

УДК 534.8

## ТЕПЛОВОЕ АКУСТИЧЕСКОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ В МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ ПРИ ФАЗОВОМ ПЕРЕХОДЕ ЛИПИДОВ

© 2007 г. А. А. Аносов<sup>1,2</sup>, А. С. Казанский<sup>1,3</sup>, Ю. А. Лесс<sup>2,4</sup>, А. С. Шаракшанэ<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> Институт радиотехники и электроники РАН  
125009 Москва, центр, ГСП-3, ул. Моховая, 11

<sup>2</sup> Московская Медицинская Академия им. И.М. Сеченова  
119992 Москва, ул. Б. Пироговская, 2/6

<sup>3</sup> Московский государственный институт радиотехники, электроники и автоматики  
(технический университет)  
119454 Москва, проспект Вернадского, 78

<sup>4</sup> Московский педагогический государственный университет  
119882 Москва, ул. Малая Пироговская, 1

<sup>5</sup> Институт биохимической физики РАН  
117997 Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: aanosov@atom.ru

Поступила в редакцию 26.07.06 г.

Объектом исследования были модельные мембраны – многослойные липосомы из фосфолипидов: димиристоилфосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилхолина. Измерено тепловое акустическое излучение в мегагерцовом диапазоне частот при фазовых переходах липидов из жидкокристаллического состояния в гель (при охлаждении) и, наоборот, из гель-состояния в жидкий кристалл (при нагреве суспензии липосом). При этом интенсивность теплового излучения менялась: увеличивалась при охлаждении и уменьшалась при нагреве. Показано, что это связано с повышением поглощения в липосомах при фазовом переходе.

PACS: 43.35.Fj, 64.70.Md

Измерения теплового акустического излучения в последнее время в значительной степени проводятся для получения информации о глубинной температуре биологических объектов [1–4]. Нам представляется также важным исследование теплового акустического излучения при различных процессах в биологических объектах. В качестве объекта исследования мы использовали модельные мембраны – многослойные липосомы – при фазовом переходе липидов. Подобная задача имеет практическое значение, которое связано с адресной доставкой лекарств с помощью липосом. Пациенту вводят лекарство, “закупоренное” в липосомальную оболочку, что безопасно для организма. Липосомы надо “развалить” (и тем самым вывести из них лекарство) в определенном месте – у пораженного органа. Это можно сделать, например, с помощью нагрева этого органа (и соответственно, липосом, которые в нем находятся) до температуры фазового перехода липидов, из которых сделаны липосомы [5]. При фазовом переходе происходит перестройка липидного бислоя, в нем появляются дефекты, и лекарство “выходит” из липосом наружу. Заметим, что при фазовых переходах липидов в модельных мембранах возрастает поглощение ультразвука [6], и

поэтому можно ожидать увеличения интенсивности теплового акустического излучения. С другой стороны, известно (см., например, [7]), что фазовые переходы в жидких кристаллах могут сопровождаться акустической эмиссией. Оба процесса ведут к усилению акустических сигналов.

Задача работы – измерить акустическое излучение при фазовых переходах липидов в модельных мембранах – многослойных липосомах и выяснить его причину.

В эксперименте использовали многослойные липосомы, приготовленные стандартным образом из сухих фосфолипидов димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) и дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) путем их встряхивания в дистиллированной воде. Концентрации ДМФХ и ДПФХ составляли соответственно 40 мг/мл и 25 мг/мл. В подобных условиях, как известно [8], температура фазового перехода ДМФХ составляет 24°C, а ДПФХ – 41.5°C. Энтальпия перехода (количество тепла, необходимое для осуществления перехода) составляет соответственно 6.5 и 8.7 ккал/моль. При понижении температуры мембраны в липосомах переходят из жидкокристаллического состояния в гель-состояние, при повы-

