

УДК 541.64:547.853.2

ВЛИЯНИЕ АМФИФИЛЬНЫХ СОПОЛИМЕРОВ НА СВОЙСТВА ЛАМЕЛЯРНЫХ И ВЕЗИКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ЛЕЦИТИНА¹

© 2005 г. М. С. Гусихина*, Ю. Д. Семчиков*, Ю. Ю. Гущина*,
А. А. Волков**, Н. Б. Мельникова**

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, корп. 2

**Нижегородская государственная медицинская академия
603005 Нижний Новгород, ул. Минина, 10, корп. 1

Поступила в редакцию 19.07.2004 г.

Принята в печать 17.02.2005 г.

Изучено влияние малых добавок сополимеров стирол–метакриловая кислота ($m_2 = 0.35$), стирол–N-винилпирролидон ($m_2 = 0.5$), стирол–4-винилпиридин ($m_2 = 0.9$) на изотермы сжатия мономолекулярного слоя лецитина на границе раздела вода–воздух и на смачиваемость бислоя лецитина на твердой подложке. Обнаружено увеличение эффективной молекулярной площади лецитина и уменьшение давления коллапса и угла смачивания, что указывает на иммобилизацию макромолекул сополимера моно- и бислоями лецитина. Обусловленный иммобилизацией армирующий эффект приводит к увеличению агрегативной устойчивости везикул, что подтверждается и данными атомно-силовой микроскопии.

Среди комплексов, образуемых полиэлектролитами, особую роль занимают комплексы с ПАВ и, в частности, с противоположно заряженными мицеллообразующими ПАВ [1]. Такие полимер-коллоидные комплексы обладают рядом интересных свойств, среди которых в первую очередь следует отметить способность к самоорганизации [2, 3]. Среди полимер-коллоидных комплексов практически не изучены комплексы, образуемые амфифильными сополимерами, содержащими гидрофобные, гидрофильные и ионогенные группы, и замкнутыми ламелярными образованиями типа везикул, в которых внутренний и внешний объем разделен бислоем ПАВ, имеющим обычно липидную природу.

В связи с этим, настоящая работа посвящена исследованию смесей сополимеров, с кислотной или основной группой, и лецитина, склонного образовывать различного типа везикулы.

В качестве объекта исследования были выбраны ионогенные сополимеры стирол–метакрило-

вая кислота (**МАК**) ($m_2 = 0.35$), стирол–4-винилпиридин (**ВП**) ($m_2 = 0.9$) и для сравнения стирол–винилпирролидон (**ВПД**) ($m_2 = 0.5$). Яичный лецитин был представлен 1-олеил-2-пальмитоил-*sn*-фосфатидилхолином [4].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Радикальную сополимеризацию стирола с МАК и ВПД проводили в массе при 60°C до конверсии 7%. Инициирование осуществляли ДАК. Исходные реакционные смеси предварительно дегазировали трехкратным перемораживанием в вакууме. Соплимеры очищали трехкратным переосаждением, затем сушили в вакууме до постоянной массы при комнатной температуре.

Состав сополимеров стирол–МАК определяли по содержанию карбоксильных групп кислоты методом кондуктометрического титрования, состав сополимеров стирол–ВПД – по содержанию азота методом Кьельдаля. Соплимер стирол–ВП являлся коммерческим продуктом, фирмы “Aldrich Chemical Comp. Inc”. Значения ММ сополимеров стирол–ВП и стирол–МАК находили вискозиметрически. В первом случае характеристическая вязкость составляла 2.40 дл/г (хлороформ, 291 К). Использование коэффициентов уравне-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке программы “Развитие научного потенциала Высшей школы” (код проекта 4671).

E-mail: semchikov@ichem.unn.runnet.ru (Семчиков Юрий Денисович).

ния Марка–Куна–Хаувинка для поли-4-винилпиридина применительно к данному сополимеру, содержащему 90 мол. % звеньев ВП [5], привело к $M_n = 1.16 \times 10^6$. В случае сополимера стирол – МАК после предварительного метилирования диазометаном [6] значения $[\eta] = 0.520$ дл/г и $M_n = 1.69 \times 10^5$. ММ сополимера стирол – ВПД была измерена осмометрически и равна 1.7×10^5 .

