

О формировании макроскопически плоской фосфолипидной мембраны на гидрозольной подложке

А. М. Тихонов⁺¹⁾, В. Е. Асадчиков*, Ю. О. Волков*

⁺Институт физических проблем им. Капицы РАН, 119334 Москва, Россия

*Институт кристаллографии им. Шубникова РАН, 119333 Москва, Россия

Поступила в редакцию 3 августа 2015 г.

Методом рентгеновской рефлектометрии с использованием синхротронного излучения исследована зависимость структуры фосфолипидного слоя (DSPC и SOPC), адсорбированного на гидрозольной подложке, от концентрации NaOH в растворе 5-нанометровых частиц кремнезема. С помощью модельного независимого подхода по экспериментальным данным восстановлены профили электронной концентрации (поляризуемости), согласно которым толщина липидной пленки может варьироваться от монослоя ($\sim 35 \text{ \AA}$) до нескольких бислоев ($\sim 450 \text{ \AA}$). При объемной концентрации NaOH ~ 0.5 моль/л пленка на поверхности гидрозоля представляет собой макроскопически плоскую фосфолипидную мембрану (бислой) толщиной $\sim 60 \text{ \AA}$ и с площадью, приходящейся на молекулу DSPC и SOPC, 45 ± 2 и $49 \pm 3 \text{ \AA}^2$ соответственно.

DOI: 10.7868/S0370274X15190157

Фосфолипидный бислой представляет собой простейшую модель клеточной мембраны [1–3]. Ранее нами сообщалось о способе получения макроскопически плоских мультислоев липидных мембран на сильно поляризованной подложке из водного раствора аморфных наночастиц кремнезема [4]. Применяв модельно-независимый подход при восстановлении профилей электронной концентрации [5, 6], из данных рентгеновской рефлектометрии мы установили, что толщина фосфолипидного мультислоя определяется параметрами гидрозоля, которые задают ширину поверхностного электрического двойного слоя: концентрацией ионов Na^+ , уровнем pH и размером наночастиц. В частности, при определенных условиях на поверхности гидрозоля 5-нанометровых частиц спонтанно образуется макроскопически плоская фосфолипидная мембрана.

Пленки 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) и 1-стеароил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (SOPC, см. рис. 1) приготавливались

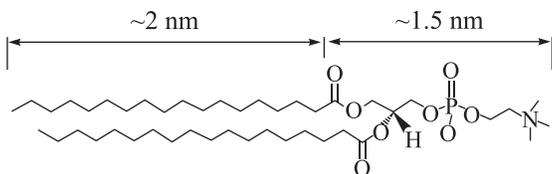


Рис. 1. Молекулярная структура фосфолипида DSPC

и изучались в соответствии с методикой, описанной в работе [4]. На поверхность жидкой подложки, помещенной во фторопластовую тарелку диаметром ~ 100 мм, с помощью шприца высаживалась капля раствора фосфолипида в хлороформе объемом 10–20 мкл, содержащая достаточное количество вещества для того, чтобы при ее растекании по поверхности сформировать более десяти монослоев липида. Адсорбированная пленка при этом находится в равновесии с трехмерными агрегатами, в которые аккумулируется избыток поверхностно-активного вещества. Изменение поверхностного натяжения γ границы воздух–гидрозоль с ~ 74 до ~ 50 – 30 мН/м регистрировалось по методу Вильгельми с помощью датчика поверхностного давления NIMA PS-2. Далее образец приводился в равновесие в герметичном одноступенчатом термостате при $T = 298$ К в течение ~ 12 ч.

Порошки и растворы в хлороформе синтетических DSPC и SOPC приобретались у Avanti Polar Lipids, а хлороформ ($\sim 99.8\%$) – у Sigma-Aldrich. Гидрофобная часть молекул этих липидов ($L_1 \approx 2$ нм) представляет собой две углеводородные цепи из 18 атомов углерода. Гидрофильная часть молекулы ($L_2 \approx 1.5$ нм) образована глицерином и фосфохолином. Единственное отличие в строении DSPC и SOPC – это наличие у последнего двойной углеродной связи между 9-м и 10-м атомами в одной из углеводородных цепей. В молекуле DSPC (или $\text{C}_{44}\text{H}_{88}\text{NO}_8\text{P}$) содержится $\Gamma = 438$ электронов, а в

¹⁾e-mail: tikhonov@kapitza.ras.ru

SOPC (или $C_{44}H_{86}NO_8P$) – на два меньше ($\Gamma = 436$).

