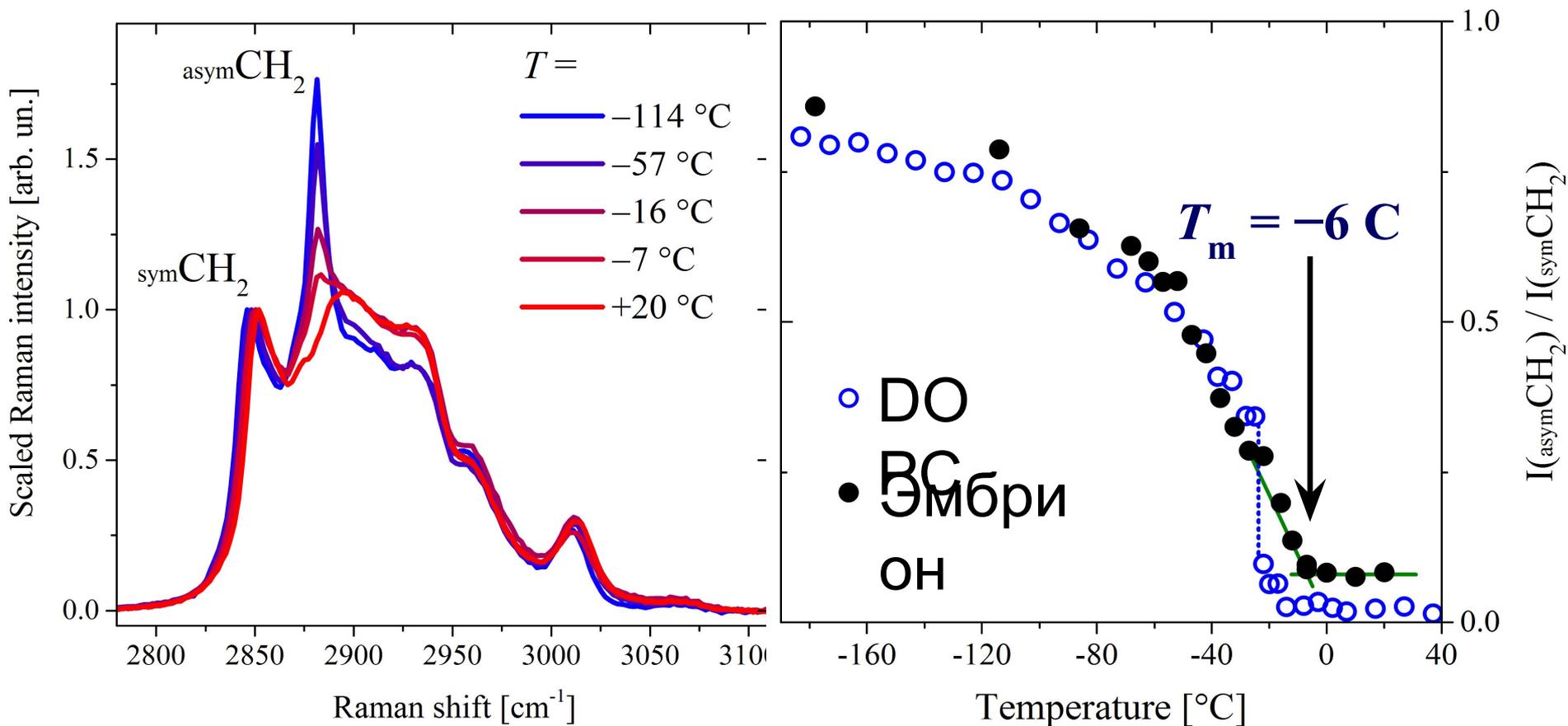
Изменение конформационных состояний хвостов липидов наблюдается также в эмбрионах.

Температурная эволюция С-С мод в замораживаемом эмбрионе кошки



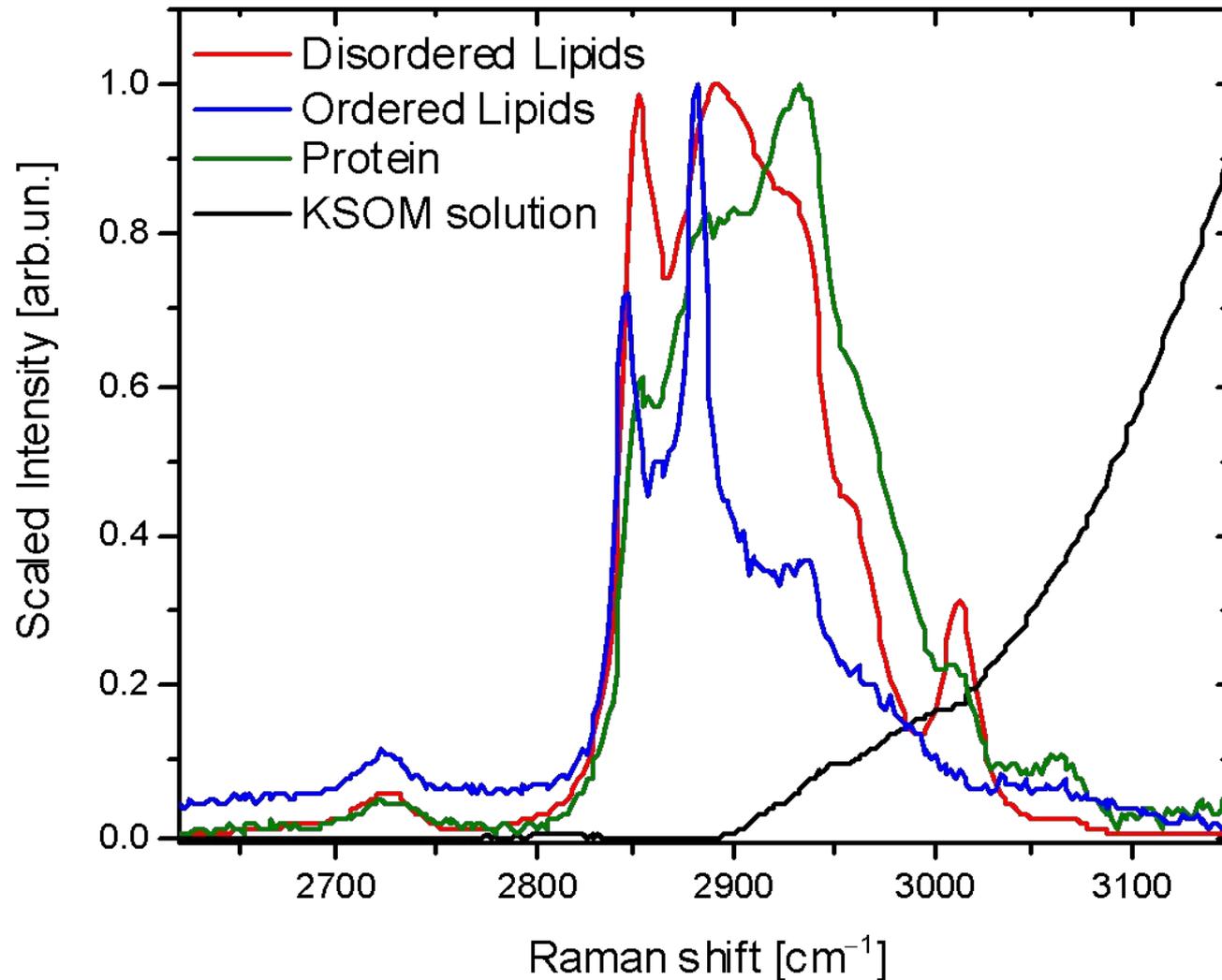
Фазовый переход в липидных гранулах может быть обнаружен по скачку в параметрах “*all-trans*” моды.