Лецитин получали из желтков куриных яиц в соответствии с методикой [7].

Изотермы поверхностного давления регистрировали на приборе ЦИДНП [8]. Методика измерений приведена в работе [9]. В качестве рабочей подложки использовали бидистиллированную воду, температура 293 ± 1 К. Растворителем лецитина, сополимера стирол–ВП являлся хлороформ. Рабочие концентрации растворенных веществ составляли 2 мг/л. Раствор наносили на поверхность воды микрошприцом на 10 мкл. До начала измерения поверхность с нанесенным сополимером выдерживали в течение 15 мин для удаления растворителя.

Краевые углы смачивания в условиях натекания θ_n , измеряли гонеометрически. Величину θ_n рассчитывали, исходя из 20 опытов. Во всех случаях использовали значения θ_n в области первого плато на кинетической кривой растекания при 293 К. Подложками служили стеклянные пластинки, которые предварительно обрабатывали кипящей хромовой кислотой, промывали бидистиллированной водой и сушили до полного удаления следов влаги при 150°C в течение 1 ч. Полимер наносили на подложку путем погружения пластинки в вертикальном положении в раствор полимера (концентрация 0.5 мг/мл; растворитель хлороформ). Углы смачивания эмульсией везикул, полученной методом обращения фаз, также определяли на поверхности стекла.

Везикулы готовили двумя способами. По методу обращения фаз 0.036 г смеси лецитина и сополимера растворяли в 10 мл хлороформа, добавляли 5 мл бидистиллированной воды и обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин при частоте 44 кГц. Затем добавляли 150 мл воды и подвергали ультразвуковой обработке при 44 кГц в течение 1–2 мин. Полное удаление органического растворителя производили с помощью водоструйного насоса [10]. Везикулы на подложке получали путем нанесения хлороформного раствора леци-

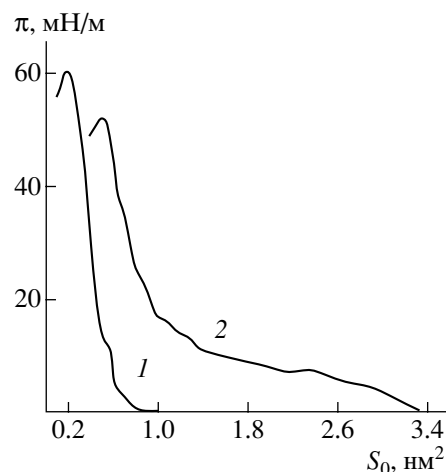


Рис. 1. Изотермы сжатия лецитина в отсутствие (1) и в присутствии сополимера стирол–ВП (2). Концентрация сополимера 3 мас. %.

тина и его смеси с сополимером на предметное стекло с последующим высушиванием под вакуумом. Подложку с высушенным слоем смеси лецитина и сополимера выдерживали в бидистиллированной воде, затем сушили в вакуумном шкафу [11].

Топографию везикул исследовали на сканирующем зондовом микроскопе “Solver Bio NT-MDT” (Зеленоград) в неконтактном режиме. Образцы готовили нанесением эмульсии везикул из микрошприца на предметное стекло (толщина 1 мм) с последующим высушиванием под вакуумом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 (кривая 1) представлена типичная изотерма сжатия $\pi = f(S_0)$ для монослоя яичного лецитина. Экстраполяция на значение $\pi = 0$ позволяет оценить молекулярную площадь лецитина $S_0 = 0.54$ нм². Теоретический расчет площади, занимаемой двумя плотно упакованными гидрофобными цепями лецитина, дает величину $S_0 = 0.41$ нм². Однако в реальных условиях молекула лецитина в монослое содержит адсорбированную воду в своей полярной части. Поэтому общепринятым значением для плотно упакованного лецитинового монослоя является величина $S_0 = 0.52–0.56$ нм² [4].

