

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ СИБИРСКОГО  
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

ГОЛЬШЕВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

**МАЛОУГЛОВЫЕ ДВИЖЕНИЯ МОЛЕКУЛ ПО ДАННЫМ  
ИМПУЛЬСНОГО ЭПР И ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ  
УПАКОВКИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ СРЕДАХ**

1.3.17 – Химическая физика, горение и взрыв,  
физика экстремальных состояний вещества

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель  
д.ф.-м.н. Дзюба Сергей Андреевич

Новосибирск - 2022

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	5
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	12
1.1. Некоторые типы молекулярных неупорядоченных сред .....	12
1.1.1. Биологические и модельные мембраны.....	12
1.1.2. Глобулярные и внутренне разупорядоченные белки .....	14
1.1.3. Глубоко-эвтектические растворители.....	15
1.2. Исследование молекулярной подвижности в неупорядоченных средах и ее связи с молекулярной упаковкой .....	17
1.2.1. Методы рассеяния нейтронов и мессбауэровского поглощения для исследования подвижности атомов .....	17
1.2.2. Динамический переход, наблюдаемый методами рассеяния нейтронов и мессбауэровского поглощения .....	20
1.2.3. Твердотельный ЯМР .....	23
1.2.4. Молекулярное моделирование.....	25
1.2.5. Комбинационное рассеяние света .....	26
1.3. ЭПР спиновых меток и зондов .....	28
1.3.1. Стационарный ЭПР спиновых зондов и меток.....	29
1.3.2. Малоугловые движения молекул в неупорядоченных средах – динамические и стохастические либрации.....	31
1.3.3. Детектируемые в стационарном ЭПР динамические либрации .....	31
1.3.4. Детектируемые в электронном спиновом эхо (ЭСЭ) стохастические либрации.....	35
1.3.5. Стохастические либрации в различных системах .....	38
1.3.6. Стимулированное эхо .....	42

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕТОДИКА .....	45
ГЛАВА 3. НЕКООПЕРАТИВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДВИЖЕНИЯ НА ТВЕРДЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ .....	48
3.1. Описание задачи.....	48
3.2. Образцы.....	49
3.3. Результаты .....	49
3.4. Обсуждение .....	56
3.5. Заключение к главе 3 .....	60
Глава 4. ЛИПИДНЫЕ БИСЛОИ DPPC И POPC В ГЕЛЕВОЙ ФАЗЕ .....	62
4.1. Описание задачи.....	62
4.2. Образцы.....	63
4.3. Результаты .....	64
4.4. Обсуждение .....	68
4.5. Заключение к главе 4 .....	72
Глава 5. ЛИПИДНЫЕ БИСЛОИ DOPC В ГЕЛЕВОЙ ФАЗЕ .....	74
5.1. Описание задачи.....	74
5.2. Образцы.....	75
5.3. Результаты .....	75
<b>5.4. Обсуждение</b> .....	79
5.5. Заключение к главе 5 .....	83
Глава 6. ГЛОБУЛЯРНЫЙ БЕЛОК ЛИЗОЦИМ [161; 162] И ВНУТРЕННЕ РАЗУПОРЯДОЧЕННЫЙ БЕЛОК КАЗЕИН .....	84
6.1. Описание задачи.....	84
6.2. Образцы .....	84
6.3. Результаты .....	86

6.4. Обсуждение .....	92
6.5. Заключение к главе 6 .....	98
<b>ГЛАВА 7. ПЕРЕОХЛАЖДЕННЫЕ ГЛУБОКО-ЭВТЕКТИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ.....</b>	<b>100</b>
7.1. Описание задачи.....	100
<b>7.2. Образцы .....</b>	<b>101</b>
<b>7.3. Результаты .....</b>	<b>101</b>
<b>7.4. Обсуждение .....</b>	<b>106</b>
<b>7.5. Заключение к главе 7.....</b>	<b>109</b>
<b>ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ .....</b>	<b>111</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>113</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>114</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Органические и биологические твердые тела, не обладающие кристаллической структурой, представляют интерес не только для практического использования, но и ввиду их необычных фундаментальных свойств. Такие материалы технологичны, прозрачны, обладают равномерными физическими свойствами. Исследование биологических объектов при низких температурах представляет интерес в связи с процессами криоконсервации, а также для исследования структурно-динамических свойств, которые связаны с функциональностью таких объектов и неизбежно проявляют себя и при более высоких температурах.