Температурная эволюция CH_2 мод в замораживаемом эмбрионе кошки

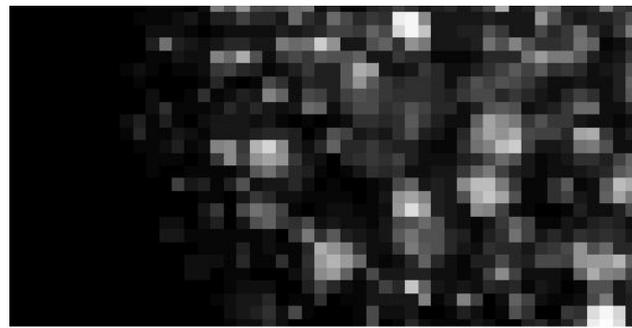
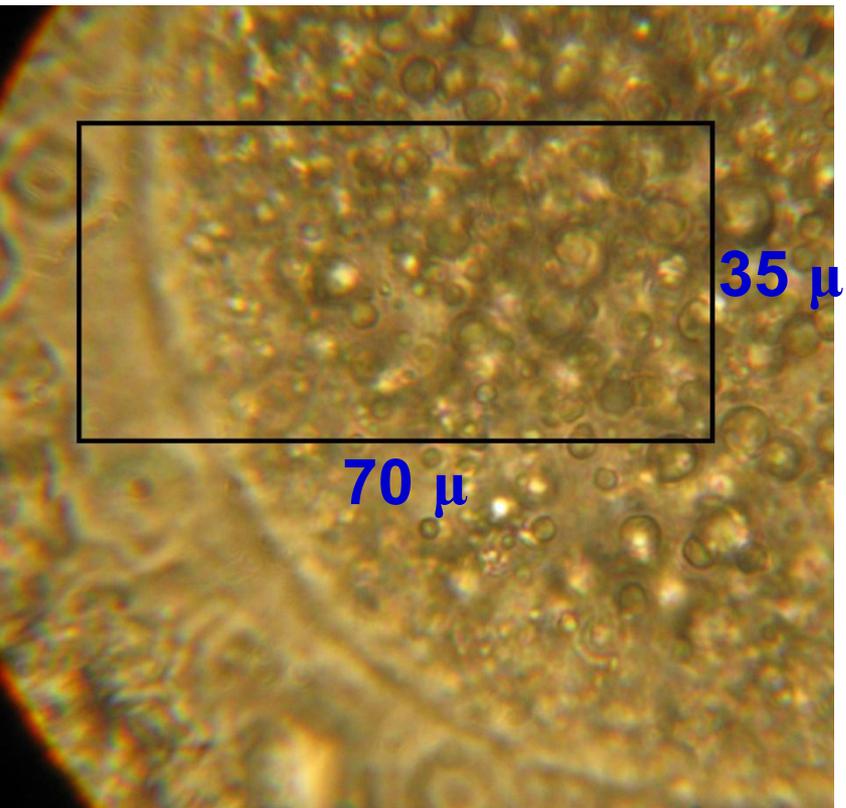


Фазовый переход в липидных гранулах похож на переход в синтетических везикулах.

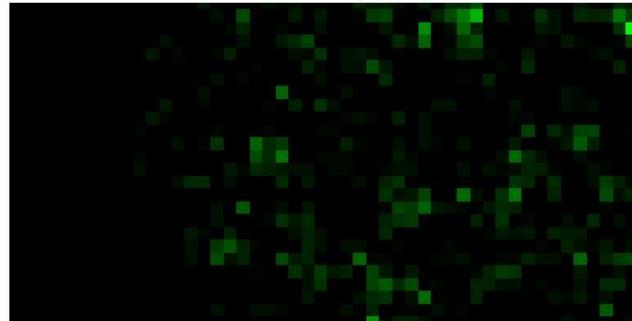
Выделение в спектры КРС в области СН-колебаний различных компонент