Нами установлено, что малые добавки всех использованных сополимеров приводят к увеличению эффективной молекулярной площади S_0 (т.е.

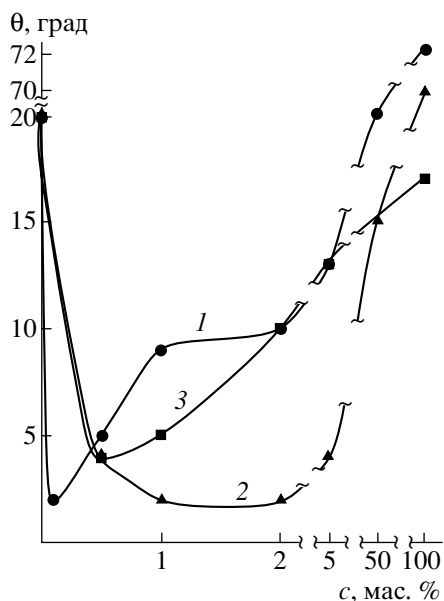


Рис. 2. Зависимость угла смачивания θ_n от содержания сополимера в смеси с лецитином: 1 – стирол-МАК ($m_2 = 0.35$), 2 – стирол-ВПД ($m_2 = 0.5$), 3 – стирол-ВП ($m_2 = 0.9$).

площади мономолекулярного слоя, деленной на число молекул лецитина) до значений 1.2–1.6 нм². В качестве примера на рис. 1 приведена изотерма сжатия смеси лецитин–(сополимер стирол-ВП). Эти значения S_0 существенно превышают те, что приняты в качестве молекулярной площади лецитина в плотно упакованном мономолекулярном слое на границе раздела вода–воздух. Отсюда можно сделать вывод о том, что макромолекулы сополимеров иммобилизуются упомянутым слоем. На это же указывают заметно меньшие величины поверхностного давления, отвечающего коллапсу мономолекулярного слоя лецитина при малых добавках сополимера.

Далее нами изучено влияние состава системы лецитин–сополимер на смачивание поверхности, поскольку смачивание отражает природу и характер межмолекулярного взаимодействия на межфазной границе раздела тонкая пленка–смачивающая жидкость. Измерение углов смачивания смесей разного состава выявило ярко выраженную экстремальную зависимость. Из рис. 2 видно, что в случае ионогенных сополимеров область минимума смещается в область малого (стирол-МАК) и очень малого (стирол-ВП) их относительного содержания. Вероятно, наличие минимума, соответствующего максимальной гидро-

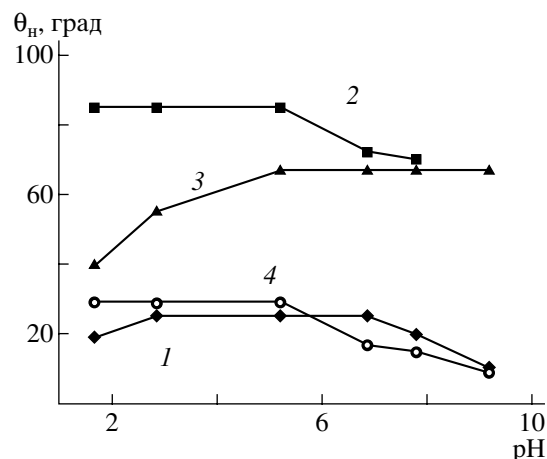


Рис. 3. Зависимость краевого угла от pH смачивающей жидкости. 1 – лецитин, 2 – стирол-МАК, 3 – стирол-ВП, 4 – 98% лецитин + 2% стирол-ВП.

фильности поверхности, обусловлено ориентацией наружу гидратированных полярных звеньев макромолекул сополимеров, адсорбированных на лецитиновом слое, покрывающем поверхность подложки. В пользу такого предположения свидетельствует смещение минимума зависимостей $\theta_n = f(c)$ в область малых и сверхмалых концентраций добавок для ионогенных сополимеров по сравнению с неионогенным, но включающим гидрофильные звенья ВПД. Ясно, что ионогенные полярные группы гидратированы в большей степени по сравнению с неионогенными. Повышение относительного содержания сополимеров приводит к постепенному увеличению угла смачивания, вплоть до значений, свойственных чистым сополимерам.