Исследование наноструктуры таких тел является важной фундаментальной задачей, так как структура, а именно надмолекулярная упаковка или упаковка больших молекул, определяет многие макросвойства объектов, такие как твердость, теплопроводность материала и другие. Также знание наноструктуры твердых тел важно для развития нанотехнологий, наномедицины, разработки лекарств и их доставки. Так, например, белки и пептиды могут связываться с металлами, ионами, полупроводниками, меняя свою структуру и позволяя различное свое применение в биотехнологии.

Наноструктуру твердых тел исследуют методами криоэлектронной микроскопии, рентгеновского рассеяния, рассеяния нейтронов, атомно-силовой микроскопии, молекулярного моделирования, ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и другими. Данные методы имеют свои ограничения: некоторые из них являются труднодоступными и дорогими, другие требуют особой пробоподготовки, что вносит свои ограничения на исследуемые объекты, метод молекулярного моделирования требует экспериментального подтверждения. Данные методы дополняют друг друга, позволяют собрать более полную информацию о системе.

Метод импульсного ЭПР в варианте электронного спинового эха (ЭСЭ) спиновых зондов и меток чувствителен к стохастическим ориентационным движениям, так называемым стохастическим либрациям, в наносекундном диапазоне времен корреляции. Данный метод позволяет изучать стохастические ориентационные движения парамагнитной молекулы, как целой (в случае жесткой структуры), или большого фрагмента молекулы. В твердых телах движения нитроксильных спиновых меток и зондов ограничено. Данный метод чувствителен только к стохастическим движениям, гармонические осцилляции вклад в метод ЭСЭ не дают.

Изначально данный метод активно применялся для исследования молекулярной подвижности при низких температурах. Однако недавно было обнаружено, что наблюдение стохастических либраций методом ЭСЭ позволяет исследование структуры матрицы. Так, например, путем сравнения температурных зависимостей скоростей анизотропной релаксации можно делать вывод о более или менее плотной надмолекулярной упаковке исследуемого объекта. В ряде работ по ионным жидкостям методом импульсного ЭПР была показана перестройка матрицы с температурой. Таким образом, метод импульсного ЭПР полезен не только для исследования стохастических движений, но также для исследования надмолекулярной упаковки и структурных перестроек.

### **Степень разработанности темы исследования**

Ранее было показано, что метод импульсного ЭПР спиновых зондов в двухимпульсном варианте чувствителен к наносекундным ориентационным стохастическим либрациям. Установлено, что модель стохастических либраций хорошо соответствует эксперименту. Этот тип движений обнаружен в ряде систем – молекулярных стеклах, белках и модельных мембранах, обнаружено влияние на него криопротекторов и холестерина.

При этом ряд важных особенностей этих движений остался однако невыясненным – не определена с достаточной точностью температура их появления, не изучена подробно их температурная зависимость, не установлена

связь движений с молекулярной упаковкой в исследуемых системах, не обсуждалась роль эффектов кооперативности.

### **Цели и задачи работы**

**Цель работы** - получение температурной зависимости наблюдаемых в ЭСЭ стохастических либраций для различных молекулярных стекол и биологических объектов, определение параметров движения, выяснение возможностей получения информации о надмолекулярной упаковке исследуемых объектов.