Концентрированный монодисперсный золь Ludox FM, стабилизированный гидроксидом натрия, был предоставлен компанией Grace Davison. Этот водный раствор плотностью 1.1 г/см^3 содержит кремнеземные аморфные частицы диаметром $D \approx 5 \text{ нм}$ (16% SiO_2 , 0.3% Na по массе и $\text{pH} \approx 10$).

Обогащение гидрозоля NaOH проводилось в колбе путем его смешивания (взбалтывания и последующего помещения в ультразвуковую ванну Branson 2510) с раствором ($\sim 5 \text{ моль/л}$) гидроксида щелочного металла (99.95% по содержанию металла, Sigma-Aldrich) в деионизированной воде (Barnstead UV). При этом очень важно, чтобы уровень pH-золя не превышал критического значения $\text{pH}_c < 12$, при котором происходит процесс коагуляции наночастиц [7].

Поперечное строение липидных пленок было исследовано методом рефлектометрии с использованием синхротронного излучения на станции X19C синхротрона NSLS, которая оборудована универсальным спектрометром для изучения поверхности жидкости [8]. Источником излучения для X19C является поворотный магнит с критической энергией $\sim 6 \text{ кэВ}$. В экспериментах использовался сфокусированный монохроматический рентгеновский луч с интенсивностью $\approx 10^{11} \text{ ф/с}$ и энергией фотонов $E = 15 \text{ кэВ}$ ($\lambda = 0.825 \pm 0.002 \text{ \AA}$). Фокусировка луча с поперечным сечением на выходе из магнита 5 мм в высоту и 40 мм в ширину осуществлялась с помощью тороидального зеркала с фокусным расстоянием $\sim 10 \text{ м}$. Далее луч с диаметром поперечного сечения менее 1 мм отклонялся к поверхности образца, ориентированной силой гравитации, с помощью однокристалльного монохроматора (Si (111)). Таким образом, при измерении коэффициента отражения можно было перекрыть диапазон углов скольжения α от 0 до $\sim 8^\circ$. Монохроматор спектрометра собран на основе трехкружного гониометра (Huber), имеет водяное охлаждение и расположен в герметичной емкости, заполненной газообразным гелием под небольшим избыточным давлением ($\sim 10 \text{ торр}$). В эксперименте геометрические параметры падающего на поверхность образца луча, а также пространственное разрешение детектора контролировались с помощью щелей. В данной работе измерения коэффициента отражения были произведены с угловым разрешением детектора $\Delta\beta \approx 0.02^\circ$ в вертикальной плоскости и $\approx 0.8^\circ$ в горизонтальной.

Пусть \mathbf{k}_{in} , \mathbf{k}_{sc} – волновые вектора падающего и рассеянного в направлении точки наблюдения лучей

соответственно. Вектор рассеяния $\mathbf{q} = \mathbf{k}_{in} - \mathbf{k}_{sc}$ при зеркальном отражении ($\alpha = \beta$) имеет только одну компоненту, $q_z = (4\pi/\lambda) \sin(\alpha)$, где α и β – углы скольжения и рассеяния в плоскости, нормальной к поверхности (см. вставку к рис. 2).