Важным фактором моделирования действия везикул в биосистеме является их отклик на изменение pH вблизи пораженного органа. Влияние pH среды на гидрофильно-гидрофобные и кислотно-основные взаимодействия было изучено на основе изменения смачиваемости тонких пленок полимеров и их смесей с лецитином под действием капли буферного раствора в широком интервале pH (рис. 3).

Известно, что тонкая лецитиновая пленка состоит из гидратированных ламелей, образованных бислоями лецитина [4]. На это, в частности, указывают низкие значения углов смачивания и, следовательно, достаточно высокая полярность поверхности, а также характер влияния pH. По-

следнее заключается в уменьшении углов смачивания как при низких, так и при высоких значениях рН, что связано с увеличением степени диссоциации ионогенных групп лецитина. Аналогичный эффект имеет место для пленок, образованных сополимерами с основной и кислотной группами. Естественно, что в данном случае углы смачивания уменьшаются лишь в одной области рН.

Смесевая пленка лецитин–(сополимер стирол–ВП) оказалась подверженной влиянию рН по отношению к смачиваемости только лишь в области больших значений рН. Это свидетельствует о том, что основные группы сополимера препятствуют дополнительной ионизации или по крайней мере гидрофиллизации основной группы лецитина в кислой среде.

Таким образом, совокупность рассмотренных данных указывает на иммобилизацию сополимеров с гидрофобно-гидрофильными звеньями и прежде всего ионогенных сополимеров в би- и монослой лецитина. Можно было ожидать, что это обстоятельство найдет отражение при визуализации везикул лецитина. Данные, полученные методом атомной силовой микроскопии, подтверждают высказанное предположение. Из рис. 4 видно, что в отсутствие сополимеров наблюдаются следы слияния везикул. В присутствии малого количества сополимера, близкого к тому, что соответствует минимуму на кривых зависимости углов смачивания от состава смеси сополимер–ПАВ, следы слияния везикул уменьшаются или исчезают. Особенно ярко этот эффект выражен для смеси лецитин–(сополимер стирол–ВП). Видно, что присутствие данного сополимера полностью исключает следы слияния везикул, т.е. в максимальной степени стабилизирует везикулы. Можно полагать, что в данном случае фрагменты ламелей лецитина армированы цепями амфифильных ионогенных сополимеров, как это было постулировано в работе [12] по отношению к полимер-коллоидным комплексам синтетических ПАВ с полиэлектролитами.

Таким образом, малые добавки амфифильных сополимеров оказывают глубокое воздействие на моно- и бислои лецитина, изменяя энергетическое состояние поверхности и, следовательно, ее смачиваемость, а также увеличивая агрегативную устойчивость везикул. Эффекты особенно