### **Задачи**

1. Анализ стохастических либраций молекул на поверхности с целью исключения кооперативного вклада в эти движения.
2. Исследование стохастических либраций методом ЭСЭ в различных модельных мембранах с использованием спиновых зондов различных размеров и различной локализации в мембране.
3. Получение температурной зависимости для низкотемпературных стохастических движений и установление ее взаимосвязи с особенностями надмолекулярной упаковки методом ЭСЭ.
4. Получение температурной зависимости для динамических и стохастических либраций внутренне разупорядоченного белка казеина и глобулярного белка лизоцима.
5. Выяснение возможности выявления микроструктуры глубоко-эвтектических растворителей с помощью детектирования в них методами стационарного и импульсного ЭПР малоугловых движений.

### **Научная новизна результатов**

В данной работе впервые методом импульсного ЭПР спиновых зондов и меток исследована подробная температурная зависимость стохастических либраций молекул в молекулярных разупорядоченных средах разных типов – молекулярных стеклах, липидных бислоях разного состава, глобулярных и внутренне разупорядоченных белках, стеклующихся глубоко-эвтектических растворителях. Для биологических систем установлено, что рост движения возникают при двух температурах: либо при 100 К, либо при 130 К. Исследования

некооперативных движений молекул, адсорбированных на твердых поверхностях позволило связать эти две температуры с появлением торсионных и изгибных движений соответственно. Впервые обнаружена переупаковка модельной мембраны DOPC и внутренне разупорядоченного белка казеина при низких температурах. Методом стационарного ЭПР обнаружено разделение фаз на микроуровне при низких температурах в глубоко-эвтектических растворителях.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные результаты позволяют лучше понять механизмы малоугловых ориентационных движений – типа движений, внутренне присущим неупорядоченным средам. Выясненные закономерности проявления этих движений и их температурных зависимостей показывают их связь с особенностями наноструктурной молекулярной упаковки этих веществ. Результаты работы также показывают возможность использования разработанных подходов к изучению разупорядоченных сред самых разных типов – липидные бислои, глобулярные и внутренне разупорядоченные белки, глубоко-эвтектические растворители.

### **Методология и методы исследования**

Основным методом исследования в данной работе был выбран метод импульсного ЭПР спиновых зондов и меток в X-диапазоне частот. Исследование ориентационных стохастических наносекундных и микросекундных движений проводилось по методике представленной в литературе. В качестве основного варианта метода использовалась двухимпульсная последовательность для изучения стохастических наносекундных движений. Также использовался трехимпульсный метод в двух различных вариантах для исследования микросекундных движений биологических объектов и ориентационных движений молекул воды в гидратной оболочке. Для определения локализации спиновой метки или зонда использовался стационарный вариант ЭПР. Также стационарный метод ЭПР был использован для получения температурной зависимости среднеквадратичного углового отклонения. Для объяснения насыщения температурной зависимости скорости анизотропной релаксации было проведено



моделирование в рамках ранее предложенной модели либраций путем случайных прыжков между двумя ориентациями.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Наблюдаемое в ЭСЭ возникновение стохастических либраций молекул происходит при температурах либо вблизи 100 К, либо вблизи 130 К, что может быть связано с торсионными и изгибными колебаниями, соответственно.
2. Стохастические либрации, наблюдаемые в ЭСЭ выше 160 К в биологических системах имеют кооперативный характер, то есть происходят с участием нанокластера молекул окружения.
3. Метод ЭСЭ позволяет делать выводы о жесткости молекулярной упаковки в биологических и неупорядоченных средах.
4. С помощью метода ЭСЭ возможно наблюдение в биологических и неупорядоченных средах молекулярных переупаковок в наноструктуре вещества.
5. Внутренне разупорядоченный белок может совершать переходы порядок-беспорядок в ходе процессов замораживания-размораживания.

### **Достоверность работы**

Достоверность выводов и результатов работы обеспечена комплексным подходом к экспериментальным исследованиям и их интерпретации с использованием современного экспериментального оборудования, воспроизводимостью экспериментальных результатов, достигнутым соответствием эксперимента и теории. Полученные результаты не противоречат уже имеющимся в литературе данным.

