

ПРИРОДА

12 12



Стоячие рентгеновские волны и биологическое материаловедение

М.В.Ковальчук, Н.Н.Новикова, С.Н.Якунин

Открытие дифракции рентгеновских лучей, столетний юбилей которого отмечался в уходящем году, относится к важнейшим научным событиям XX в. Для развития рентгеновской физики результаты, полученные М.Лауэ, В.Фридрихом и П.Книппингом, имели огромное значение, ведь именно в этих экспериментах была убедительно доказана волновая природа рентгеновских лучей и определена длина волны этого излучения. Однако настоящий переворот открытие дифракции рентгеновских лучей произвело в физике твердого тела и кристаллохимии, в корне изменив представление ученых о строении материи и способах ее изучения. В наши дни дифракционный рентгеноструктурный анализ — один из наиболее мощных инструментов для исследования кристаллических материалов, включая такие сложные кристаллы, как белковые.

Важный шаг в рентгеновских исследованиях был сделан в конце XX в. Освоение высокоинтенсивных источников рентгеновского излучения — синхротронов — дало реальную возможность изучать слабодифрагирующие системы и таким образом перейти от структурной диагностики объема вещества к поверхности. С другой стороны, этот поворот был продиктован

© Ковальчук М.В., Новикова Н.Н., Якунин С.Н., 2012



Михаил Валентинович Ковальчук, член-корреспондент РАН, директор Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Главный редактор журнала «Кристаллография». Область научных интересов — кристаллография и кристаллофизика, физика конденсированного состояния, нанобиоорганические материалы и системы, применение рентгеновского, синхротронного излучения и нейтронов в материаловедении.

Лауреат премии правительства РФ в области науки и техники, премии имени Е.С.Федорова РАН, кавалер орденов «За заслуги перед отечеством» III и IV степеней.



Наталья Николаевна Новикова, доктор физико-математических наук, заведующая лабораторией рентгеновских исследований биоорганических наноструктур того же института. Занимается изучением рассеяния рентгеновского излучения на одномерно-периодических системах, рентгеновскими методами структурной диагностики тонких пленок, применением синхротронного излучения для изучения биоорганических наноматериалов.



Сергей Николаевич Якунин, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории структурного анализа и фазочувствительных методов того же института. Специалист в области физики поверхности и границ раздела, рентгеновской и синхротронной диагностики планарных наноразмерных систем.

самой логикой развития полупроводникового материаловедения [1]. 1970-е годы можно назвать временем бурного развития поверхностно-чувствительных рентгеновских методов, благодаря которым удалось экспериментально реализовать структурные исследования тончайших поверхностных слоев и границ раздела кристаллов. Именно это в значительной степени определило впечатляющие успехи твердотельной микроэлектроники.

Сейчас на наших глазах стремительно формируется новая область физического материаловедения — биоорганическая [1]. Используя способность биологических молекул к самоорганизации, ученые научились «конструировать» биологические наносистемы, обладающие уникальными физико-химическими свойствами. Очевидно, что дальнейшее расширение границ применения этих новых материалов немыслимо без создания адекватных методов их характеристики. Поэтому сегодня одно из главных направлений в рентгеновских исследованиях связано с развитием методов структурной диагностики так называемых жидких конденсированных сред (soft condensed matter). Об одном из таких новых направлений и пойдет речь в этой статье.

Метод стоячих рентгеновских волн

Образование стоячей волны можно наблюдать при сложении двух когерентных волн одинаковой амплитуды в области их перекрытия. Характерная особенность волнового поля стоячей волны — периодическое изменение амплитуды колебаний с координатой. Особые точки, в которых амплитуда колебаний равна нулю, получили название «узлы стоячей волны», между ними расположены места с максимальным значением амплитуды — пучности. Расстояние между соседними узлами строго фиксировано и называется периодом стоячей волны. Еще одно важное свойство стоячей волны состоит в том, что расположение узлов и пучностей в пространстве зависит от соотношения фаз обеих когерентных волн.

Рассмотренные закономерности носят общий характер и сходны для волн любых типов. В рентгеновском диапазоне длин волн для формирования стоячей волны используют интерференцию падающей волны и волны отраженной, которая образуется благодаря дифракции рентгеновского излучения на кристалле (рис.1). Возникающая в кристалле и над его поверхностью стоячая рентгеновская волна (СРВ) имеет период, равный межплоскостному расстоянию кристалла [2—5].

Важная особенность СРВ состоит в том, что распределение узлов и пучностей в пространстве сильно зависит от угла падения θ . Хотя диапазон углов, в котором наблюдается дифракционное отражение в кристаллах, составляет всего несколько угловых секунд, при изменении угла θ внутри этой

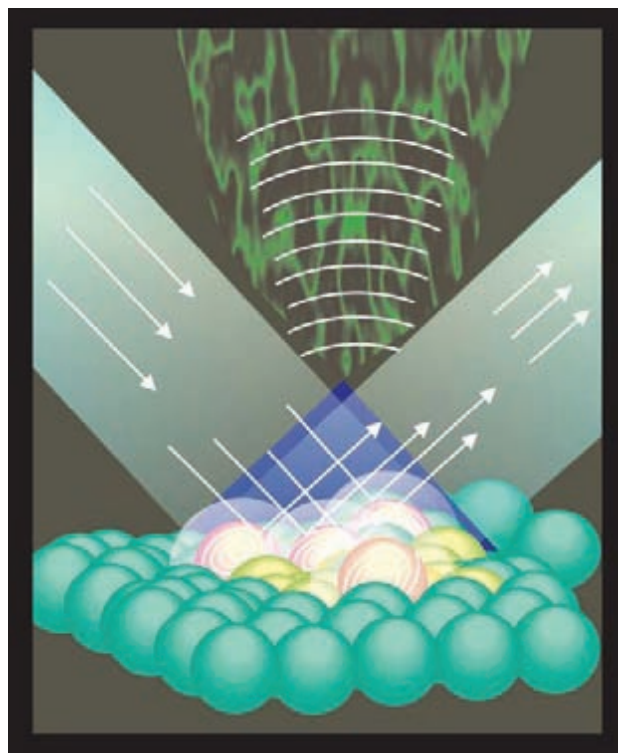


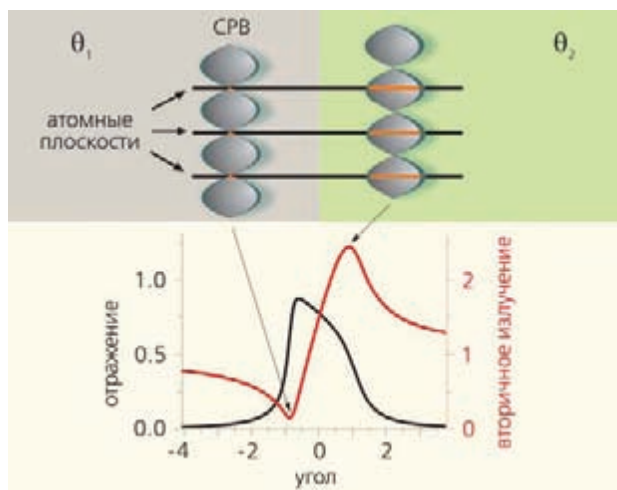
Рис.1. Образование стоячей рентгеновской волны в условиях дифракции в геометрии Брэгга: при падении рентгеновского пучка на кристалл под углом Брэгга благодаря дифракции формируется отраженная волна большой амплитуды. В результате когерентного сложения падающей и отраженной волн в кристалле и над его поверхностью возникает СРВ.

области разность фаз падающей и отраженной волн претерпевает существенные изменения — от нуля до π . Это означает, что при сканировании угла θ в пределах области дифракционного отражения узлы и пучности СРВ сдвигаются на расстояние, равное половине периода СРВ (рис.2).