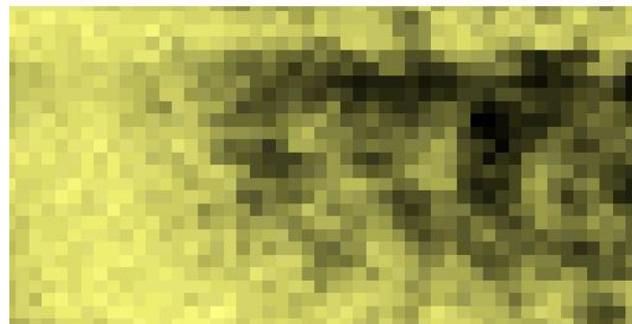
Состояние
липидов
в ооцитах кошки
при $T = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$



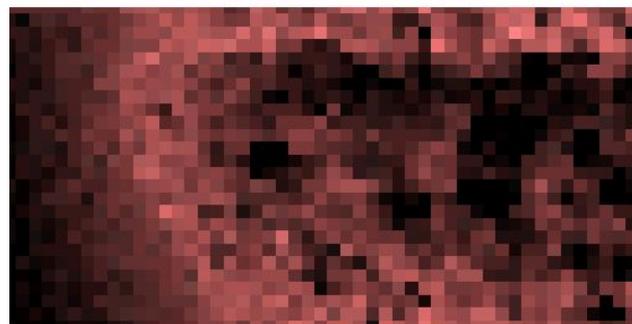
Disordered
Lipid



Ordered
Lipid



KSOM
Solution

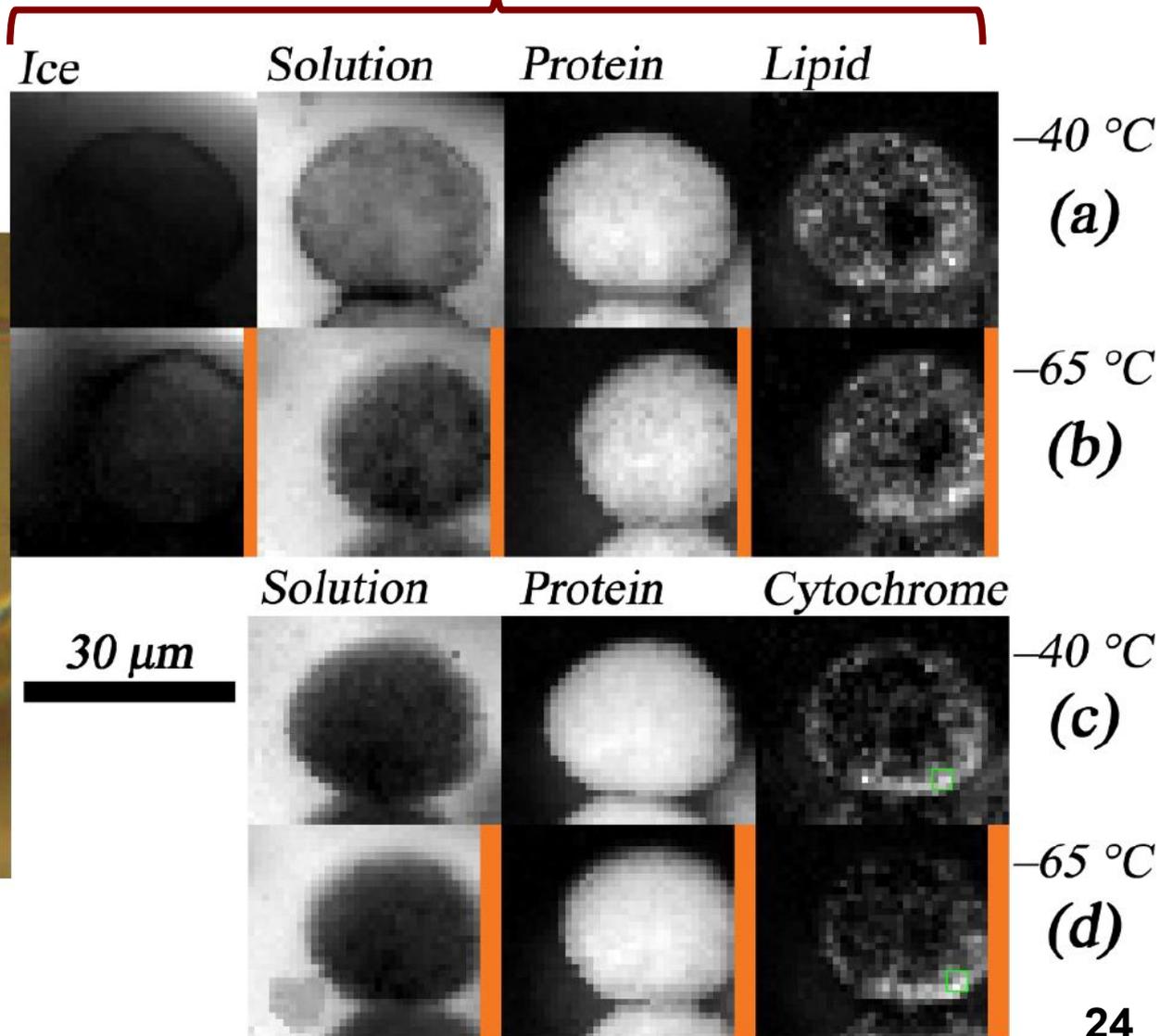


Protein

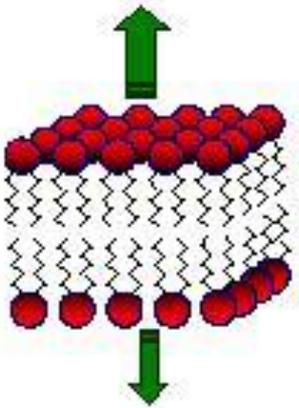
Распределение веществ в эмбрионах мыши

По спектрам диапазона C-H-stretch мод

Картирование



Собственные колебательные моды фосфолипидных мембран в спектрах КРС



Собственные колебания
пластины толщиной $2d$