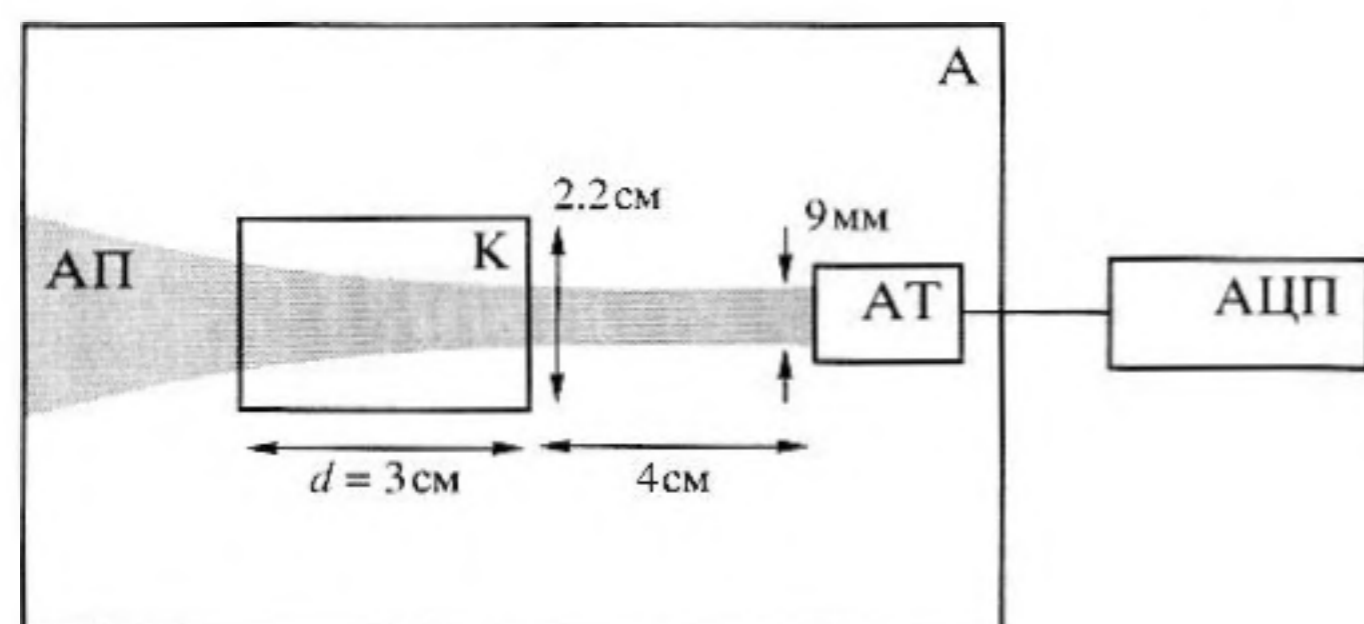


Рис. 1. Блок-схема измерительной установки: А – аквариум, АТ – акустотермометр, АЦП – аналогово-цифровой преобразователь, К – кювета, АП – апертура приемника.

шении температуры происходит обратный процесс. И в том, и в другом состояниях модельная мембрана остается двуслойной, т.е. состоит из двух слоев липидов. При этом гидрофильные части фосфолипидов и одного, и другого слоя ориентированы наружу, гидрофобные – друг на друга. При фазовом переходе меняется толщина мембраны (в гель-состоянии мембрана немного толще) и плотность упаковки молекул (площадь на одну молекулу на поверхности мембраны больше в жидкокристаллическом состоянии).

Акустическая схема эксперимента показана на рис. 1. Измерения проводили в аквариуме А размером  $43 \times 43 \times 15$  см<sup>3</sup>, заполненном водой. Приемник акустических сигналов – акустотермометр АТ, разработанный группой С.Н. Антонова и В.И. Миргородского [2] – имел следующие параметры: средняя частота приема – около 1.8 МГц, полоса пропускания – около 350 кГц, диаметр приемника – 9 мм. Сигнал усиливался и подавался на 12-ти разрядный АЦП с максимальной частотой дискретизации 30 МГц. Коэффициент потерь акустотермометра составлял около 2.5. Т.е. при увеличении интенсивности полезного сигнала (температуры исследуемого объекта) на 10% измеряемый сигнал возрастал на 4%. На акустической оси акустотермометра на расстоянии 4 см устанавливали исследуемый объект: кювету К с суспензией липосом из ДМФХ или из ДПФХ, с водой или с пластилином. Кювета представляла собой цилиндр длиной  $d = 3.0$  см и диаметром 2.2 см. Боковая поверхность цилиндра была пластмассовой, основания были сделаны из тонкой акустически прозрачной пленки – латекса. Размеры кюветы были подобраны так, чтобы апертура приемника АП полностью проходила сквозь кювету, не пересекая боковой поверхности. Кювету предварительно нагревали или охлаждали относительно аквариума на температуру  $\Delta T$ , после чего помещали в аквариум и проводили акустические измерения в течение 5 мин. За это время температура кюветы практически успевала сравняться с температурой аквариума, которую контролиро-

вали ртутным и электронным термометрами. Погрешность измерения температуры не превышала 0.3 К.