Эти изменения в положении узлов и пучностей СРВ можно экспериментально зафиксировать, изучая угловую зависимость выхода вторичного излучения, которое испускают атомы при поглощении рентгеновских лучей. Поскольку интенсивность вторичного излучения пропорциональна интенсивности волнового поля в месте расположения атома, следует ожидать, что смещение узлов и пучностей СРВ (т.е. минимумов и максимумов интенсивности поля) должно приводить к резким модуляциям в интенсивности вторичного сигнала (рис.2). Измеряя угловую зависимость выхода вторичного излучения, мы обнаружим на этих кривых четко выраженные аномалии, которые позволяют «визуализировать» эффекты, связанные с существованием СРВ, и, можно сказать, служат «визитной карточкой» этого интереснейшего явления в рентгеновской оптике.

Понимание тонких механизмов формирования СРВ позволило ученым разработать новый

Рис.2. «Движение» СВВ при изменении угла θ в пределах области дифракции. Схематично показано распределение интенсивности волнового поля для двух фиксированных углов, соответствующих различным положениям узлов и пучностей относительно поверхности кристалла. При $\theta = \theta_1$ узлы СВВ приходятся на атомные плоскости кристалла, по мере увеличения угла происходит смещение СВВ, и при $\theta = \theta_2$ с атомными плоскостями совпадают пучности СВВ. Такие изменения интенсивности волнового поля приводят к резким модуляциям на угловой зависимости выхода вторичных излучений (красная кривая). В том случае, когда узлы СВВ приходятся на атомы кристалла, интенсивность вторичного излучения резко уменьшается. Если атомы попадают в пучности СВВ, интенсивность вторичного излучения достигает максимума.



метод структурной диагностики конденсированных сред, который обычно называют методом СВВ. Физическая сущность этого метода, а также вопросы, связанные с его практическим применением, достаточно широко и подробно обсуждаются в обзорах [2–5], поэтому напомним вкратце лишь общие принципы.

Метод СВВ основан на одновременной регистрации угловой зависимости рентгеновского отра-

жения и интенсивности выхода вторичных излучений (характеристической флуоресценции, фото- и оже-электронов, теплового и комптоновского рассеяния и др.), возникающих при поглощении рентгеновского излучения в условиях дифракции или полного внешнего отражения, когда в образце формируется отраженная волна большой амплитуды. Общая схема эксперимента приведена на рис.3.

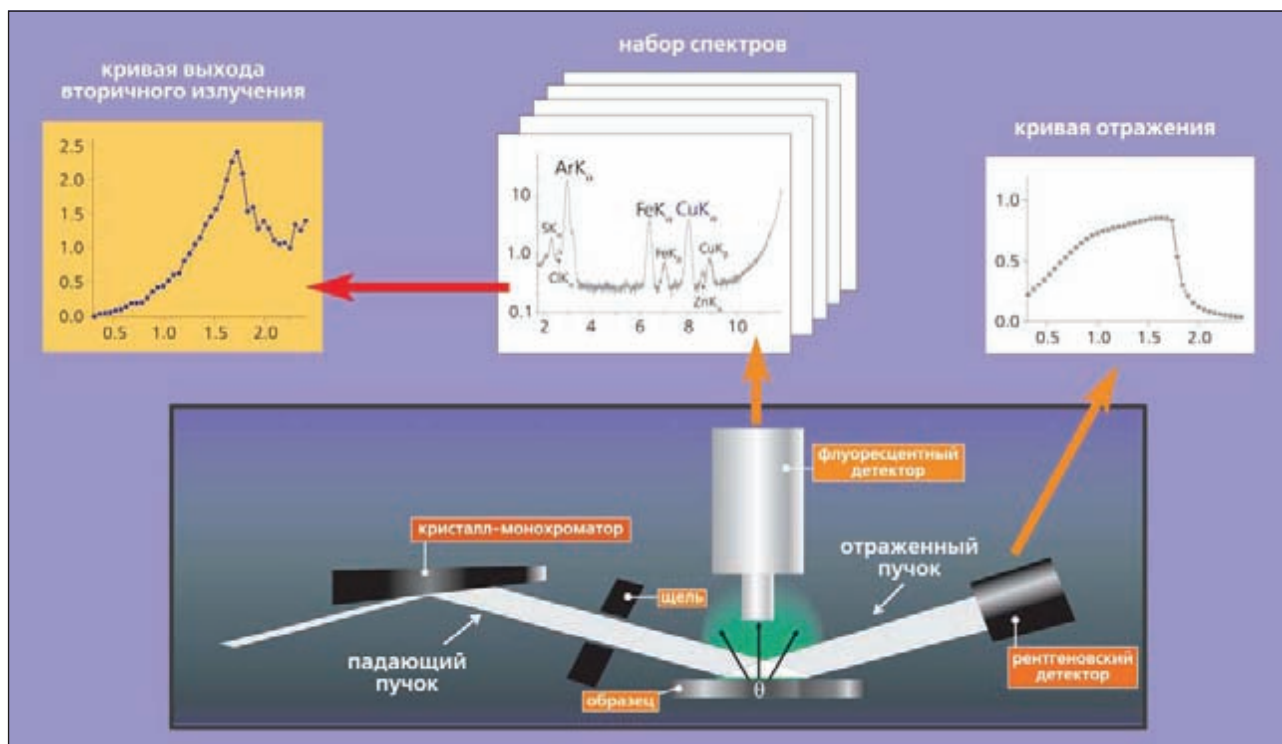


Рис.3. Общая схема эксперимента для модификации метода СВВ с измерением характеристической флуоресценции: угол падения рентгеновского пучка θ изменяют с некоторым шагом в угловой области дифракции или полного внешнего отражения. Для каждого угла θ измеряют интенсивность отраженного рентгеновского пучка и записывают спектр характеристического флуоресцентного излучения. Чтобы получить угловую зависимость выхода флуоресценции от атомов какого-то определенного сорта, интегральную интенсивность соответствующего пика на спектрах характеристического флуоресцентного излучения представляют как функцию угла θ .

Главная идея метода заключается в том, что форма угловой зависимости выхода вторичного излучения строго зависит от положения атомов-источников вторичного излучения, причем значительные изменения на этих кривых наблюдаются даже тогда, когда смещения атомов составляют малые доли межплоскостного расстояния кристалла. Это означает, что за счет спектроскопического выделения сигнала от атомов определенного сорта можно с высокой точностью определить местоположение этих атомов в кристалле и на его поверхности. Такое сочетание высокого пространственного разрешения рентгеновских лучей и спектроскопии вторичных излучений позволяет получать принципиально новую структурную информацию, недоступную традиционным рентгеновским методам.

Впервые модуляции на угловой зависимости выхода вторичных излучений в условиях дифракции на монокристалле были экспериментально зафиксированы в работах российских ученых [6], в которых был использован вторичный процесс с малой глубиной выхода (внешний фотоэффект). Эти результаты самым убедительным образом доказали факт формирования СРВ, и последовала целая серия работ, в которых были наглядно продемонстрированы возможности таких волн для структурных исследований. Уже в начале 1970-х годов новый метод прочно занял свое место в арсенале высокопрецизионных рентгеновских методов изучения строения кристаллов, причем как объемной структуры, так и тонких приповерхностных слоев [7, 8]. Отметим, что это классическое направление метода СРВ интенсивно развивается и сегодня.

Удлиняем период

Упорядоченные биоорганические наносистемы, используемые в современных биотехнологиях, имеют сложную молекулярную архитектуру и оказываются принципиально новыми объектами для рентгеновских исследований. Применить стоячие волны, которые формируются в кристаллах, для изучения таких объектов нельзя. Причина проста: стоячая волна в кристалле, имеющая тот же период, что и кристаллическая решетка, будет слишком «мелкой» шкалой для таких исследований. Действительно, биоорганические молекулы имеют большие размеры — десятки, а в некоторых случаях сотни ангстремов, поэтому период повторяемости пленок, состоящих из монослоев таких молекул, оказывается во много раз больше периода СРВ в кристаллах. Это означает, что атомы в молекулярной пленке попадают в различные позиции по отношению к «мелкомасштабной» стоячей волне. В результате равное количество атомов одновременно приходится как на пучность волнового поля, так и на узлы. Конечно, в та-

ком случае угловая зависимость выхода флуоресценции будет повторять по форме кривую рентгеновского отражения независимо от положения атомов в пленке, и метод СРВ не даст никакой структурной информации. Поэтому для исследований биоорганических наносистем необходимо сформировать стоячую волну, период которой был бы соизмерим с характерными размерами биоорганических макромолекул. Один из способов формирования СРВ с большим периодом основан на использовании явления полного внешнего отражения. Оно наблюдается в рентгеновском диапазоне длин волн благодаря тому, что показатель преломления рентгеновских лучей меньше единицы для любого вещества.