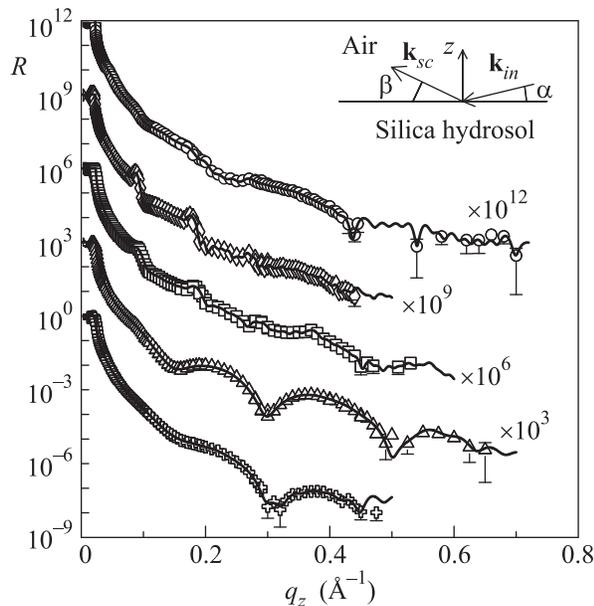


Рис. 2. Коэффициент отражения R границы воздух–гидрозоль с адсорбированной пленкой липида: кружки – монослой DSPC ($\text{pH} \approx 10$); ромбы – мульти-слой DSPC ($\text{pH} \approx 10$); квадраты – мульти-слой DSPC ($\text{pH} \approx 11$); треугольники и кресты – бислой DSPC и SOPC, соответственно ($\text{pH} \approx 11.5$); сплошные линии – результат расчета. Вставка: \mathbf{k}_{in} , \mathbf{k}_{sc} – волновые вектора падающего и рассеянного в направлении точки наблюдения лучей соответственно

При измерении кривой отражения происходит усреднение влияния латеральных неоднородностей поверхности и приповерхностных слоев, так как характерная площадь области засветки образца зондирующим пучком $\sim 10^2 \text{ мм}^2$. Это позволяет рассмотреть восстановленные структуры в рамках представления идеальной слоисто-неоднородной среды.

Детальная реконструкция распределений поляризуемости среды $\delta(z)$ по глубине z проводилась с использованием модельно-независимого подхода, основанного на экстраполяции асимптотики угловой зависимости коэффициента отражения в область больших α [5, 6]. Предполагается наличие в реконструируемой структуре особых “точек разрыва”, в которых $\delta(z)$ либо его n -я производная $\delta^{(n)}(z)$ меняется скачкообразно:

$$D^{(n)}(z_j) \equiv \frac{d^n \delta}{dz^n}(z_j + 0) - \frac{d^n \delta}{dz^n}(z_j - 0), \quad (1)$$

где z_j – координата j -й точки разрыва. В свою очередь, в рамках первого борновского приближения асимптотическое поведение амплитудного коэффициента отражения имеет вид

$$r(q_z \rightarrow \infty) \simeq - \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \left(\frac{i}{q_z} \right)^{n+2} \sum_{j=1}^m D^{(n)}(z_j) e^{iq_z z_j}. \quad (2)$$

Подход [5] утверждает, что заданному сочетанию из m «точек разрыва» $D^{(n)}(z)$ соответствует конечное число различных амплитудных коэффициентов отражения, описывающих экспериментально измеренное значение квадрата их модуля R в некотором интервале q_z . В частности, если расстояния между всеми «точками разрыва» различны, то существует всего два решения $\delta(z)$, удовлетворяющих требуемой асимптотике кривой отражения.

Процедура модельно-независимого восстановления профиля поляризуемости состоит из двух этапов. Сперва для исследуемой структуры посредством анализа зависимости Rq_z^{2n+4} определяются порядок и расположение «точек разрыва» (где $n = 0, 1, 2, \dots$ – искомый порядок особых точек). Затем проводится численная оптимизация распределения $\delta(z_1, \dots, z_M)$, разбитого на большое число $M \sim 100$ тонких слоев. При этом расчетная кривая отражения R_c подгоняется к экспериментально измеренной кривой R с применением стандартного алгоритма Левенберга–Марквардта [9].

В данной работе все экспериментальные кривые спадают $\propto 1/q_z^6$. Поэтому для описания структур достаточно использовать только особые точки 1-го порядка. В этом случае целевая функция невязки, обеспечивающая требуемое асимптотическое поведение угловой зависимости коэффициента отражения, имеет вид:

$$\begin{aligned} MF(\delta_1, \dots, \delta_M) = & \\ = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N & \left[\log R(q_j) - \log R_c(q_j) \right]^2 + \\ + Q_1 \sum_{j \neq j_1, \dots, j_m}^{M-1} & (\delta_{j-1} + \delta_{j+1} - 2\delta_j)^2 + \\ + Q_2 \sum_{j=j_1 \dots j_m}^m & (\delta_{j+1} - \delta_j), \end{aligned} \quad (3)$$

где N – число экспериментальных точек, j_1, \dots, j_m – положения «точек разрыва», $Q_{1,2}$ – параметры, регулирующие точность подгонки ($Q \approx 10^9$). Вторая сумма в (3) обеспечивает непрерывность профиля $\delta(z)$ в интервалах между точками разрыва z_1, \dots, z_n , а третья – 1-й порядок точек разрыва.