Акустотермометр измерял давление акустических волн, пришедших к приемнику из аквариума. Это шумовой сигнал, нормально распределенный относительно нуля. Определяемой величиной является квадрат давления. Для получения независимых отсчетов частота съема в 30 МГц избыточна. Достаточно использовать 400 кГц (эта величина определяется полосой пропускания акустотермометра).

Мы также провели измерения поглощения ультразвука суспензией липосом из ДПФХ и из ДМФХ активным способом при разных температурах. Для этого в измерительную схему добавили пьезопреобразователь (на рис. 1 не показан), на который подавали гармонический сигнал частотой 1.8 МГц от генератора Гб-34. Сигнал из пьезопреобразователя проходил через кювету и регистрировался акустотермометром. Температуры кюветы и аквариума совпадали. Подобные измерения проводили и для кюветы с водой, что позволяло определить коэффициент пропускания сигнала для кюветы с суспензией липосом.

Вернемся к измерениям теплового излучения. Если квадрат измеряемого давления проградуировать в градусах, то получится акустояркая температура [1]. Для калибровки использовался пластилин – акустически черное тело. Полученная при этом акустояркая температура определяется температурой пластилина. Для представления результатов удобнее использовать инкремент акустояркой температуры  $\Delta T_A$ , который равен разности акустояркой температуры кюветы и термодинамической температуры аквариума. Если в аквариум поместить нагретую кювету с веществом, поглощение которого не меняется, то по мере охлаждения кюветы сигнал  $\Delta T_A$ , максимальный вначале, будет постепенно спадать до нуля (в этот момент температуры кюветы и аквариума сравниваются). Если в аквариум поместить такую же, но охлажденную кювету, то сигнал  $\Delta T_A$ , отрицательный вначале, будет постепенно нарастать до нуля (в этот момент температуры кюветы и аквариума сравниваются). Если считать, что температура во всем объеме кюветы постоянна, то инкремент акустояркой температуры определяется выражением [1]:

$$\Delta T_A = \Delta T[1 - \exp(-\alpha d)], \quad (1)$$

где  $\Delta T$  – разность температур кюветы и аквариума (эта величина в процессе эксперимента меняется со временем),  $\alpha$  – коэффициент поглощения по интенсивности ультразвука веществом в кювете. Величина  $\exp(-\alpha d)$  является коэффициентом пропускания, а выражение в квадратных скобках  $[1 - \exp(-\alpha d)]$  удобно назвать “чернотой” кюветы. Если кювета содержит пластилин, то ее “черно-

та" равна единице, а инкремент акустояркой температуры равен разности температур пластилина и воды в аквариуме. В другом крайнем случае, если кювета содержит слабопоглощающую жидкость, например, воду, то инкремент акустояркой температуры близок к нулю.

Предположение, что при нагреве или охлаждении кюветы ее температура во всем объеме остается постоянной, требует комментария. На самом деле, температура в разных частях кюветы различна. В этом случае выражение (1) остается справедливым, но  $\Delta T$  становится эффективным параметром, который зависит от пространственного распределения температуры. Изменение температуры определяется теплопроводностью и конвекцией. Если учитывать только теплопроводность, то при решении одномерного уравнения теплопроводности методом Фурье возникает целый набор характерных времен релаксации  $\tau_k = d^2 c \rho / (k^2 \pi^2 \lambda)$ , где  $k$  – натуральные числа,  $c = 4190$  Дж/(кг град) – удельная теплоемкость воды (вкладом липосом в теплоемкость мы пренебрегли),  $\rho = 1000$  кг/м<sup>3</sup> – плотность воды,  $\lambda = 0.6$  Вт/(м град) – коэффициент теплопроводности воды. Расчеты показывают, что максимальное характерное время (при  $k = 1$ ) составляет около 10 мин. В эксперименте период, за который инкремент температуры уменьшается вдвое, составляет около 1 мин. Это показывает, что основной вклад в изменение температуры (что естественно для жидкостей) вносит конвекция. Это, в свою очередь, позволяет считать инкремент температуры в кювете практически постоянным и равным параметру  $\Delta T$  в выражении (1).