Волновое поле над поверхностью рентгеновского зеркала в области полного внешнего отражения представляет собой стоячую волну, которая образуется в результате когерентного сложения двух волн равной интенсивности — падающей и зеркально отраженной. Отличительная черта СРВ в области полного внешнего отражения — резкая (обратно пропорциональная) зависимость периода от угла. При $\theta = \theta_c$ (θ_c — критический угол полного внешнего отражения) период СРВ составляет несколько сотен ангстремов, с уменьшением угла период СРВ быстро растет и в пределе $\theta \rightarrow 0$ обращается в бесконечность (рис.4). Та-

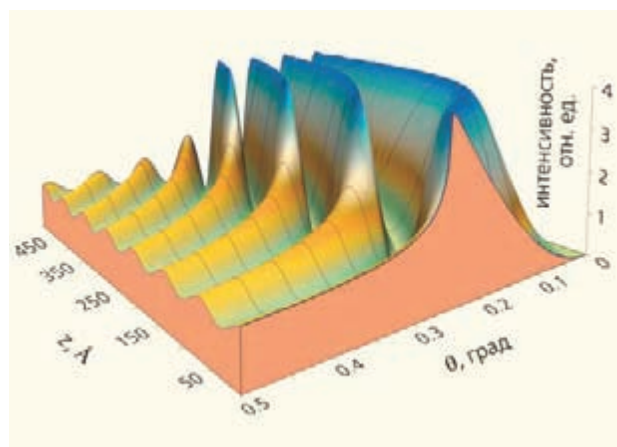


Рис.4. Распределение интенсивности волнового поля над поверхностью рентгеновского зеркала (координата z) в области полного внешнего отражения. Сложное интерференционное поведение волнового поля СРВ обусловлено тем, что при изменении угла в области $0 < \theta < \theta_c$ происходит резкое увеличение периода СРВ — от нескольких сотен ангстремов при $\theta = \theta_c$ до бесконечности при $\theta = 0$. Одновременно с этим смещается положение узлов и пучностей относительно поверхности зеркала: при $\theta = 0$ у поверхности находится узел СРВ, а пучность локализована на бесконечности. По мере увеличения угла θ первая пучность СРВ шаг за шагом приближается к зеркалу и достигает его поверхности вблизи критического угла полного внешнего отражения θ_c . Эти закономерности носят общий характер и не зависят от материала рентгеновского зеркала.

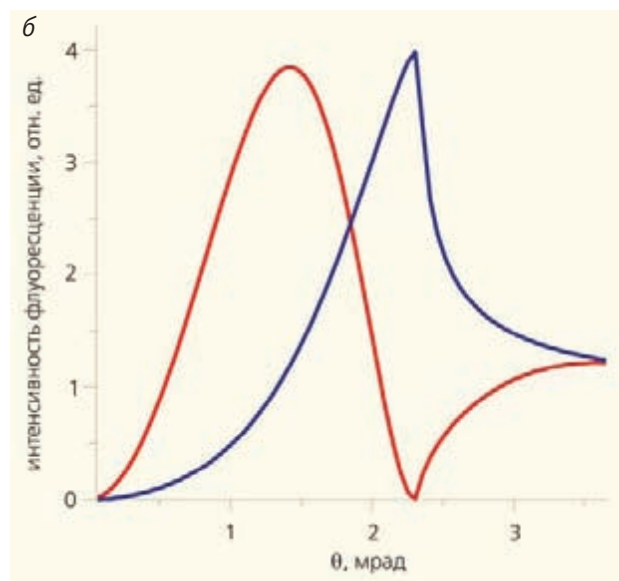
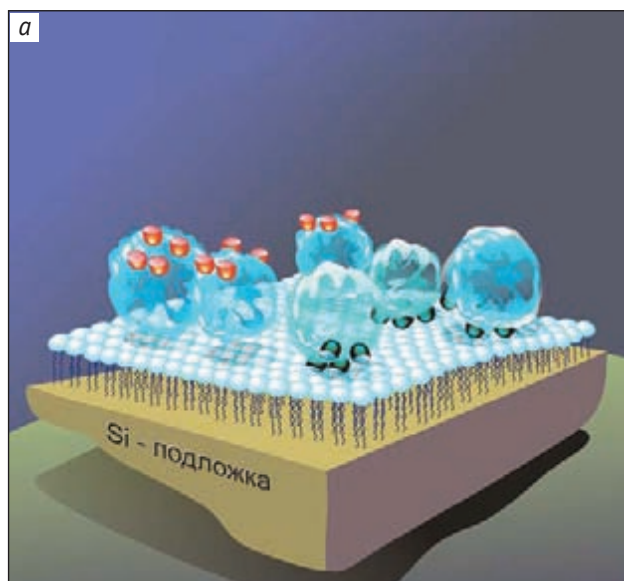


Рис.5. Длиннопериодические СРВ в условиях полного внешнего отражения, используемого для изучения биоорганических пленок. Схематично изображен монослой белковых молекул, нанесенный на твердую подложку — пластину из кремния (а), и показаны кривые выхода флуоресцентного излучения (б), рассчитанные для двух различных положений атомов в белковых молекулах — у нижней и у верхней границы белкового монослоя (синяя и красная линии соответственно).

кая стоячая волна представляет собой идеальную «масштабную линейку» для исследования крупных биоорганических молекул. Изменяя угол θ , можно буквально просканировать волновым полем отдельные белковые молекулы, нанесенные на поверхность рентгеновского зеркала, напрямую определяя место связывания атомов того или иного сорта (рис.5). Именно поэтому любое рентгеновское зеркало можно использовать в качестве «генератора» длиннопериодических СРВ для характеристики биоорганических пленок, которые наносят на поверхность зеркала.

Исключительные возможности метода СРВ в области полного внешнего отражения для изучения структуры и элементного состава органических и биоорганических пленок на твердых подложках были продемонстрированы уже в первых исследованиях в конце 1980-х — начале 1990-х годов [9—12]. Особое место в этом ряду занимает работа [11], где было впервые экспериментально зафиксировано формирование амплитудно-модулированной СРВ над поверхностью рентгеновского волновода. Были выполнены измерения выхода флуоресценции от монослоя стеарата марганца, нанесенного на поверхность волноводной структуры, которая состояла из ультратонких слоев Ni/C/Rh. Благодаря амплитудной модуляции СРВ удалось заметно повысить пространственное разрешение в направлении нормали к поверхности, что позволило получить детальную информацию о структуре органического монослоя. Исследования, проведенные в [12], были посвящены решению более сложных задач — изучению проникновения ионов калия через многослойную наносис-

тему, изготовленную на основе жирной кислоты и антибиотика валиномицина. При этом было показано, что ионы калия группируются в кластеры, заполняя «каналы» в биоорганической пленке.

Среди недавних работ можно отметить серию экспериментов, в которых метод СРВ был использован для разработки новых подходов к анализу эффективности и безопасности действия лекарственных препаратов [13, 14]. Изучение молекулярной организации и элементного состава белковых пленок на основе металлоферментов Са-АТФаза и щелочная фосфатаза позволили провести сравнительную оценку эффективности действия четырех лекарственных препаратов, применяемых для ускорения выведения тяжелых металлов из организма человека. Одно из главных преимуществ таких экспериментов — возможность выявлять тонкие механизмы взаимодействия лекарственных препаратов с белковыми макромолекулами, а значит извлекать дифференциальные данные о действии лекарственного препарата (в отличие от интегральной информации, получаемой на целостных клетках или живом организме, когда результаты зависят от множества физиологических, средовых, генетических и других факторов).