$$\nu_N \left[\text{cm}^{-1} \right] = \frac{c_s N}{4cd}$$

если $2d = 5 \text{ nm}$, $c_s = 2.4 \text{ km/s}$

$$\Rightarrow \nu_1 = 8 \text{ cm}^{-1}$$

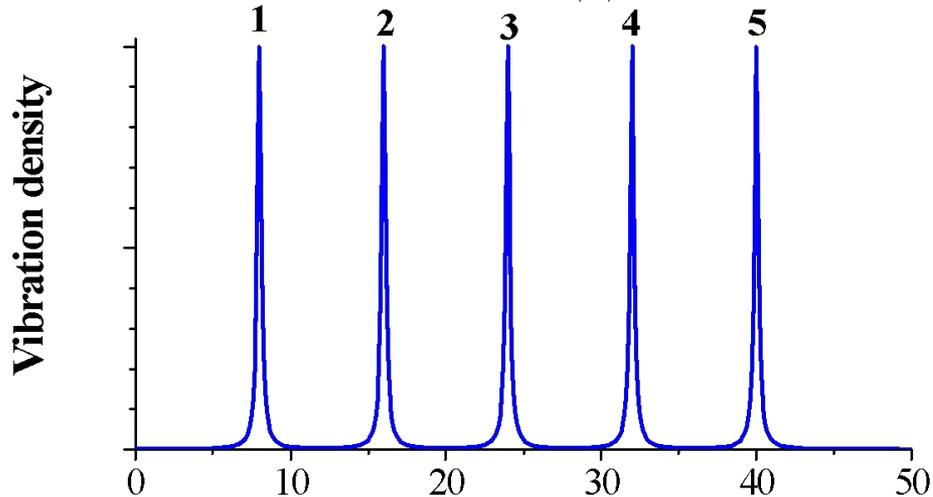
Приближения:

Континуальное описание **продольных** колебательных мод со **свободными граничными** условиями.

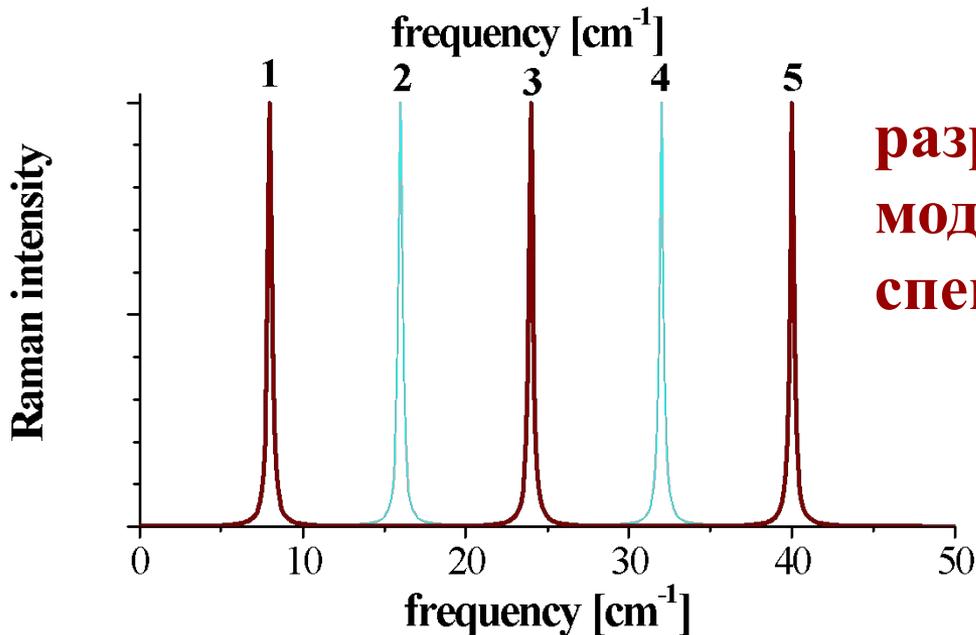
Пренебрегаем вкладом **латеральных акустических мод** в области первых двух-трех собственных мод бислоя ($\sim 8, 16, 24 \text{ cm}^{-1}$) и распространением по нескольким слоям фосфолипидов.