Результаты калибровки показаны на рис. 2, где представлены временные зависимости 1–4 инкрементов акустояркой температуры  $\Delta T_A$  в единицах младшего разряда (ЕМР)<sup>1</sup> для кювет с пластилином, которые нагревались и охлаждались в аквариуме при разных температурах. Измеряемый сигнал является шумовым, поэтому для получения более точных результатов требуется усреднение. Мы усредняли по времени (за 1 с или по  $4 \times 10^5$  отсчетам) и по ансамблю, проводя несколько аналогичных измерений. При этом данные 1 на рис. 2 получены путем усреднения девяти измерений, данные 2 – трех, а данные 3 и 4 – четырех измерений. С этим связано различие между кривыми в размахе шумовых дорожек. Кроме этого, выходной сигнал зависит от температуры акустотермометра, т.е. от температуры аквариума. Для калибровки сигнала в градусах

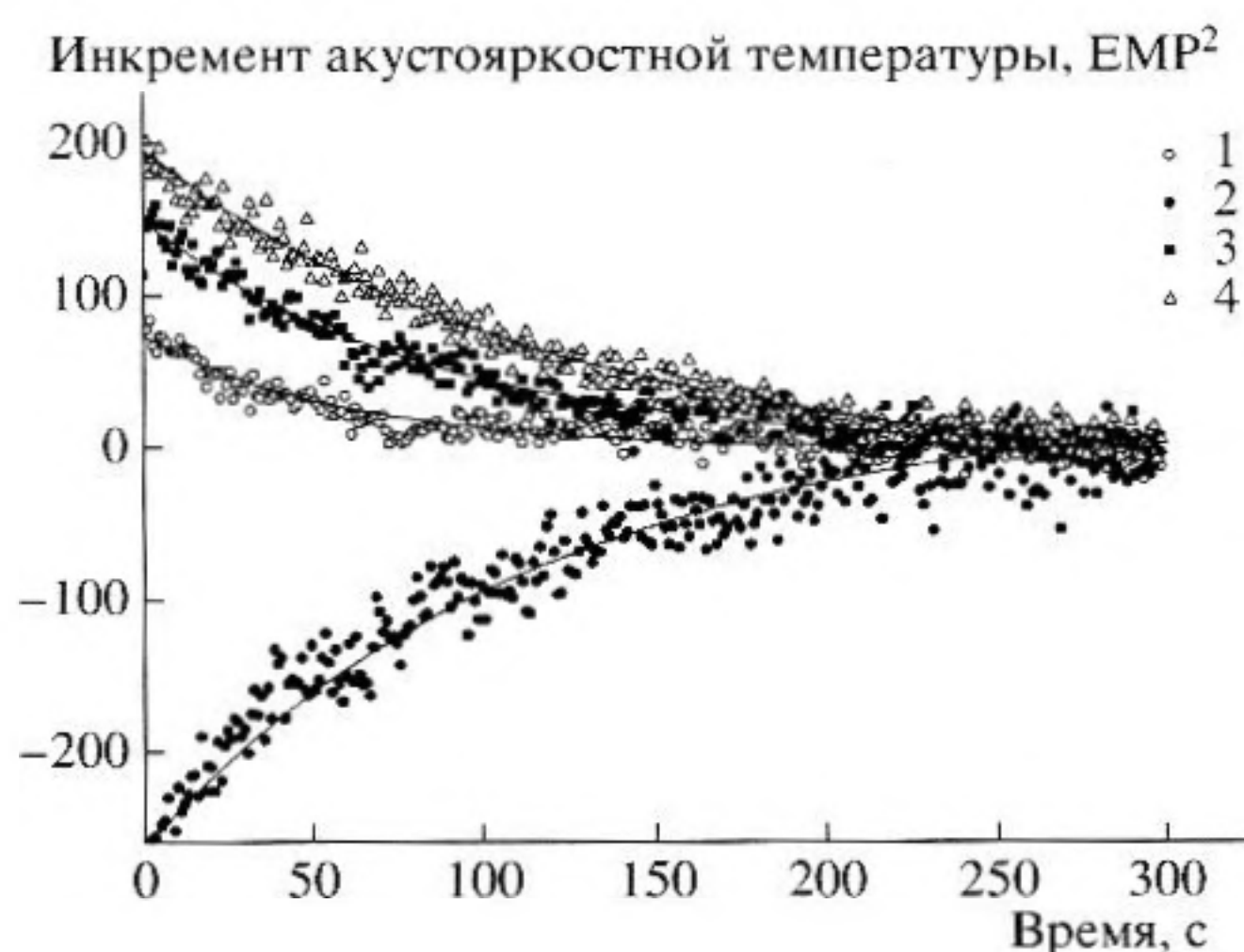
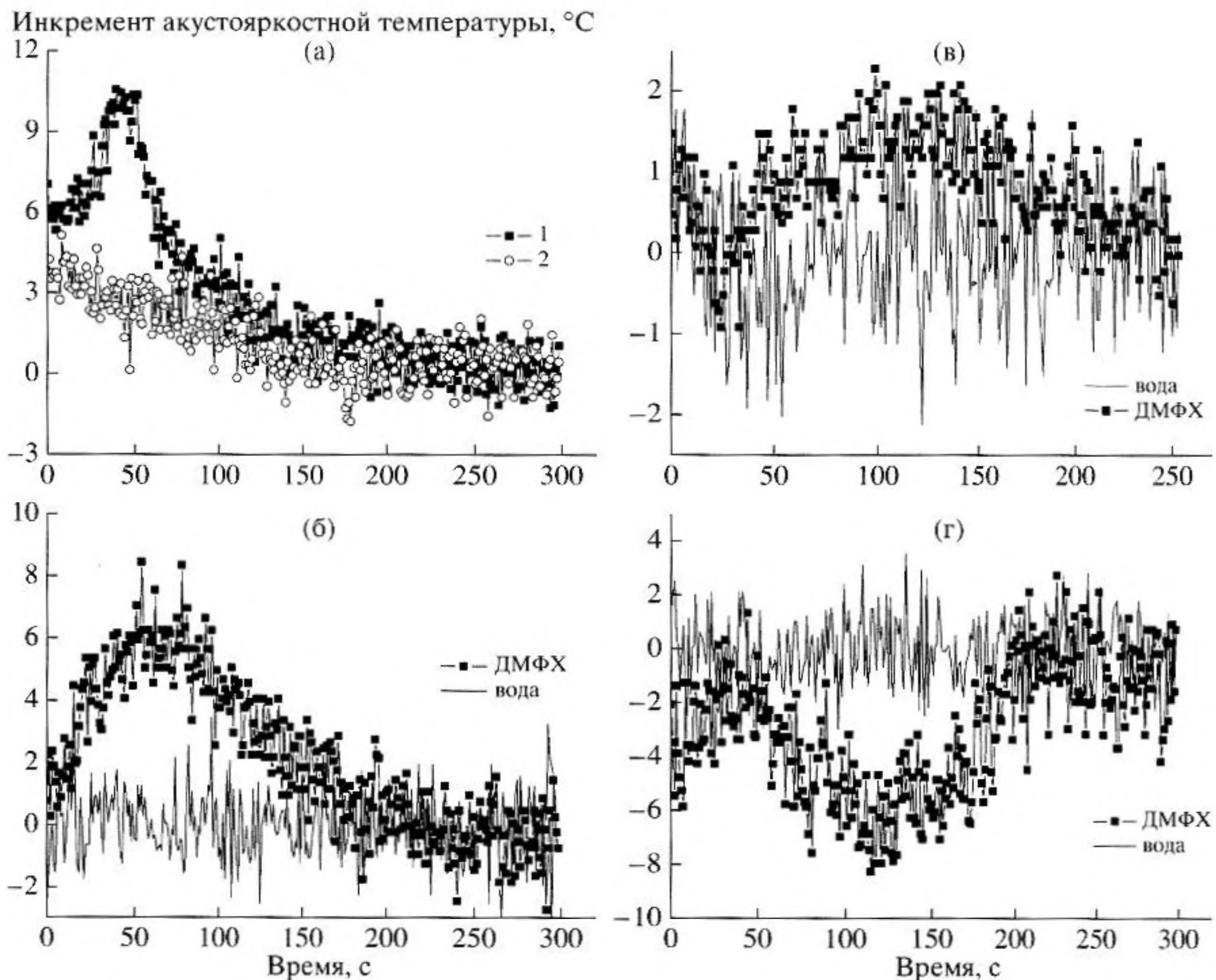