«Вопросы природе»

Великий философ, основоположник английского эмпиризма, Ф.Бэкон писал, что благодаря экспериментальным измерениям ученый получает возможность «задавать вопросы природе». Пожалуй, главный «вопрос природе», на который челове-

ство пытается найти ответ уже многие тысячи лет, это — что же такое жизнь? Чем отличается живое от неживого? Сегодня ответы на эти вопросы ученые ищут на клеточном уровне, рассматривая клетку как универсальную структурную единицу всех живых организмов.

За последние десятилетия благодаря выдающимся достижениям биологических наук наши знания о молекулярной организации и механизмах функционирования клеток качественно изменились, что позволило еще глубже проникнуть в тайну строения живой материи. Следует, однако, подчеркнуть, что изучение внутреннего устройства клетки представляет исключительный интерес не только с точки зрения фундаментальных знаний. Уже более 30 лет назад была высказана мысль, что клетка и ее органеллы — наиболее удобные объекты для понимания и описания болезней. Сегодня в медицине появились такие диагнозы, как «молекулярные болезни», «болезни митохондрий», «мембранопатии».

Ключевую роль в процессах жизнедеятельности и развития клеток играют клеточные мембраны, которые обеспечивают барьерную, транспортную, рецепторную, энергетическую и другие важные функции клеток. Несмотря на успехи молекулярной мембранологии, многие механизмы функционирования клеточных мембран все еще не выяснены, так что развитие новых подходов к изучению этих сложнейших биологических систем по-прежнему актуально. Понять, как устроены биологические мембраны, можно с помощью экспериментов на модельных системах, в первую очередь на упорядоченных белково-липидных

пленках (рис.6). Такие исследования дают принципиальную возможность моделировать различные биофизические и биохимические процессы, протекающие в биологических мембранах, и получать информацию о свойствах, принципах функционирования и структуре биологических мембран на молекулярном уровне.

Упорядоченные белково-липидные пленки представляют собой системы, толщина которых лежит в нанометровом диапазоне. Поэтому совершенно естественно, что мощный арсенал современных поверхностно-чувствительных рентгеновских методов все более активно привлекается для изучения подобных объектов. Новый этап в исследованиях белково-липидных моделей клеточных мембран начался в 1980-х годах благодаря созданию принципиально новой экспериментальной техники. Ученые получили возможность проводить рентгеновские измерения тонких пленок, сформированных непосредственно на поверхности жидкости, что поставило структурную диагностику модельных биологических систем на качественно новый уровень. Дело в том, что биологические мембраны имеют «жидкую» структуру и являются активной динамичной системой, в которой как липиды, так и белки обладают довольно большой свободой движения [15]. Вода составляет около 20% всей массы мембраны и оказывает существенное влияние на структурную организацию липидного бислоя, а также на молекулярную подвижность ее отдельных компонентов.

Поэтому понятно, какие заманчивые перспективы для биологии и медицины открывают рент-

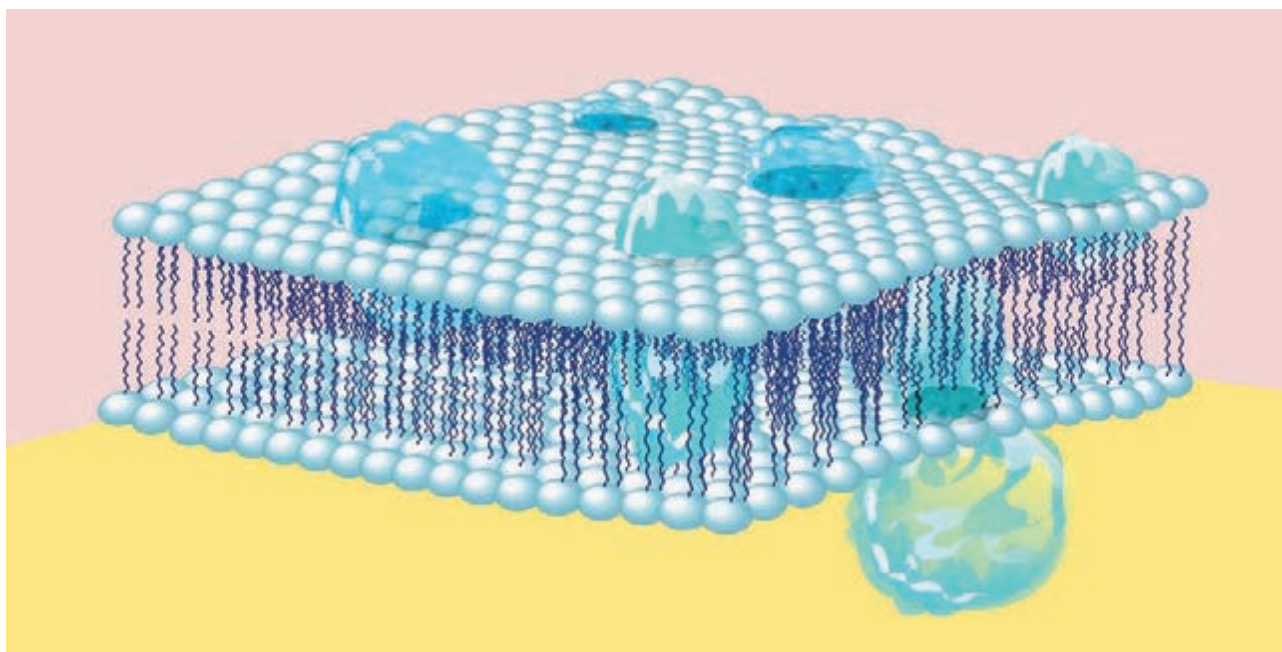


Рис.6. Модель клеточной мембраны. Согласно современным представлениям, клеточные мембраны построены из двойного слоя молекул липидов, в котором располагаются белковые макромолекулы.

рентгеновские исследования белково-липидных пленок на поверхности жидкости. Ведь в таких экспериментах мы получаем уникальную возможность изучать модели клеточных мембран в условиях, наиболее приближенных к естественным условиям их функционирования в живых клетках. И хотя рентгеновские измерения на жидкости представляют собой исключительно трудную задачу, это именно тот случай, когда затраченные усилия окупаются сторицей, поскольку так мы можем проникать в сущность чрезвычайно сложных биологических явлений, задавая все новые «вопросы природе».

Отклоняем рентгеновский пучок

Осуществить рентгеновские исследования на жидкости удалось сравнительно недавно — в начале 1980-х годов. Такие эксперименты проводят на специальных установках — рентгеновских дифрактометрах, оборудованных ленгмюровской ванной. Ленгмюровская ванна представляет собой кювету, заполненную жидкостью, на поверхности которой формируют молекулярную пленку. Измерения выполняют в геометрии полного внешнего отражения рентгеновских лучей, при этом в роли рентгеновского зеркала выступает жидкость.

Главные трудности рентгеновских измерений на жидкости связаны с необходимостью наклонять рентгеновский пучок к поверхности (рис.7). Дело в том, что в рентгеноструктурных исследованиях твердотельных образцов угловые зависимости коэффициента отражения получают, поворачивая образец относительно пучка. В измерениях же на жидкости положение образца (ленгмюровской ванны) должно оставаться горизонтальным, поэтому здесь для изменения угла приходится отклонять

падающий пучок от горизонтальной плоскости. Сегодня на различных источниках синхротронного излучения работают девять экспериментальных станций, предназначенных для проведения рентгеновских измерений на жидкости, и на большинстве из них для управления пространственным положением рентгеновского пучка используется рентгенооптическая схема, предложенная Алс-Нельсоном. В этом случае пучок отклоняется кристаллом-дефлектором, который находится в дифракционном положении. Кристалл вращают вокруг пучка с сохранением условий дифракции. Поворот дефлектора вокруг пучка приводит к отклонению плоскости дифракции от ее горизонтального положения, в результате дифрагированный пучок смещается относительно горизонтальной плоскости и движется по поверхности конуса с углом раствора $4\theta_w$. Чтобы обеспечить такое сложнейшее перемещение кристалла-дефлектора в пространстве, приходится использовать высокоточное гониометрическое оборудование, ведь отклонение плоскости вращения кристалла-дефлектора не должно превышать $2-3''$!