Восстановленному профилю $\delta(z)$ соответствует распределение электронной концентрации $\rho(z)$ [10]:

$$\rho = \frac{2\pi}{r_0 \lambda^2} \delta, \quad (4)$$

где $r_0 = 2.814 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}$ – классический радиус электрона. Далее зависимость $\rho(z)$ можно использовать, например, для оценки площади A на одну молекулу в монослой толщиной $d = z_2 - z_1$:

$$A = \frac{\Gamma}{\int_{z_1}^{z_2} \rho(z) dz}. \quad (5)$$

На рис. 2 символами представлены экспериментальные зависимости коэффициента отражения $R(q_z)$ для границ воздух–гидрозоль 5-нанометровых частиц с адсорбированной пленкой липида. Кружки соответствуют поверхности золя с $\text{pH} \approx 10$ (Ludox FM), количества высаженного на которой DSPC недостаточно для формирования однородного монослоя на всей поверхности подложки. Период осцилляции R для этой системы $\Delta q_z \approx 0.25 \text{ \AA}^{-1}$, что предполагает наличие в области засветки адсорбированного слоя толщиной в монослой ($\sim 2\pi/\Delta q_z \approx 30 \text{ \AA}$). Ромбами показана зависимость $R(q_z)$ для той же поверхности золя с $\text{pH} \approx 10$, но с однородным мультислоем DSPC. Квадратами представлена поверхность обогащенного NaOH (~ 0.3 моль/л) золя с $\text{pH} \approx 11$ с мультислоем того же фосфолипиды. Последние две зависимости аналогичны ранее опубликованным данным для гидрозольных подложек с частицами кремнезема диаметром ~ 22 нм и $\text{pH} \approx 9$ [4]. Кривые, представленные треугольниками (слой DSPC) и крестами (слой SOPC), получены для подложек, обогащенных NaOH (~ 0.5 моль/л), с $\text{pH} \approx 11.5$. Период осцилляций R на этих кривых $\Delta q_z \approx 0.15 \text{ \AA}^{-1}$, т.е. толщина адсорбированного слоя $\sim 2\pi/\Delta q_z \approx 50 \text{ \AA}$ (бислой).

Согласно восстановленному для монослоя DSPC профилю $\rho(z)$ (рис. 3а, где $\rho_w = 0.333 e^-/\text{\AA}^3$ – электронная концентрация в воде при нормальных условиях) его толщина $36 \pm 2 \text{ \AA} \approx L_1 + L_2$, т.е. все молекулы преимущественно ориентированы вдоль нормали к поверхности. Несмотря на то что расчетная площадь на молекулу $A = 44 \pm 2 \text{ \AA}^2$ хорошо согласуется со значением для кристаллического монослоя, электронная концентрация в области гидрофильной группы все же меньше, чем в модельном распределении (штриховая линия на рис. 3а) для монослоя DSPC из работы [4]. Это, по-видимому, свидетельствует о неполном заполнении липидного слоя.