Рис. 2. Калибровочные кривые. Зависимости инкремента акустояркой температуры акустического черного тела – пластилина – от времени (1–4) при различных температурах аквариума (21.2, 33.4, 13.0, 19.0°C) и начальных температурах пластилина (28.5, 12.3, 32.5, 36.3°C, соответственно).

важна разница температур пластилина и аквариума. Для измерений под номерами 1, 3 и 4 эта разница положительна – пластилин предварительно нагрет относительно аквариума и охлаждается в нем, в случае 2 – отрицательна – пластилин предварительно охлажден и нагревается. Временные зависимости инкремента акустояркой температуры приближали экспонентами  $\Delta T_A \approx A_1 \exp(-A_2 t)$ , где  $A_1$  и  $A_2$  – определяемые коэффициенты,  $t$  – время. Для аппроксимации использовали метод наименьших квадратов. Коэффициент  $A_2$  определяется характерным временем изменения температуры пластилина и в данной задаче не играет существенной роли. Существенную информацию несет коэффициент  $A_1$  – он позволяет определить искомый калибровочный множитель, равный отношению  $A_1$  (ЕМР<sup>2</sup>)/ $\Delta T$  (град). Усреднение полученных данных позволяет оценить погрешность измерений – калибровочный множитель равен  $12.1 \pm 0.4$  ЕМР<sup>2</sup>/град.

Полученные в эксперименте результаты представлены (с учетом описанной выше калибровки) на рис. 3 и сведены в табл. На рис. 3а показаны инкременты акустояркой температуры  $\Delta T_A$  при охлаждении кюветы с липосомами из ДПФХ. В одном случае (кривая 1) суспензия липосом предварительно нагрета выше температуры фазового перехода ДПФХ, в другом (кривая 2) случае – ниже. И там, и там температура аквариума ниже температуры фазового перехода. Это приводит к тому, что в первом случае липосомы, охлаждаясь, “проходят” область фазового перехода, а во втором – нет. На рис. 3б и 3в показаны инкременты  $\Delta T_A$  при охлаждении, а на рис. 3г –

<sup>1</sup> Единицы младшего разряда (ЕМР) – обозначение, используемое при цифровой обработке сигналов. Для 12-ти разрядного АЦП преобразованный измеряемый сигнал лежит в диапазоне от  $-2^{11}$  до  $2^{11} - 1$  ЕМР.



**Рис. 3.** Временные зависимости инкрементов акустостойкостной температуры кювет с суспензией липосом из ДПФХ (а) при начальной температуре 51.1°C (кривая 1) и 36.0°C (кривая 2); из ДМФХ и с водой (б – г) при начальных температурах (32.0, 28.6, 13.8°C, соответственно). Температуры аквариума – 19.7, 13.8, 21.4, 33.8°C, для (а – г) соответственно.

инкремент  $\Delta T_A$  при нагреве кюветы с липосомами из ДМФХ. Для сравнения на рис. 3б и 3в (3г) показаны аналогичные зависимости, полученные при охлаждении (при нагреве) кюветы с водой при тех

Тепловое акустическое излучение суспензии липосом из ДМФХ и ДПФХ

липид	разница ТФП и аквариума $\Delta T$ , град	“чернота” кюветы при ТФП, эксперимент	$\Delta T_A$ , град, эксперимент	$\Delta T_A$ , град, расчет по формуле (1)
ДПФХ, рис. 3а	21.8	$0.65 \pm 0.1$	$10.0 \pm 0.2$	$14 \pm 2$
ДМФХ, рис. 3б	10.2	$0.6 \pm 0.1$	$5.0 \pm 0.2$	$6 \pm 1$
ДМФХ, рис. 3в	2.6	$0.6 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.3$
ДМФХ, рис. 3г	-9.8	$0.6 \pm 0.1$	$-5.7 \pm 0.3$	$-6 \pm 1$