В 2006 г. в нашей стране на Курчатовском источнике синхротронного излучения была введена в действие станция «Ленгмюр» для исследований тонких пленок на жидкости (рис.8). На этой станции используется более простая рентгенооптическая схема с использованием двух плоских зеркал, работающих на эффекте полного внешнего отражения [16]. Первое кварцевое зеркало отклоняет пучок вверх под углом порядка $300''$ и используется для формирования пучка, второе зеркало — рабочее, имеет вольфрамовое покрытие и служит для наклона пучка к поверхности жидкости. Разность критических углов для используемых материалов зеркал позволяет производить изменение угла в диапазоне $2\theta_w$ (θ_w — критический угол полного внешнего отражения для воды).

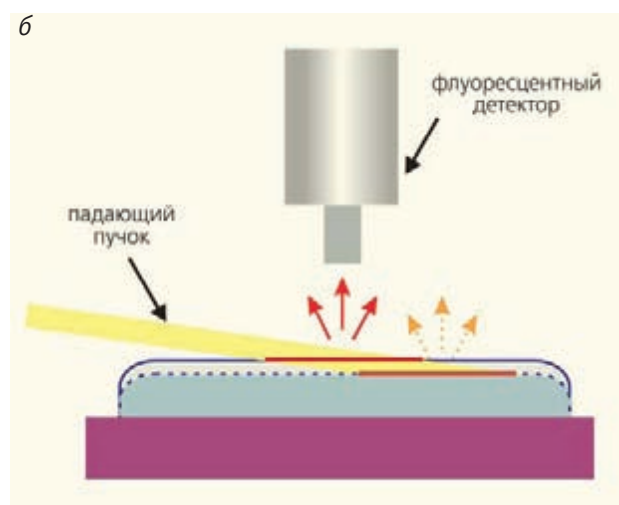
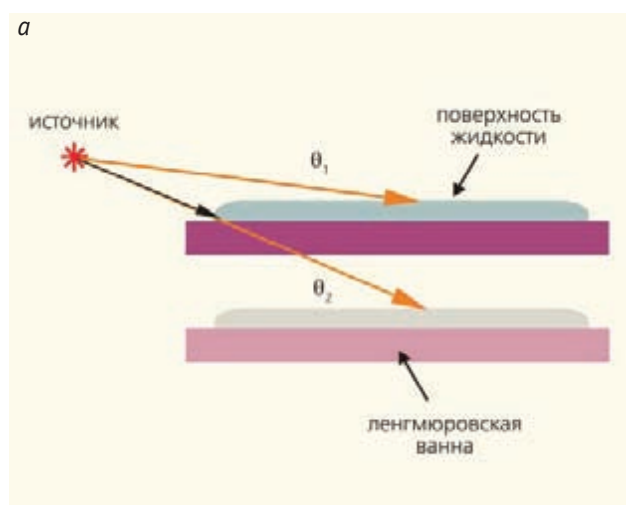


Рис.7. Смещение положения области засветки рентгеновским пучком на поверхности жидкости: при изменении угла θ (а); из-за испарения жидкости (б).

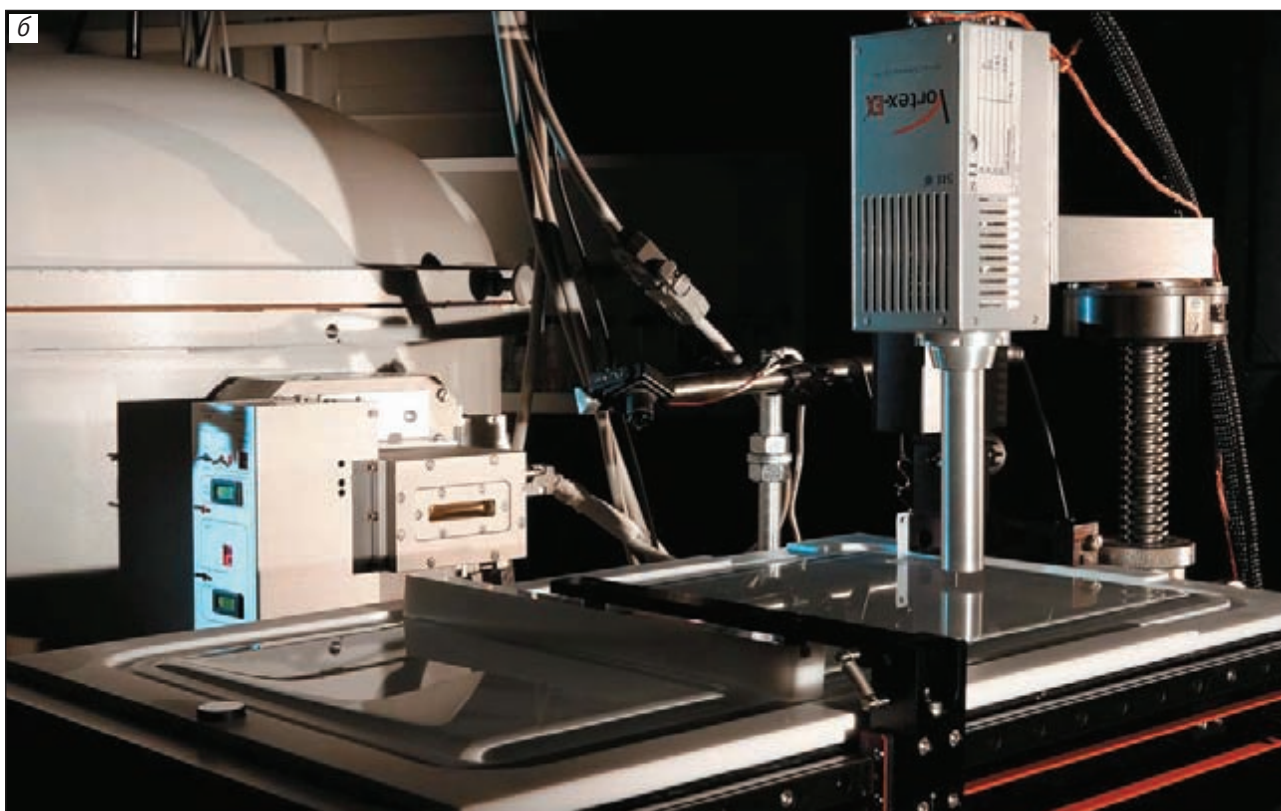
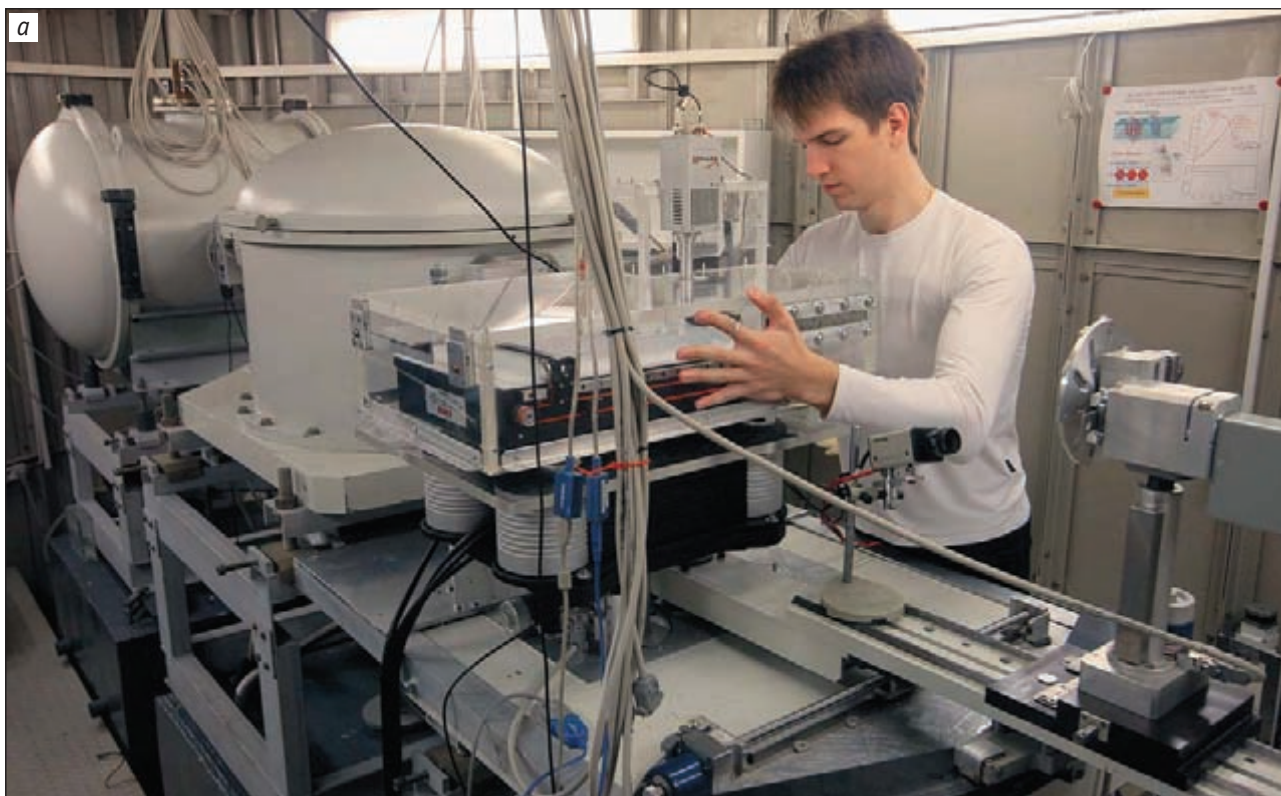