### **Личный вклад соискателя**

Представленные в диссертации результаты получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автор принимал активное участие в разработке плана исследований, обсуждении результатов и написании публикаций по теме диссертационной работы.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации были представлены на следующих международных и российских научных конференциях: Modern Development of Magnetic Resonance 2015, (Kazan, Russia); Asia-Pacific EPR/ESR Symposium APES-2016, (Listvyanka, Irkutsk, Russia); IX International Voevodsky Conference 2017, (Akademgorodok, Novosibirsk, Russia); The 8<sup>th</sup> Conference on Nitroxide Radicals, Spin-2017, (Padova, Italy); III International Conference SPIN PHYSICS, SPIN CHEMISTRY AND SPIN TECHNOLOGY, SPCT-2018, (Novosibirsk, Russia); Asia-Pacific EPR/ESR Symposium APES-2018, (Brisbane, Australia); XIth EFEP 2019 Conference, (Bratislava, Slovakia); VI Съезд биофизиков России, (Сочи, Россия).

### Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:

1. **Golysheva E. A.**, Shevelev G. Y., Dzuba S. A. Dynamical transition in molecular glasses and proteins observed by spin relaxation of nitroxide spin probes and labels //The Journal of chemical physics. – 2017. – Т. 147. – №. 6. – С. 064501. DOI: 10.1063/1.4997035.

2. **Golysheva E. A.**, De Zotti M., Toniolo C., Formaggio F., & Dzuba S. A. Low-temperature dynamical transition in lipid bilayers detected by spin-label ESE spectroscopy //Applied Magnetic Resonance. – 2018. – Т. 49. – №. 12. – С. 1369-1383. DOI: 10.1007/s00723-018-1066-2.

3. **Golysheva E. A.**, Samoilova R. I., De Zotti M., Toniolo C., Formaggio F., & Dzuba S. A. Electron spin echo detection of stochastic molecular librations: Non-cooperative motions on solid surface //Journal of Magnetic Resonance. – 2019. – Т. 309. – С. 106621. DOI: 10.1016/j.jmr.2019.106621.

4. **Golysheva E. A.**, Dzuba S. A. Lipid chain mobility and packing in DOPC bilayers at cryogenic temperatures //Chemistry and physics of lipids. – 2020. – Т. 226. – С. 104817. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104817.

5. **Golysheva E. A.**, Samoilova R. I., De Zotti M., Formaggio F., Gobbo M., & Dzuba S. A. ESE-detected molecular motions of spin-labeled molecules on a solid

inorganic surface: Motional models and onset temperatures //Applied Magnetic Resonance. – 2020. – Т. 51. – №. 9. – С. 1019-1029. DOI: 10.1007/s00723-020-01212-2.

6. Maslennikova N. A., **Golysheva E. A.**, Dzuba S. A. Evidence for an Ordering Transition near 120 K in an Intrinsically Disordered Protein, Casein //Molecules. – 2021. – Т. 26. – №. 19. – С. 5971. DOI: 10.3390/molecules26195971.

7. **Golysheva E. A.**, Dzuba S. A. Low-temperature molecular motions in a deep eutectic solvent choline chloride/urea studied by spin-probe EPR //Russian Chemical Bulletin. – 2021. – Т. 70. – №. 12. – С. 2366-2369. DOI: 10.1007/s11172-021-3354-5.

8. **Golysheva E. A.**, Maslennikova N. A., Baranov D. S., & Dzuba S. A. Structural properties of supercooled deep eutectic solvents: Choline chloride–thiourea compared to reline //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2022. – Т. 24. – №. 10. – С. 5974-5981. DOI: 10.1039/D1CP05162H.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения, списка сокращений и списка литературы, состоящего из 189 наименований. Работа изложена на 133 страницах и содержит 42 рисунка.