Ожидаемые ТГц спектры КРС фосфолипидных мембран

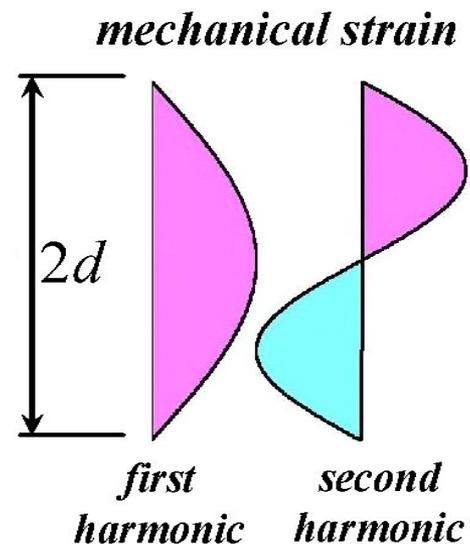
колебательные моды бислоя



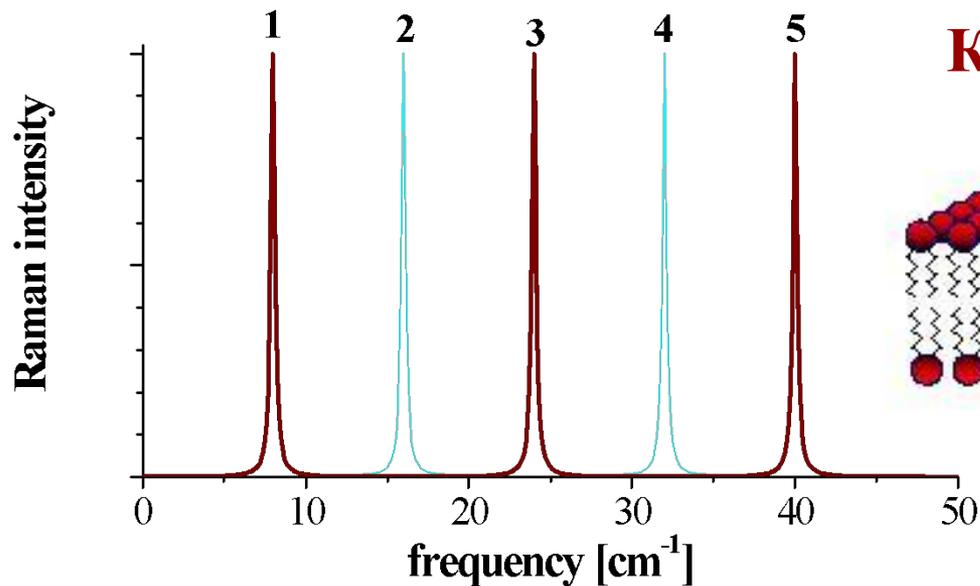
$$\nu_N [cm^{-1}] = \frac{c_s N}{4cd}$$



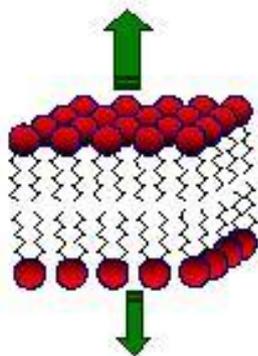
**разрешенные
моды в
спектре КРС**



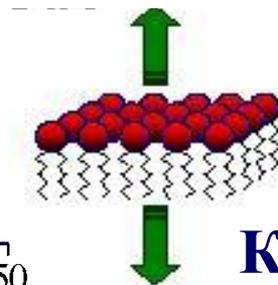
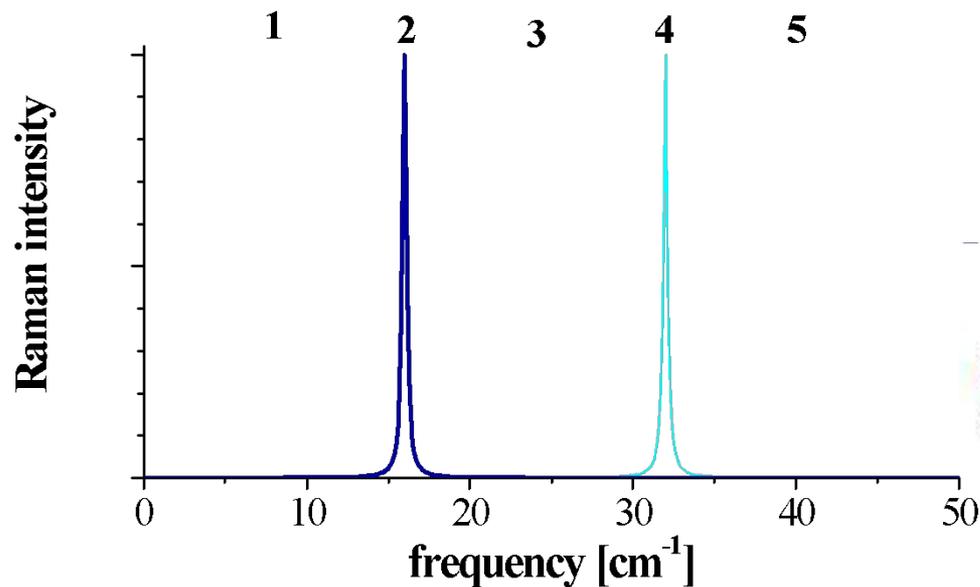
Ожидаемые ТГц спектры КРС фосфолипидных мембран