Рис.8. Экспериментальная станция «Ленгмю» на Курчатковском источнике синхротронного излучения: общий вид станции (а); блок формирования образца (б). На последнем фото видна ленгмювская ванна — тефлоновая кювета, заполненная жидкостью, на поверхности которой с помощью подвижного барьера формируют молекулярную пленку. Ванна расположена на устройстве активной антивибрационной защиты.

Фото А.А.Цыгановой

Общая проблема, возникающая в каждой из упомянутых выше рентгенооптических схем, связана с тем, что при изменении угла падения заметно меняется положение области засветки рентгеновским пучком на поверхности жидкости (рис.7,*а*). Поэтому в таких измерениях после каждого шага, изменяющего наклон рентгеновского пучка, приходится корректировать положение ванны по высоте: зная геометрические параметры станции, можно рассчитать, насколько следует поднять или опустить ванну, чтобы область засветки на поверхности жидкости не сдвигалась. Дополнительная трудность измерений с помощью метода СРВ — уменьшение уровня жидкости из-за испарения — приводит к смещению области засветки относительно носика флуоресцентного детектора, так что в результате она может уйти за пределы видимости детектора (рис.7,*б*).

Первые шаги на жидкости

Изучение молекулярных слоев на поверхности жидкости с помощью метода СРВ потребовало адаптации этой экспериментальной методики для подобных систем, проверки ее способности локализовать те или иные атомы внутри слоя. Прежде всего необходимо было экспериментально доказать, что угловая зависимость выхода флуоресценции от мономолекулярного слоя на жидкости будет иметь форму, модулированную сложным распределением интенсивности волнового поля СРВ. Первые результаты, достигнутые на этом пути, представлены в [17]. В качестве модельных объектов для этих измерений были выбраны достаточно простые поверхностно-активные органические соединения, которые формируют стабильные, плотноупакованные и упорядоченные слои на поверхности жидкости, — металлозамещенные фталоцианины и полиорганосилоксаны. Фталоцианины представляют собой дискообразные макроциклические молекулы, к которым можно присоединять заместители различной химической структуры. Циклолинейные полиорганосилоксаны относятся к классу кремнийсодержащих полимеров, мономер полиорганосилоксана представляет собой двенадцатичленное кольцо.

На рис.9 показаны первые угловые зависимости выхода флуоресценции от органических монослоев, сформированных на жидкости. Математическая обработка экспериментальных данных позволила определить расстояние между атомами-источниками флуоресцентного излучения и поверхностью воды: атомами металла для монослоя металлозамещенных фталоцианинов и атомами кремния для монослоя полиорганосилоксанов. Это дало возможность установить тип упаковки органических молекул в монослое. Оказалось, что в монослое фталоцианинов макроциклы молекул были расположены перпендикулярно

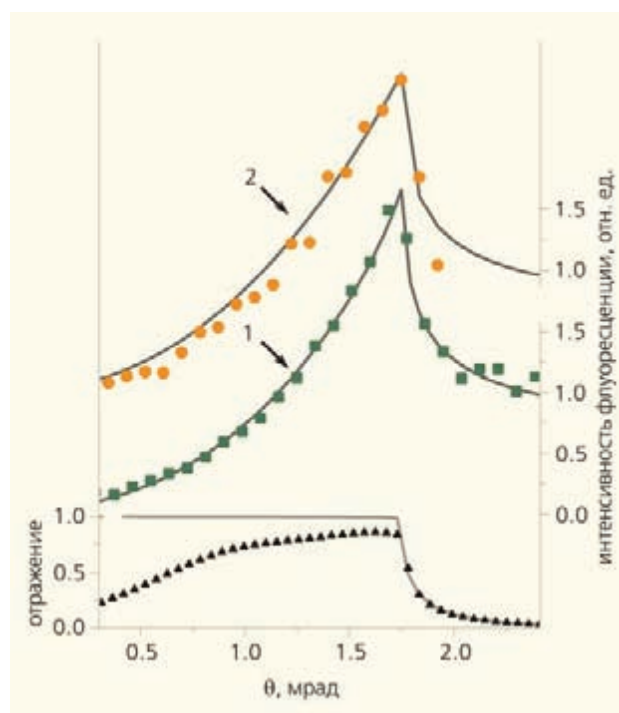


Рис.9. Кривые выхода флуоресценции от монослоев на поверхности выхода: кривая 1 — угловая зависимость флуоресценции от атомов олова, расположенных в центре макроцикла молекул металлозамещенного фталоцианина; кривая 2 — угловая зависимость флуоресценции от атомов кремния, присутствующих в молекулах полиорганосилоксана. Нижняя кривая — рентгеновское отражение. Точки — экспериментальные данные, сплошные линии — расчет.

к поверхности воды. А в монослоях полиорганосилоксанов полимерные кольца молекул лежали на поверхности жидкости «плашмя». Однако следует подчеркнуть, что главной целью этих экспериментов было решение аппаратно-методических задач, связанных с адаптацией метода СРВ для измерений молекулярных пленок на жидкости. Поэтому самым важным их результатом стал положительный ответ на принципиальный вопрос — можно ли использовать метод СРВ для изучения отдельных молекулярных слоев, сформированных на жидкости.

Усложняем задачу

Первые исследования белково-липидных пленок на жидкости методом СРВ были выполнены в работе [18]. В этих экспериментах решалась задача изучения процессов самоорганизации, протекающих в биоорганических наносистемах в условиях, когда белковые и липидные молекулы находятся в подвижном состоянии и сохраняют свою нативную конформацию.

Важно отметить, что белково-липидные пленки — труднейший с точки зрения рентгеновских

исследований объект. Ведь формирование стабильного белково-липидного слоя на поверхности воды — это настоящее искусство. Проблема состоит в том, как удержать белковые молекулы на поверхности жидкости, не давая им «утонуть» и не допуская их денатурации. Чтобы сформировать пленку на основе щелочной фосфатазы, в работе [18] была использована достаточно сложная процедура: сначала на поверхности жидкости был нанесен монослой фосфолипида дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC), а затем под этот монослой с помощью шприца вводили раствор, который представлял собой смесь щелочной фосфатазы и другого фосфолипида — фосфатидилинозитола.