же условиях. Усреднение результатов проводилось так же, как и для пластилина – по времени (за 1 с) и по ансамблю из нескольких измерений: данные на рис. 3а и 3б получены путем усреднения четырех измерений, на рис. 3в – девятнадцати, а на рис. 3г – трех измерений. Результаты показывают, что во всех случаях, если липосомы из ДПФХ или из ДМФХ “проходят” область фазового перехода, инкремент акустостойкостной температуры имеет экстремум (максимум или минимум). Если липосомы “не проходят” область фазового перехода или в кювете нет липосом (а есть вода или пластилин), то инкремент акустостойкостной температуры (в пределах погрешности) меняется монотонно. В связи с этим возникают вопросы: чем обусловлено изменение характера акустического излучения при фазовом переходе липидов в липосомах? Возникают ли нетепловые источники, или это тепловое излучение, связанное с увеличением поглощения в липосомах при фазовом переходе липидов? Ведь из литературы (см., например, [6]) известно, что при фазовом пе-

реходе возникает добавочное поглощение ультразвука, связанное с гетерофазными флуктуациями плотности липидов.

Для ответов на поставленные вопросы предлагается сравнить экспериментальные данные для инкрементов акустостоярковой температуры  $\Delta T_A$  и расчетные величины  $\Delta T_A$ , полученные по формуле (1). Если экспериментальные и расчетные величины будут близки, то наблюдаемый эффект определяется тепловым излучением. Согласно выражению (1) инкремент акустостоярковой температуры  $\Delta T_A$  кюветы в области фазового перехода липидов определяется разностью  $\Delta T$  между температурой фазового перехода (ТФП) липидов и температурой аквариума (эта разность приведена во втором столбце табл. 1) и поглощением ультразвука в кювете или "чернотой" кюветы. Результаты измерения "черноты" кюветы при ТФП липидов, проведенные активным способом, указанным выше, представлены в третьем столбце.

В четвертом и в пятом столбцах показаны максимальные отклонения инкрементов акустостоярковой температуры  $\Delta T_A$ , полученные экспериментально (см. рис. 3), и рассчитанные по формуле (1), исходя из данных второго и третьего столбцов. Как видно из табл. 1, экспериментальные данные близки к расчетным значениям инкремента  $\Delta T_A$ , но существует систематический сдвиг – экспериментальные данные по модулю несколько ниже расчетных. Этот результат можно объяснить следующим образом. "Чернота" кюветы с липосомами (табл. 1, столбец 3) определялась в условиях, когда температуры кюветы и аквариума совпадали. Т.е. температура всей кюветы с липосомами была равна ТФП и поглощение ультразвука было максимальным. При регистрации собственного излучения температура внутри кюветы немного менялась от краев к центру. При этом некоторая часть кюветы имела температуру, не совпадающую с ТФП, что приводило к уменьшению ее "черноты" и, следовательно, к снижению интенсивности теплового излучения.

Пользуясь представленными результатами, проанализируем как меняется акустическое излучение суспензии липосом из ДМФХ при разных условиях. Кюветы с липосомами охлаждали при двух разных значениях температуры аквариума (см. рис. 3б и в и табл. 1, строки 2 и 3) и нагревали (рис. 3г, табл. 1, строка 4). При охлаждении в момент фазового перехода разность термодинамических температур кюветы и аквариума была разной. Чем больше эта разность, тем больше тепловое акустическое излучение (инкремент акустостоярковой температуры), что мы и видим в эксперименте. Если же начальная температура

кюветы ниже, чем температура аквариума (см. рис. 3г и строку 4), и кювета прогревается, то в области фазового перехода возникает минимум интенсивности теплового акустического излучения, что также видим в эксперименте.