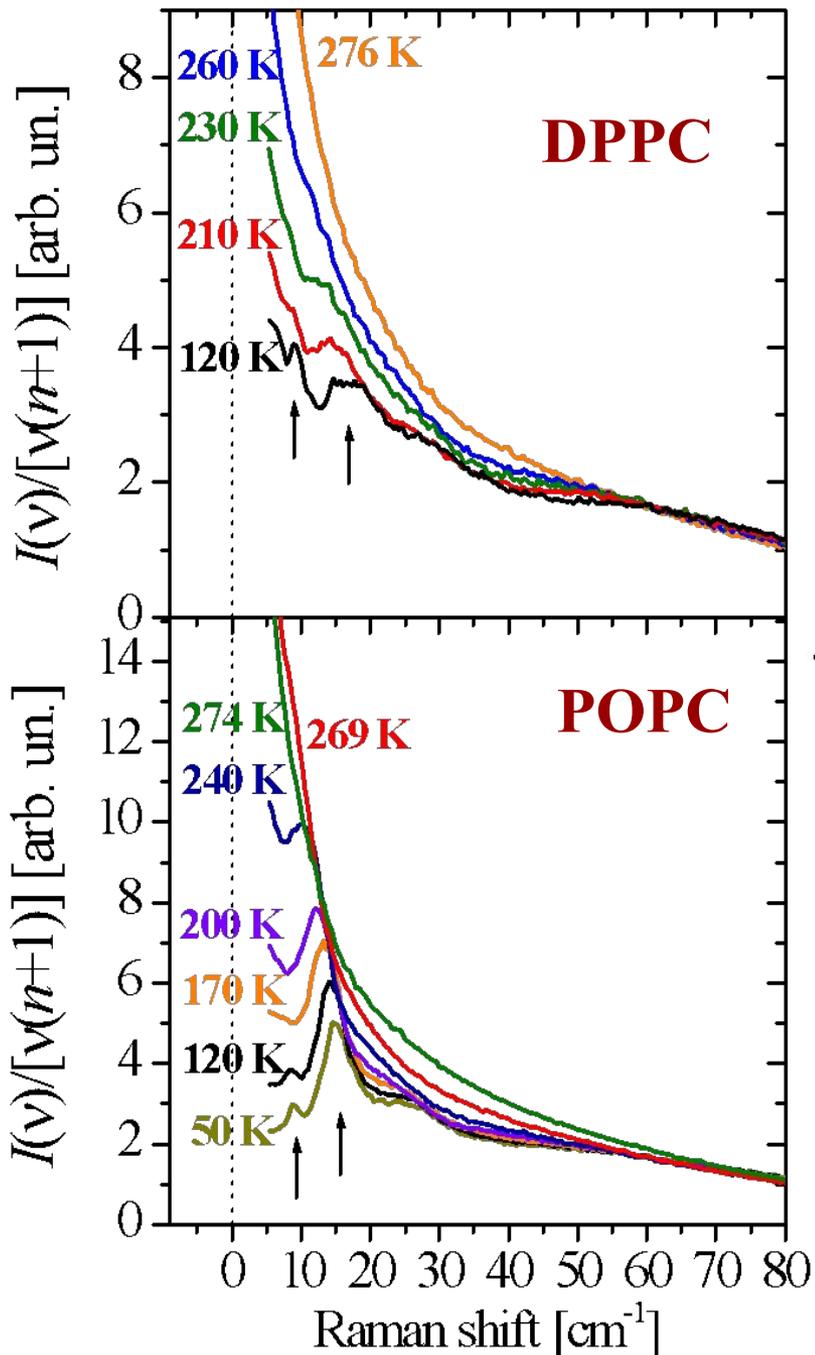
КР-моды бислоя



**А если нет контакта
между слоями?**

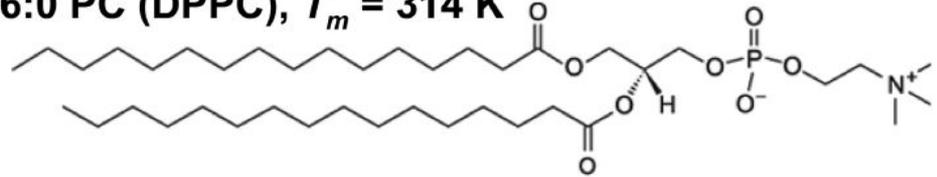


КР-моды монослоя

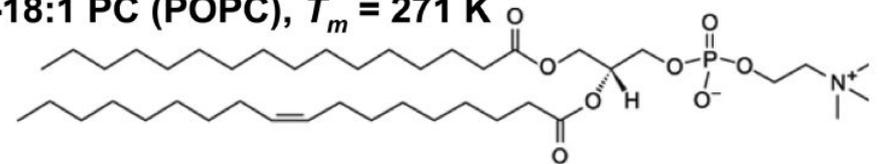


Спектры КРС суспензии фосфолипидных бислоев при различных температурах

16:0 PC (DPPC), $T_m = 314$ K

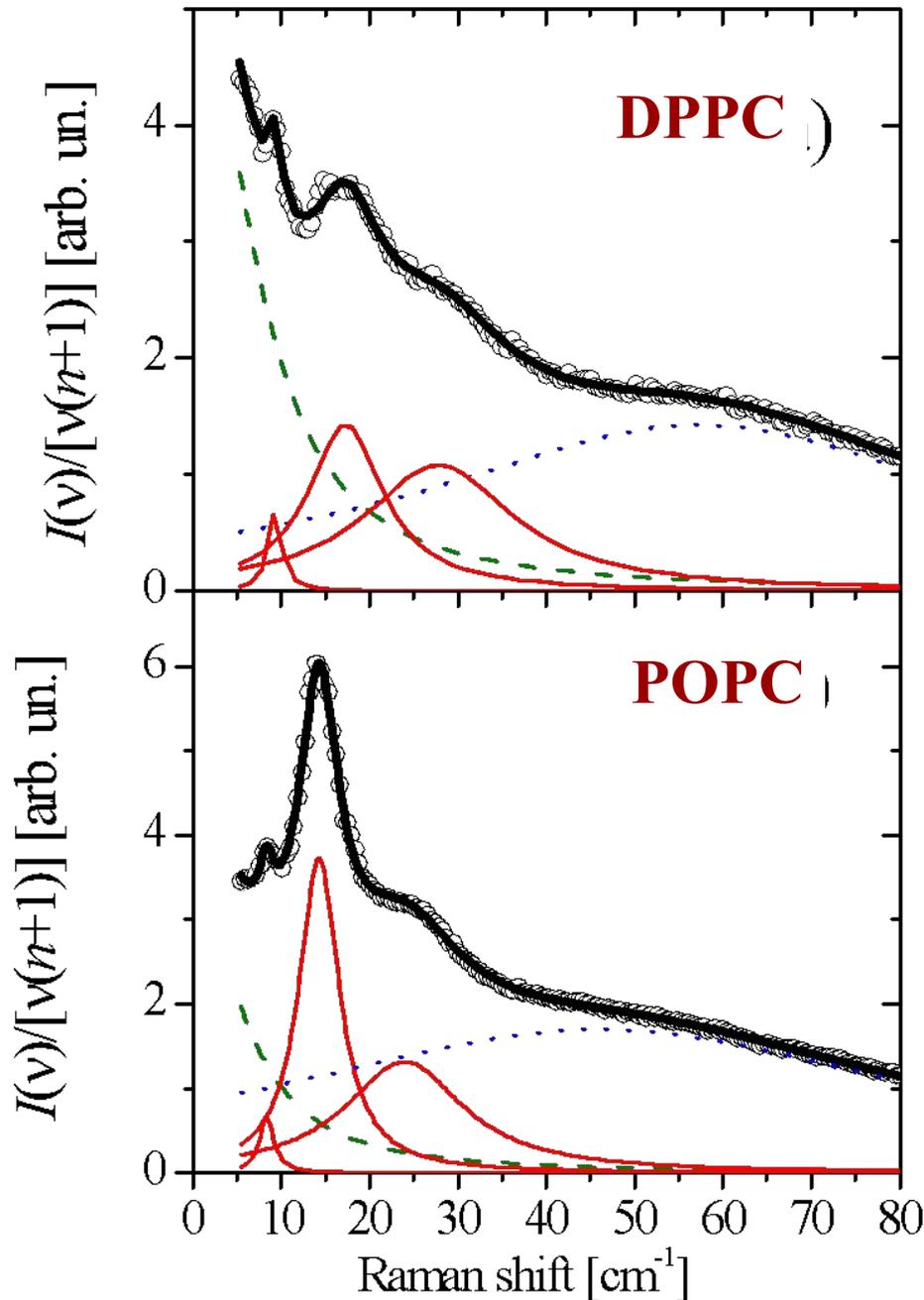


16:0-18:1 PC (POPC), $T_m = 271$ K



Наблюдаются две низкочастотные моды **одновременно!**

Не наблюдаются низкочастотные моды выше температуры плавления льда.