Щелочная фосфатаза относится к классу металлоферментов: в активных центрах находятся четыре иона цинка. С точки зрения рентгенофлуоресцентных измерений эти ионы оказываются своего рода метками для белковых молекул. Для молекул фосфолипидов такими метками служат ионы фосфора, которые содержатся в полярных головках молекул фосфолипидов. Угловые зависимости выхода флуоресценции от ионов цинка и фосфора представлены на рис.10. Рассматривая эти экспериментальные данные, необходимо учесть, что из-за резкого увеличения глубины проникновения падающего рентгеновского пучка в воду в области углов $\theta > \theta_w$ катастрофически рас-

тет интенсивность фона. В результате уже вблизи θ_w очень слабые «полезные» флуоресцентные пики перестают быть различимыми. Этим объясняется то обстоятельство, что экспериментальные угловые зависимости на рис.10 обрываются при $\theta > \theta_w$. Тем не менее даже качественное сравнение этих кривых позволяет сделать ряд важных заключений о молекулярной организации биоорганической наносистемы. Действительно, существенные отличия формы угловых зависимостей выхода флуоресценции от фосфора и цинка указывают на различие в местоположении этих ионов внутри белково-липидной пленки. А это означает, что молекулы фосфолипидов и щелочной фосфатазы образуют отдельные неперемешивающиеся слои.

На основе данных результатов можно предположить, что после нанесения белково-липидной смеси под монослой фосфолипида DPPC произошло самопроизвольное расслоение этой биоорганической системы. При этом молекулы фосфолипида фосфатидилинозитола образовали агрегатные структуры типа мицелл под слоем DPPC, а белковые молекулы самоорганизовались в отдельный слой, не содержащий фосфолипидных молекул. Часть молекул фосфолипида ушла под слой белка. Важное значение этих результатов состоит в том, что здесь метод стоячих рентгеновских волн позволил провести исследования *in situ* процессов самоорганизации в сложных белково-

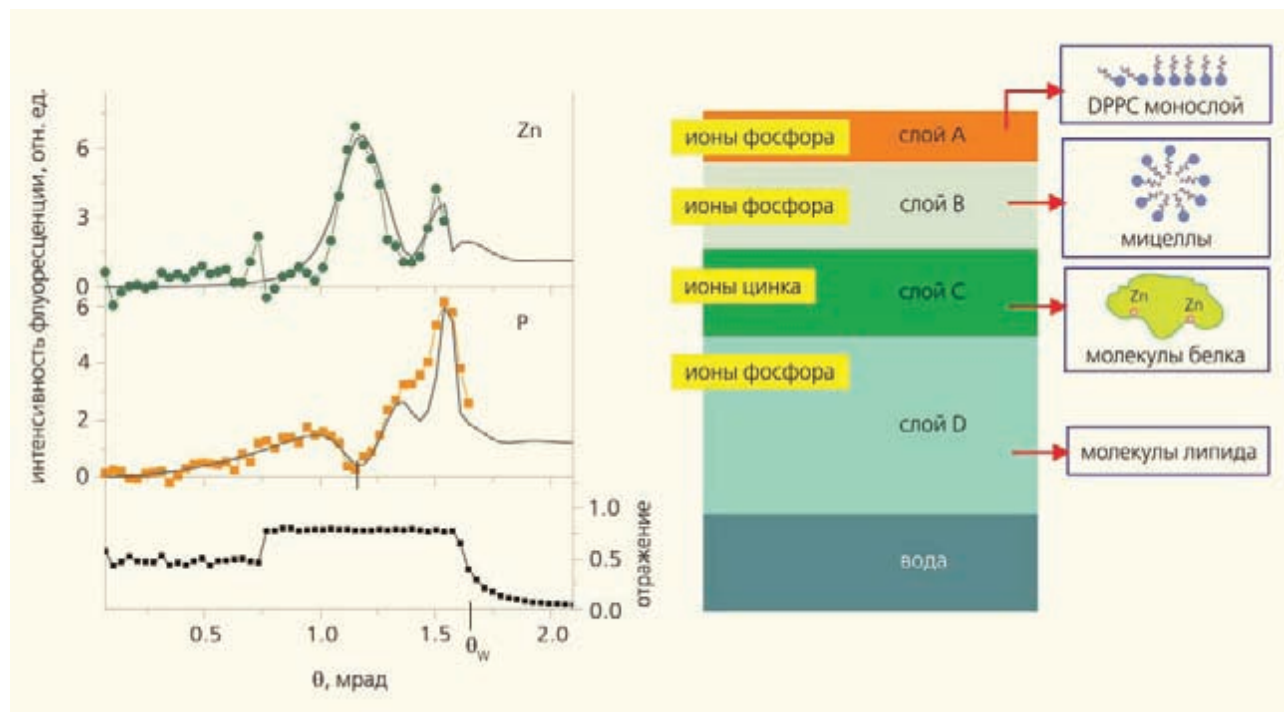


Рис.10. Угловая зависимость выхода флуоресценции от белково-липидной пленки на основе смеси щелочной фосфатазы и фосфолипида фосфатидилинозитола. Нижняя кривая — экспериментальная угловая зависимость рентгеновского отражения. Точки — экспериментальные данные, сплошные линии — расчет. Наилучшее совпадение теоретических кривых с экспериментальными данными было получено для модели пленки, состоящей из четырех слоев, причем в этой слоистой системе ионы цинка присутствуют только в слое С. Ионы фосфора содержатся в слоях А, В и D, в слое С их нет.

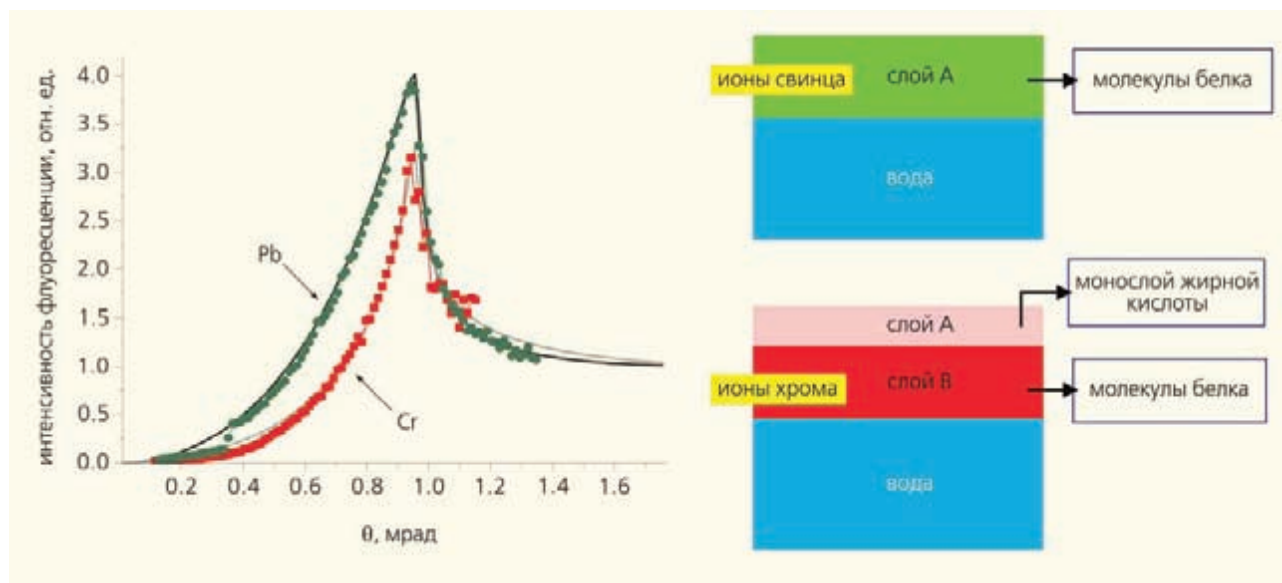


Рис.11. Угловая зависимость выхода флуоресценции от белково-липидных пленок на основе глюкозаоксидазы, обработанной растворами солей свинца или хрома. Точки — экспериментальные данные, сплошные линии — расчет.