Этот эффект требует некоторого комментария. Акустотермометр (см. рис. 1) получает сигнал из кюветы и из всего аквариума. Температура кюветы ниже, чем температура аквариума. Если кювета пропускает акустические сигналы, то акустотермометр регистрирует больший сигнал из аквариума, так как температура аквариума высока. Если кювета достаточно "черная", то сигнал из аквариума поглощается в кювете, а акустотермометр регистрирует меньший сигнал из кюветы, поскольку температура кюветы мала. Этот случай и наблюдается при нагреве кюветы с липосомами из ДМФХ.

Таким образом, нами зарегистрировано изменение акустического излучения суспензии многослойных липосом при фазовом переходе липидов и показано, что это изменение теплового излучения. Причиной усиления тепловой эмиссии является увеличение поглощения в липосомах при фазовом переходе. Практическая значимость полученного результата связана с контролем температуры при адресной доставке лекарств с помощью липосом. Если предполагается методом акустотермографии контролировать температуру пораженного органа, в котором находятся липосомы, то в момент фазового перехода измеряемый сигнал будет изменяться.

Работа поддержана РФФИ (грант № 05-02-17646).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пасечник В.И. Оценка чувствительности метода акустотермографии // Акуст. журн. 1990. Т. 36. № 4. С. 718–724.
2. Миргородский В.И., Герасимов В.В., Пешин С.В. Экспериментальные исследования особенностей пассивной корреляционной томографии источников некогерентного акустического излучения меггерцового диапазона // Акуст. журн. 2006. Т. 52. № 5. С. 606–612.
3. Кротов Е.В., Ксенофонтов С.Ю., Мансфельд А.Д., Рейман А.М., Санин А.Г., Прудников М.Б. Экспериментальные исследования возможностей многоканальной акустической термотомографии // Изв. ВУЗов РАДИОФИЗИКА. 1999. Т. XLII. № 5. С. 479–484.
4. Буров В.А., Дариалашвили П.И., Румянцева О.Д. Активно-пассивная термоакустическая томография // Акуст. журн. 2002. Т. 48. № 4. С. 474–484
5. Needham D., Anyarambhatla G., Kong G., Dewhirst M.W. A New Temperature-Sensitive Liposome for Use with Mild Hyperthermia: Characterization and Test-

- ing in a Human Tumor Xenograft Model // *Cancer Research: Advances in Brief*. 2000. V. 60. № 5. P. 1197–1201.
6. *Kharakoz D.P., Golotto A., Lohner K., Laggner P.* Fluid-gel interphase line tension and density fluctuations in dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles. An ultrasonic study // *J. Phys. Chem.* 1993. V. 97. P. 9844–9851.
7. *Аксельрод Е.Г., Беспалов В.В., Добрин В.А., Крюк В.И., Кузьмин А.Н., Мелехин В.П.* Акустическая эмиссия при фазовом переходе первого рода в жидком кристалле. Доклады Академии Наук. 1995. Т. 345. № 3. С. 320–323.
8. *Генис Р.* Биомембраны: молекулярная структура и функции: Пер. с англ. М.: Мир, 1997. 624 с.

## Thermal Acoustic Radiation in Model Membranes at Phase Transition of Lipids

A. A. Anosov<sup>a,b</sup>, A. S. Kazanskiĭ<sup>a,c</sup>, Yu. A. Less<sup>b,d</sup>, and A. S. Sharakshané<sup>b,e</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Mokhovaya 11, Moscow, 125009 Russia  
e-mail: aanosov@atom.ru*

<sup>b</sup> *Sechenov Medical Academy, Moscow, ul. B. Pirogovskaya 2/6, Moscow, 119992 Russia*

<sup>c</sup> *Moscow State Institute of Radio Engineering, Electronics, and Automation (Technical University),  
pr. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia*

<sup>d</sup> *Moscow Pedagogical State University, ul. Malaya Pirogovskaya 1, Moscow, 119882 Russia*

<sup>e</sup> *Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 117997 Russia*

**Abstract**—The objects under investigation were model membranes, i.e., multilayer liposomes from phospholipids (dimyristoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine). Thermal acoustic radiation was measured in the megahertz frequency range at phase transitions of lipids from a liquid crystal state to a gel (on cooling) and, vice versa, from a gel state to a liquid crystal (on heating of the liposome suspension). In this case, the intensity of thermal radiation varied, i.e., increased on cooling and decreased on heating. This effect was shown to be related to the increase in absorption in liposomes at the phase transition.