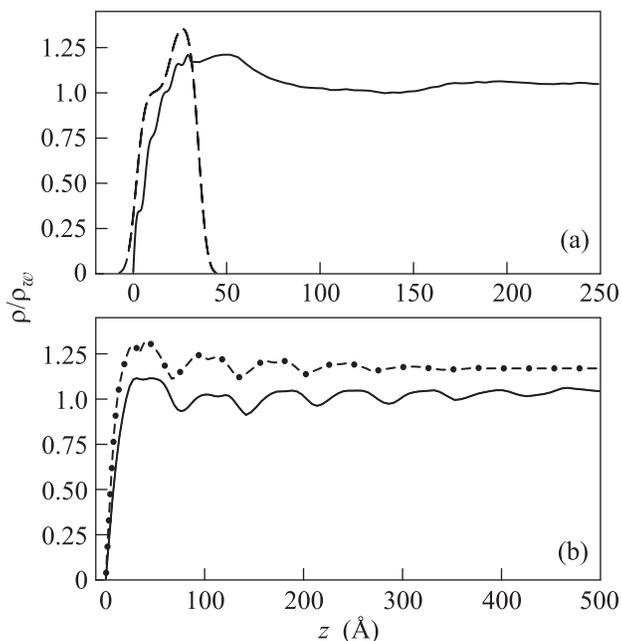


Рис. 3. Восстановленные профили распределений $\rho(z)$, нормированные на электронную концентрацию в воде при нормальных условиях, $\rho_w = 0.333 e^-/\text{Å}^3$. (a) – Сплошная линия – монослой DSPC на поверхности гидрозоля ~ 5 -нанометровых частиц, штриховая линия – модельное распределение электронной концентрации для монослая DSPC [4]. (b) – Сплошная линия – мультислой DSPC на гидрозольной подложке с $\text{pH} \approx 10$, штрихпунктир – мультислой того же липида на подложке с $\text{pH} \approx 11$

Непосредственно к монослою примыкает слой с повышенной плотностью $\rho \approx 1.2\rho_w$ толщиной $\approx 50 \text{ Å}$, а следом идет слой толщиной $\sim 80 \text{ Å}$ с электронной концентрацией $\approx \rho_w$. Мы связываем формирование двух последних слоев с явлением конденсации наночастиц кремнезема на границе монослоя, образованной гидрофильными группами [11].

Профиль мультислоя DSPC на поверхности гидрозоля с $\text{pH} \approx 10$ (сплошная линия на рис. 3b) представляет собой 6-слойную структуру (полная толщина $\sim 450 \text{ Å}$) с периодом между “точками разрыва” $72 \pm 2 \text{ Å}$, что соответствует удвоенному значению длины молекулы DSPC. Предполагая, что каждый из наблюдаемых слоев эквивалентен молекулярному бислою, получаем расчетное значение $A = 39 \pm 1 \text{ Å}^2$. В то же время по экспериментальным данным скользкой дифракции $A = 41.6 \pm 0.7 \text{ Å}^2$ [4]. Таким образом, согласно (5) избыточное число электронов на молекулу липида составляет 32 ± 9 , что соответствует ~ 3 молекулам H_2O и/или ионам Na^+ . Толщина мультислоя DSPC на подложке с $\text{pH} \approx 11$ за-

метно меньше ($\sim 300 \text{ Å}$; штрихпунктирная линия на рис. 3b). Он представляет собой 4-слойную структуру с периодом между “точками разрыва” $68.1 \pm 0.9 \text{ Å}$ и расчетным значением $A = 34 \pm 2 \text{ Å}^2$. Таким образом, “избыток” электронов на одну молекулу липида составляет 86 ± 2 , что соответствует ~ 9 молекулам H_2O и/или ионам Na^+ .

На рис. 4а показан профиль электронной концентрации для тонкой пленки липида DSPC на гидро-

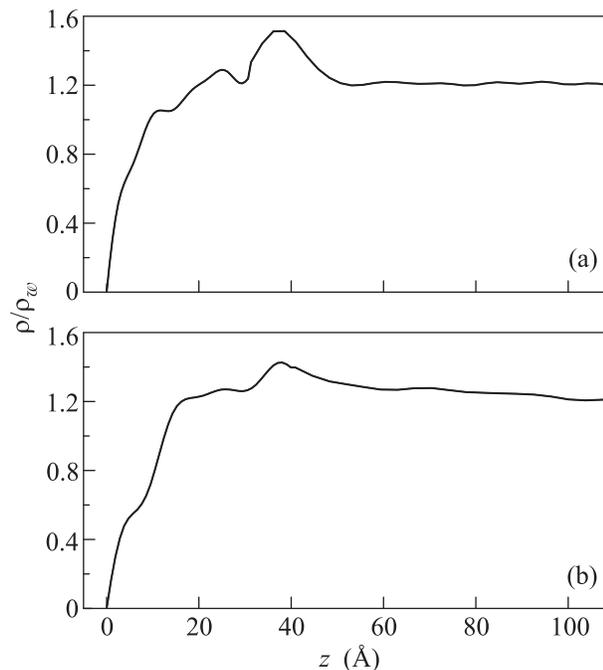


Рис. 4. Восстановленные профили распределений $\rho(z)$, нормированные на электронную концентрацию в воде при нормальных условиях, $\rho_w = 0.333 e^-/\text{Å}^3$, для мембраны из DSPC (a) и SOPC (b) на подложке с $\text{pH} \approx 11.5$

золе, сильно обогащенном NaOH (~ 0.5 моль/л, $\text{pH} \approx 11.5$). Одна из “точек разрыва” в нем расположена на глубине 30.6 Å . Предполагая, что положение этой особой точки соответствует границе раздела между внешним и внутренним монослоями, получаем $A = 45 \pm 2 \text{ Å}^2$.