липидных наносистемах. Такие тонкие эксперименты возможны только в том случае, когда мы проводим измерения на жидкости, т.е. в условиях, когда белковые и липидные молекулы сохраняют свою подвижность.

Еще более серьезная задача — изучать поведение белково-липидных пленок в условиях, моделирующих различные патологические воздействия на клетку. Так можно пытаться понять механизмы повреждения клеточных мембран на молекулярном уровне. Решению именно этих сложных вопросов была посвящена работа [19], в которых метод СРВ был применен, чтобы исследовать процессы нарушения структурной организации белково-липидных пленок под действием тяжелых металлов (свинца и хрома).

Для формирования белково-липидной пленки был использован метод адсорбции белка на монослой поверхностно-активного соединения: в этом случае водный раствор глюкозаоксидазы наливали в лэнгмюровскую ванну. А затем на поверхность этой субфазы, содержащей молекулы белка, наносили монослой бегеновой кислоты. При растворении глюкозаоксидазы в рабочий раствор белка добавляли соли свинца (ацетат свинца (II)) или хрома (хлорид хрома (III)). С точки зрения измерений методом СРВ ионы этих металлов, связанные белковыми молекулами, служили метками для белковых молекул. Соответствующие угловые зависимости выхода флуоресценции (рис.11) имеют классическую форму, которая наблюдается в том случае, когда атомы-источники флуоресцентного излучения расположены в тонком слое вблизи отражающей поверхности. Отсюда сразу же следует важный вывод: в обоих случаях белковые молекулы, которые присутствуют в водной

субфазе, сформировали тонкий слой у поверхности жидкости.

Несмотря на общее сходство угловых зависимостей выхода флуоресценции от ионов свинца и хрома, на рис.11 хорошо видны различия этих кривых в угловой области $0 < \theta < \theta_c$: кривая выхода флуоресценции от свинца проходит заметно выше, чем кривая от хрома. Это объясняется тем, что в белково-липидной пленке на основе глюкозаоксидазы, обработанной раствором хрома, белковые молекулы присутствуют в слое, который расположен глубже от границы раздела воздух/пленка. Анализ экспериментальных кривых выхода флуоресценции позволил установить характер молекулярной организации пленок более точно. После обработки раствором свинца молекулы глюкозаоксидазы встраивались в монослой бегеновой кислоты, образуя рыхлый слой непосредственно на границе раздела воздух/пленка; после обработки раствором хрома белковые молекулы располагались под монослоем бегеновой кислоты.

Эти различия в молекулярной организации белково-липидных пленок очень важны, ведь они обусловлены изменениями белково-липидных взаимодействий, вызванных конформационными перестройками белковых молекул. Так, под действием свинца могло произойти частичное разрушение нативной конформации белковой молекулы, при этом число гидрофобных участков на поверхности молекулы увеличилось и молекулы глюкозаоксидазы начали встраиваться в гидрофобную область липидного слоя. При обработке глюкозаоксидазы раствором хрома изменения конформации белковых молекул, по-видимому, оказались не столь существенными и белковые молекулы концентрировались под монослоем бе-

геновой кислоты, не повреждая сам монослой. Полученные в этих экспериментах результаты наглядно демонстрируют возможности метода СРВ для изучения процессов разрушения клеточных мембран при различных неблагоприятных воздействиях.

* * *

Блестящие перспективы использования рентгеновских лучей для изучения атомарного строения материи ученые осознали практически сразу после открытия дифракции рентгеновских лучей в 1912 г. Сегодня благодаря созданию принципно

ально новой экспериментальной техники значительно расширился класс объектов, доступных для рентгеновских исследований: стало возможным применить всю мощь современных высокопрецизионных рентгеновских методов для структурной диагностики таких исключительно трудных объектов, как биоорганические наносистемы. Эти исследования находятся пока на стадии становления, тем не менее уже сейчас стало понятно, что развитие нового направления обещает настоящий прорыв как в области фундаментальных наук (в первую очередь молекулярной биологии), так и в современных биотехнологиях. ■

Литература

1. Ковальчук М.В. Наука и жизнь: моя конвергенция. В 2 т. М., 2011.
2. Ковальчук М.В., Кон В.Г. Рентгеновские стоячие волны — новый метод исследования структуры кристаллов // УФН. 1986. Т.149. С.69—103.
3. Ковальчук М.В., Кон В.Г. Стоячая волна рентгена // Наука и жизнь. 1986. №7. С. 25—32.
4. Vartanyantz I.A., Kovalchuk M.V. Theory and applications of X-Ray standing waves in real crystals // Rep. Prog. Phys. 2001. V.64. P.1009—1084.
5. Ковальчук М.В., Желудева С.И., Носик В.Л. Рентгеновские лучи от объема к поверхности // Природа. 1997. №2. С.54—69.
6. Щемелев В.Н., Круглов М.В., Пронин В.П. Угловая зависимость внешнего рентгеновского фотоэффекта в совершенных монокристаллах германия и кремния // ФТТ. 1970. Т.12. Вып.8. С.2495—2499.
7. Afanas'ev A.M., Kovalchuk M.V., Kov'ev E.K. et al. Photoemission as a method for investigating the structure of surface layers // Phys. Stat. Sol. (a). 1977. V.42. P.415—422.
8. Bedzyk M.J., Materlik G., Kovalchuk M.V. Depth-selective X-ray standing wave diffraction analysis // Phys. Rev. 1984. V.B30. P.4881—4884.
9. Bedzyk M. New trends in X-ray standing waves // Nuc. Instr. Meth. In Phys. Res. A. 1988. V.266. P.679—683.
10. Желудева С.И., Ковальчук М.В., Лагомарзино С. и др. Наблюдение эванесцентной и стоячей рентгеновских волн в области полного внешнего отражения от молекулярных слоев Лэнгмюра—Блоджетт // Письма в ЖЭТФ. 1990. Т.52. Вып.3. С.804—808.
11. Zheludeva S.I., Kovalchuk M.V., Novikova N.N. et al. X-Ray total external reflection fluorescence study of LB films on solid substrate // J. Phys. D.: Appl.Phys. 1993. V.26. P.A202—A205.
12. Zheludeva S.I., Kovalchuk M.V., Novikova N.N. et al. Ion permeation through Langmuir-Blodgett layers investigated by total external reflection and fluorescence study // Materials Science and Engineering: C 3. 1995. P.211—214.
13. Novikova N.N., Yur'eva E.A., Zheludeva S.I. et al. X-ray fluorescence methods for investigations lipid/protein membrane models // J. Synchrotron Rad. 2005. V.12. P.511—516.
14. Novikova N.N., Zheludeva S.I., Kovalchuk M.V. et al. Investigation of molecular mechanisms of action of chelating drugs on protein-lipid model membranes by X-ray fluorescence // Crystallography Reports. 2009. V.54. №7. P.1208—1213.
15. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. М., 1997.
16. Лидер В.В., Терещенко Е.Ю., Желудева С.И. и др. Блок управления пространственным положением рентгеновского пучка экспериментальной синхротронной станции «Ленгмюр» // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2004. №7. С.5—14.
17. Novikova N.N., Zheludeva S.I., Konovalov O.V. et al. Total reflection X-ray fluorescence study of Langmuir monolayers on water surface // J. Appl. Cryst. 2003. V.36. P.727—731.
18. Zheludeva S., Novikova N., Stepina N. et al. Molecular organization in protein-lipid film on the water surface studied by X-ray standing wave measurements under total external reflection // Spectrochimica Acta B. 2008. V.63. P.1339—1403.
19. Новикова Н.Н., Ковальчук М.В., Степина Н.Д. и др. Спектрально-селективные рентгеновские методы для структурной диагностики упорядоченных биоорганических наносистем на поверхности жидкости // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2011. №9. С.6—11.