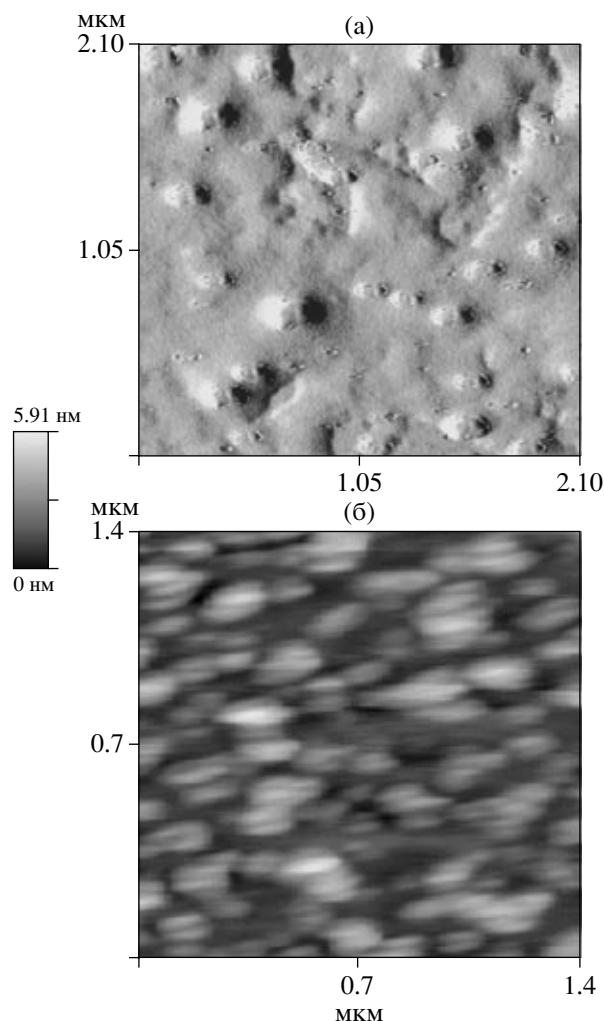


Рис. 4. Микрофотографии везикул лецитина (а) и смеси лецитина с 2 мас. % сополимера стирол–ВП (90%) (б).

существенны в присутствии ионогенного сополимера стирол–МАК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindman B., Thalberg K. // Interaction of Surfactants with Polymer and Proteins / Ed. by Goddard E.D., Ananthapadmanabhan K.P. Florida: CRS Press, 1993. P. 123.
2. Касаикин В.А., Ефремов В.А., Захарова Ю.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. РАН. 1997. Т. 354. № 4. С. 498.
3. Касаикин В.А., Литманович Е.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Докл. РАН. 1999. Т. 367. № 3. С. 359.
4. Щипунов Ю.А. // Успехи химии. 1997. Т. 66. № 4. С. 328.

5. Рафиков С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б. Введение в физико-химию растворов полимеров., М.: Наука, 1978.
6. Uhan H.U., Bhargava G.S. // J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed. 1980. V. 18. № 7. P. 465.
7. Бергельсон Л.Я., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981.
8. Абраменко Ю.М., Абрамзон А.А., Бенинг Г.П., Леишенко Ж.Я. // Коллоид. журн. 1987. Т. 49. № 1. С. 122.
9. Туршатов А.А., Семчиков Ю.Д., Зайцев С.Д., Смирнова Л.А. // Высокомолек. соедин. Б. 1998. Т. 40. № 7. С. 1238.
10. Lasic D.D. // J. Theoret. Biol., 1987. № 1. P.35.
11. Lasic D.D. // J. Colloid Interface Sci. 1988. № 124. P. 428.
12. Отдельнова М.В., Захарова Ю.А., Ивлева Е.М., Касаикин В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Высокомолек. соедин. А. 2003. Т. 45. № 9. С. 1524.

Effect of Amphiphilic Copolymers on the Properties of Lamellar and Vesicular Structures of Lecithin

M. S. Gusikhina*, Yu. D. Semchikov*, Yu. Yu. Gushchina*,
A. A. Volkov**, and N. B. Mel'nikova**

*Nizhni Novgorod State University,
pr. Gagarina 23-2, Nizhni Novgorod, 603950 Russia

**Nizhni Novgorod State Academy of Medicine,
ul. Minina 10-1, Nizhni Novgorod, 603005 Russia

Abstract—The effect of small additives of styrene–methacrylic acid ($m_2 = 0.35$), styrene–N-vinylpyrrolidone ($m_2 = 0.5$), and styrene–4-vinylpyridine ($m_2 = 0.9$) copolymers on the compression isotherms of monomolecular lecithin layers at the air–water interface and on the wettability of a lecithin bilayer supported on a solid substrate was studied. It was found that the addition of the copolymers caused an increase in the effective area per lecithin molecule and a decrease in the collapse pressure and contact angles, which indicated the immobilization of copolymer macromolecules in lecithin mono- and bilayers. Reinforcement due to this immobilization led to a rise in the aggregation stability of vesicles, which was corroborated by atomic force microscopy data.