К этой границе прилегает более плотный слой толщиной $\sim 20 \text{ Å}$. С одной стороны, его толщина немного меньше, а интегральная плотность близка к значению интегральной плотности монослоя DSPC. С другой стороны, толщина этого слоя более чем в два раза меньше характерного диаметра частиц в объеме исходного золя ($\approx 5 \text{ нм}$). Если этот слой образован коллоидными частицами, то необходимо предположить, что с увеличением концентрации натрия в растворе их радиус существенно уменьшается. Однако при высокой концентрации Na^+ экспериментально

Таблица 1. Параметры структур на поверхности золя 5-нанометровых частиц SiO₂, стабилизированного NaOH^{*)}

Структура	Фосфолипид	pH	$L, \text{Å}$	$A, \text{Å}^2$
Монослой	DSPC	10	36 ± 2	44 ± 2
Бислой в мультислой	DSPC	10	72 ± 2	41.6 ± 0.7
Бислой в мультислой	DSPC	11	68 ± 1	41.6 ± 0.7
Бислой	DSPC	11.5	60 ± 2	45 ± 2
Бислой	SOPC	11.5	60 ± 2	49 ± 3

^{*)} L – толщина слоя; A – площадь поверхности, приходящаяся на одну молекулу липида.

наблюдается обратный процесс – коагуляция частиц, проявляющаяся, например, в помутнении раствора [7]. Это позволяет интерпретировать данное распределение как профиль липидного бислоя на поверхности гидрозоль.

Для пленки липида SOPC на подложке с pH ≈ 11.5 толщина уплотненной области превышает 60 Å (рис. 4b). При этом $\rho(z)$ плавно спадает по глубине, выраженной границы раздела между пленкой и подложкой не наблюдается. Также не обнаружено отчетливого расслоения наночастиц кремнезоля в приповерхностной области. Отметим, что на глубине до 57 Å интегральная плотность всей наблюдаемой структуры более чем в два раза превосходит теоретическое значение для монослоя этого липида. Предположив количество SOPC в пленке равным двум (трем) монослоям, то получим $A = 49 \pm 3 \text{ Å}^2$ ($65 \pm 3 \text{ Å}^2$). Только второе значение находится в согласии с оценкой величины A для бислойных стенок везикул SOPC в водных суспензиях [12].

Профили электронной концентрации для пленок DSPC и SOPC на рис. 4 имеют очень схожую структуру. Вместе с тем фосфолипиды DSPC и SOPC имеют различные температуры фазового перехода T_c , связанного с плавлением углеводородных цепей (*chain-melting transition*) [2]. Для первого фосфолипида $T_c \approx 55 \text{ °C}$, что объясняет формирование макроскопически плоской кристаллической мембраны ($A = 45 \pm 2 \text{ Å}^2$). Для SOPC $T_c \approx 6 \text{ °C}$, и при этом параметр A на $\sim 10\%$ больше, чем у DSPC. Таким образом, при комнатной температуре мембрана SOPC, возможно, находится в жидком агрегатном состоянии.

Отметим, что для последних двух систем интервал z , в котором поверхностная электронная концентрация отличается от объемной, $\rho_b \approx 1.2\rho_w$, шире толщины бислоя ($\sim 60 \text{ Å}$) на $50\text{--}60 \text{ Å}$. Возможно, образование этой переходной области связано с конденсацией наночастиц кремнезоля на границе липидной мембраны [11].

Ранее показано, что на границе воздух–кремнезоль существует чрезвычайно широкий переходный слой (электрический двойной слой), возникающий благодаря разнице в потенциалах сил электрического изображения для катионов Na⁺ и отрицательно заряженных наночастиц кремнезоля (макроионов) [13]. Его ширина определяется дебаевской длиной экранирования Λ_D в объеме раствора [1]. Добавление в состав золя гидроксида натрия приводит к смещению в нем химического равновесия, сопровождающемуся ростом значения pH раствора, или объемной концентрации c^- ионов OH⁻. Поскольку $\Lambda_D \propto 1/\sqrt{c^-}$, увеличение pH приводит к сужению поверхностного двойного слоя [14].