Разложение спектров КРС на компоненты

Центральный пик плюс четыре Лоренца

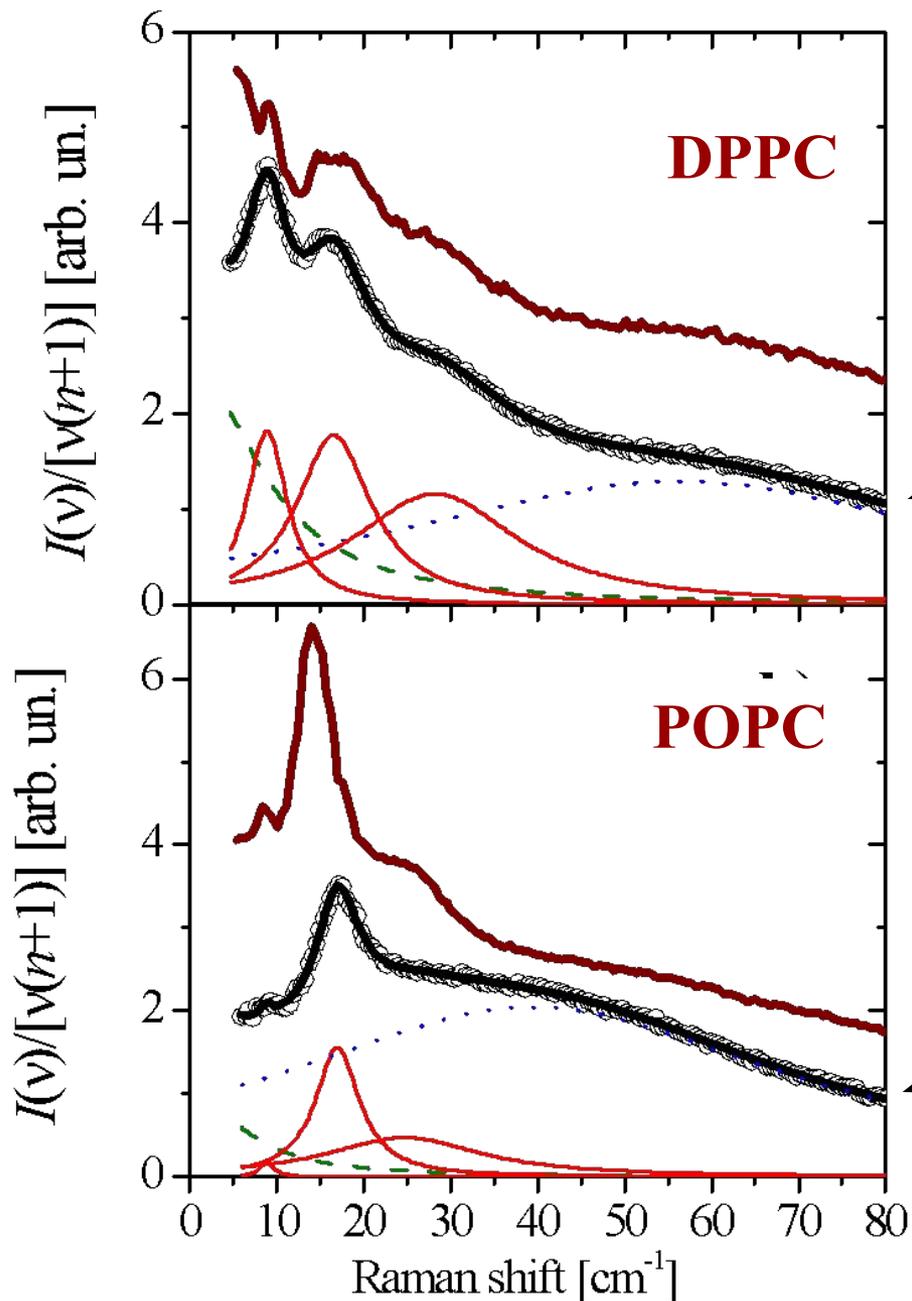
$$\nu_N = 9.3, 17.3, 27.8 \text{ cm}^{-1}$$

$$\nu_N = 8.4, 14.3, 23.9 \text{ cm}^{-1}$$

Возможные интерпретации проявления в спектре КРС двух первых пиков одновременно:

- «Промежуточный» тип контакта между двумя монослоями
- Сосуществование областей с «хорошим» и «плохим» контактом