**Соответствие специальности 1.3.17 – химическая физика, физика горения и взрыва, физика экстремальных состояний вещества**

Диссертационная работа соответствует п. 1 «Атомно-молекулярная структура химических частиц и веществ», п. 2 «структура и свойства кристаллов, аморфных тел, жидкостей; поведение веществ и структурно-фазовые переходы в экстремальных условиях – в электрических и магнитных полях, в условиях статического и динамического сжатия, в полях лазерного излучения, в плазме и в гравитационных полях, при сверхнизких температурах и в других условиях.», п. 3 «Молекулярная динамика, межмолекулярные потенциалы и молекулярная организация веществ» паспорта специальностей 1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

## **Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**

### **1.1. Некоторые типы молекулярных неупорядоченных сред**

Неупорядоченными средами называется широкий класс твердых веществ, в структуре которых отсутствует кристаллический порядок, а также высоковязкие жидкости. К ним относятся простые молекулярные стекла – застеклованные жидкости, органические аморфные вещества, неорганические стекла, полимеры, аморфные металлы и другие. Биологические системы также обладают многими свойствами неупорядоченных сред. В настоящей работе изучаются лишь некоторые типы молекулярных неупорядоченных сред – биологические модельные мембраны, внутренне разупорядоченные белки и застеклованные глубоко-эвтектические растворители.

#### **1.1.1. Биологические и модельные мембраны**

Клеточная мембрана - барьер, отделяющий содержимое клетки от окружающей среды [1]. Мембрана сформирована липидами, в ее состав входят мембранные белки, сахара и другие биомолекулы [2]. Белки обеспечивают доставку веществ через мембрану и ее структурную целостность. Сахара в основном выступают в роли маркеров клетки. Липиды в биологической мембране подразделяют на три типа: фосфолипиды, гликолипиды, стерины. Наиболее известный представитель стеринов – холестерин, в мембранах млекопитающих может достигать 50% от всех липидов [3]. Фосфолипиды состоят из двух цепей жирных кислот, связанных с глицерином и фосфатной группой. Гликолипиды отличаются в первую очередь наличием сахара там, где у фосфолипидов наблюдается фосфатная группа [2]. Фосфолипиды существенно определяют структуру, текучесть и проницаемость мембраны [4]. Среди фосфолипидов

широко распространен фосфатидилхолин (PC). У фосфатидил холина молекула холина присоединена к фосфатной группе [2].

Структура мембраны сформирована двумя липидными бислоями, что обусловлено амфифильными свойствами самих липидов. Толщина такого бислоя порядка 5 нм [4; 5]. Липиды содержат гидрофильную (полярную) и гидрофобную части. Толщина полярной области в мембране порядка 1 нм. Гидрофобные взаимодействия ведут к параллельному и преимущественно антипланарному выстраиванию углеводородных цепей [4]. В водной среде происходит самоорганизация липидов в липосомы [6]. Входящие в состав липидов ацильные остатки жирных кислот могут содержать ненасыщенные связи. Наличие таких связей ведет к цис-конфигурации ацильного хвоста и увеличивает степень беспорядка в мембране. Было показано, что связывание с мембраной некоторых ферментов определяется наличием ненасыщенных связей [7].

Липидный бислой может находиться в двух основных фазовых состояниях – гелевом и жидко-кристаллическом. Температура перехода от гелевой к жидко-кристаллической фазе (температура плавления) зависит от типа составляющих мембрану липидов. Так, например, температура плавления для мембран состоящих из фосфолипидов POPC с одной ненасыщенной связью в ацильном хвосте равна  $-5^{\circ}\text{C}$ , а из насыщенных фосфолипидов DPPC равна  $41^{\circ}\text{C}$  [7].

Исследование мембран важно для понимания общих закономерностей функционирования клетки и передачи сигналов между клетками, разработки способов доставки лекарств на основе везикул или для создания биосенсоров на основе мембран, изучения механизмов действия мембрано-активных антибактериальных препаратов и т.д. [1]. Также изучение свойств мембран позволит понять, почему некоторые ткани чувствительны к заморозке, и поможет разработать протоколы заморозки для них. Зачастую криоконсервация проводится при температуре жидкого азота ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) или при температуре его паров ( $-135^{\circ}\text{C}$ ) [8].