Совокупность полученных нами данных свидетельствует о том, что полная толщина адсорбированного мультислоя DSPC $\sim \Lambda_D$ (см. табл. 1). Обогащение гидрозольной подложки NaOH приводит к уменьшению в несколько раз максимальной толщины адсорбированного липидного слоя в соответствии с уменьшением Λ_D . При pH ≈ 10 ($\Lambda_D \sim 300 \text{ Å}$) на поверхности гидрозольной подложки формируется самый толстый ($\sim 450 \text{ Å}$) мультислой из шести бислоев DSPC, при pH ≈ 11 ($\Lambda_D \sim 100 \text{ Å}$) мультислой толщиной $\sim 300 \text{ Å}$ состоит из четырех бислоев, а при pH ≈ 11.5 ($\Lambda_D \sim 50 \text{ Å}$) образуется один бислой. При этом ориентированная упаковка молекул внутри каждого бислоя соответствует двумерному кристаллу фосфолипида.

Таким образом, восстановленные с помощью модельного независимого подхода профили электронной концентрации демонстрируют, что толщина адсорбированной на поверхности гидрозольной пленки DSPC по порядку величины совпадает с дебаевской длиной экранирования в подложке. При объемной концентрации NaOH ~ 0.5 моль/л и pH ≈ 11.5 на поверхности гидрозольной подложки формируется макроскопически плоская фосфолипидная мембрана толщиной $\sim 60 \text{ Å}$ с величиной A , характерной для двумерного кристалла (гексагональная фаза P_{6v} , [2, 4]). В случае

SOPC A как минимум на $\sim 10\%$ больше, чем для бислоя DSPC. В этом случае возможно образование жидкой мембраны толщиной $\sim 60 \text{ \AA}$ (фаза L_α [2]).

Синхротрон NSLS использовался при поддержке Департамента энергетики США по контракту #DE-AC02-98CH10886. Станция X19C финансировалась из фондов ChemMatCARS, Университета Чикаго, Университета Иллинойса в Чикаго и Университета Стони Брук. Авторы благодарны компании Grace Davison за предоставление растворов коллоидного кремнезема Ludox. Работа частично поддержана РФФИ (грант # 15-32-20935).

-
1. A. W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, 3rd ed., John Wiley & Sons, N.Y. (1976).
 2. D. M. Small, *The Physical Chemistry of Lipids*, Plenum Press, N.Y. (1986).
 3. Д. А. Лось, *Десатуразы жирных кислот*, Научный мир, М. (2014).
 4. А. М. Тихонов, Письма в ЖЭТФ **92**, 394 (2010).
 5. I. V. Kozhevnikov, Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A **508**, 519 (2003).
 6. I. V. Kozhevnikov, L. Peverini, and E. Ziegler, Phys. Rev. B **85**, 125439 (2012).
 7. J. Depasse and A. Watillon, J. Coll. Int. Sci. **33**, 430 (1970).
 8. M. L. Schlossman, D. Synal, Y. Guan, M. Meron, G. Shea-McCarthy, Z. Huang, A. Acero, S. M. Williams, S. A. Rice, and P. J. Viccaro, Rev. Sci. Instrum. **68**, 4372 (1997).
 9. J. Nocedal and S. Wright, *Numerical Optimization*, 2nd ed., Springer (2006).
 10. B. L. Henke, E. M. Gullikson, and J. C. Davis, Atomic Data and Nuclear Data Tables **54**, 181 (1993).
 11. В. Е. Асадчиков, В. В. Волков, Ю. О. Волков, К. А. Дембо, И. В. Кожевников, Б. С. Роцин, Д. А. Фролов, А. М. Тихонов, Письма в ЖЭТФ **94**, 625 (2011).
 12. N. Kučerka, M.-P. Mieh, and J. Katsaras, Bio. Bio. Acta **1808**, 2761 (2011).
 13. А. М. Тихонов, J. Phys. Chem. C **111**, 930 (2007).
 14. А. М. Тихонов, J. Chem. Phys **124**, 164704 (2006).