Эффекты синтеза, добавления холестерина



$$\nu_N = 9.3, 17.3, 27.8 \text{ cm}^{-1}$$

← Образец после длительного
отжига при -20 °C

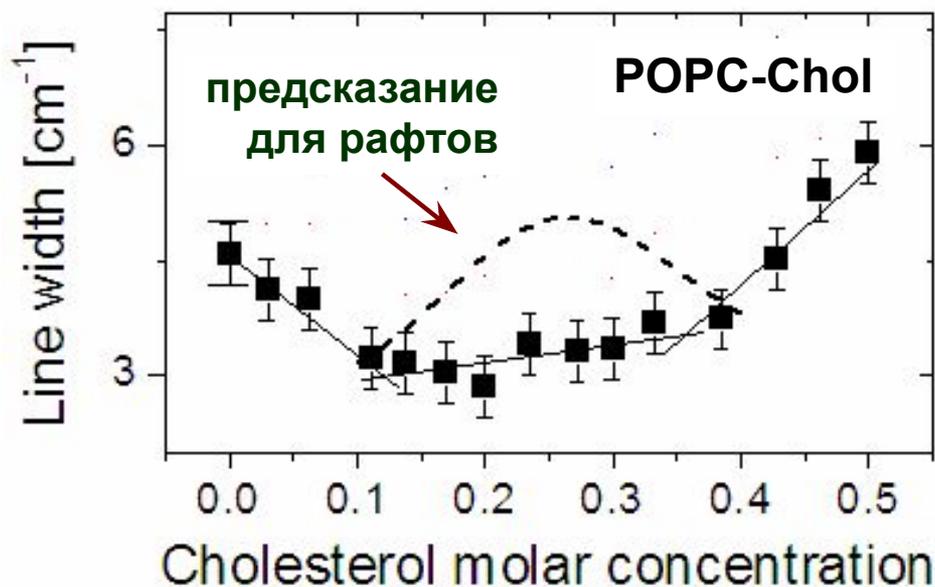
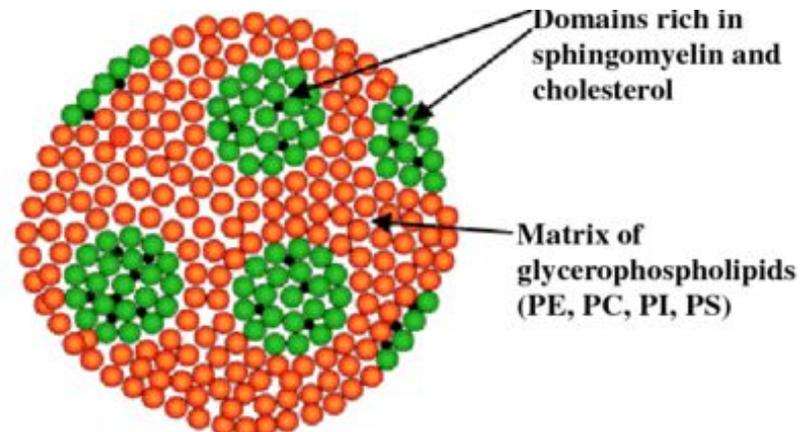
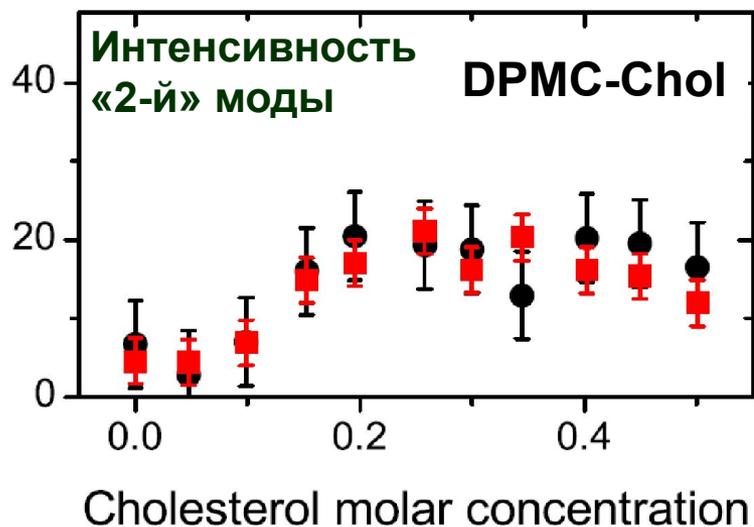
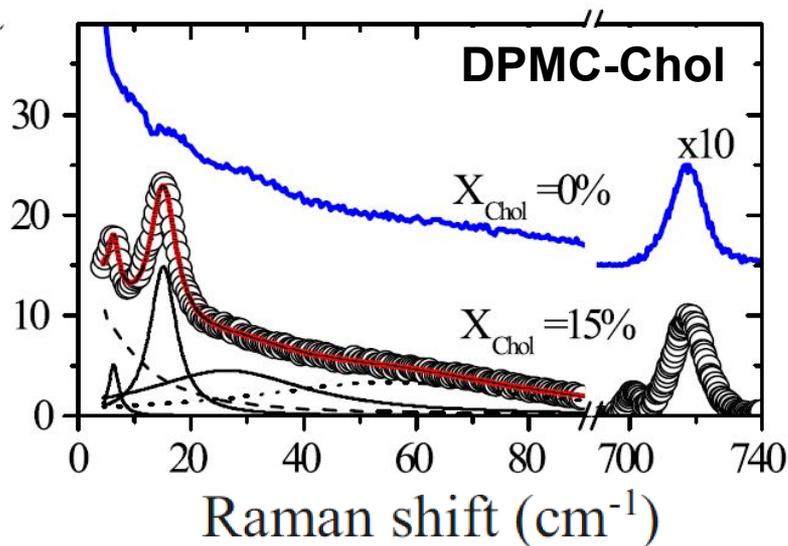
$$\nu_N = 8.9, 16.6, 28.2 \text{ cm}^{-1}$$

$$\nu_N = 8.4, 14.3, 23.9 \text{ cm}^{-1}$$

← Образец с холестерином

$$\nu_N = 8.8, 17.0, 24.6? \text{ cm}^{-1}$$

Исследование образования рафтов в бинарных системах фосфолипид-холестерин по спектрам НЧ-КРС



Заключение

Спектроскопия комбинационного рассеяния света может применяться для описания липидных структур, включая:

- Характеризацию конформационного состояния (по модам СС).
- Характеризацию латерального порядка (по модам CH_2 и сравнению с поведением СС)
- Описание собственных колебательных мод фосфолипидных слоев

Эти возможности спектроскопии КРС могут быть эффективно применены при решении различных биологических задач, включая:

- Проблемы криоконсервации
- Описание образования рафтов в биомембране
- Взаимодействие с лекарственными средствами