Биологическая мембрана содержит в себе сотни компонентов, однако для выяснения некоторых общих экспериментальных и теоретических закономерностей возможно исследование модельных мембран, состоящих из трех или, максимум, четырех компонентов [9].

Клеточная мембрана выполняет множество функций, связанных с ее структурными и динамическими свойствами [10]. Изначально структурные свойства мембраны изучались методами ЯМР, рассеяния нейтронов, рентгеновского рассеяния [4]. Позднее стал активно использоваться метод молекулярного моделирования [6].

### **1.1.2. Глобулярные и внутренне разупорядоченные белки**

По типу третичной структуры белки делят на три класса: фибриллярные, мембранные и глобулярные. Структура глобулярных белков обусловлена взаимодействием полипептидной цепи с самой собой, причем важную роль играют гидрофобные взаимодействия аминокислотных остатков далеких друг от друга в аминокислотной последовательности, но сблизившихся в третичной структуре. Поверхность таких белков в основном образована гидрофильными аминокислотными остатками. Глобулярные белки наиболее хорошо изучены, так как ввиду их водорастворимости с ними легко работать: легче выделять, исследовать их структуру в кристаллах рентгеном [11] и в растворах – методом ЯМР [12].

Еще 70 лет назад считалось, что функции белков строго определяются их трехмерными третичными структурами. Однако было обнаружено, что белки способны менять свою конфигурацию при взаимодействии с другими молекулами [13]. Кроме того был обнаружен целый класс белков, не имеющих стабильной третичной структуры. Оказалось, что более 30% эукариотических белков имеют разупорядоченные области длиной более 30 аминокислотных остатков [14]. Такие

белки также биологически активны. Эти белки называются внутренне разупорядоченными белками [15–21].

Внутренне разупорядоченные белки выполняют различные функции, такие как передача сигналов и хранение небольших молекул. Внутренне разупорядоченные белки распознают белки, нуклеиновые кислоты и другие типы связывающих молекул и ускоряют взаимодействия и биохимические реакции между связанными партнерами; биологическая активность внутренне разупорядоченных белков дополняет активность структурированных белков. Характеристика внутренне разупорядоченных белков и внутренне неупорядоченных областей в белках может быть выполнена различными спектроскопическими методами: ядерный магнитный резонанс (ЯМР), малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, флуоресценция одиночных молекул, масс-спектрометрия [22]. Среди прочего, спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) также оказалась ценным инструментом для изучения функциональных свойств внутренне разупорядоченных белков [23; 24].

Интригующим свойством многих внутренне разупорядоченных белков является их способность претерпевать переходы от беспорядка к порядку при связывании с мишенью, когда определенный распознающий участок белка адаптирует вторичные или третичные структурные элементы при взаимодействии с партнером по связыванию [15–22]. Такие переходы способствуют функционированию белка, облегчая процесс связывания и ускоряя биохимические реакции.

### **1.1.3. Глубоко-эвтектические растворители**

Глубоко-эвтектические растворители (ГЭР) представляют собой эвтектические смеси акцепторов и доноров водородных связей [25–27]. Отдельные компоненты ГЭР вовлечены в сильно разветвленную сеть водородных связей, поэтому их взаимодействие приводит к значительному понижению

температуры замерзания. Обнаруженные в начале этого века [28] ГЭР вызвали значительный интерес благодаря их потенциальному использованию в ряде различных технологических областей, таких как катализ, извлечение металлов, фармацевтика, процессы зеленой химии и во многих других [25–27].

Благодаря ионному характеру своего состава ГЭР можно рассматривать как разновидность ионных жидкостей (ИЖ). ИЖ представляют собой соли с низкой температурой плавления, которые образуют жидкости при температурах ниже точки кипения воды [29–31]. ИЖ образуются за счет ионных связей между ионными компонентами. Для ИЖ необходимо выполнение особых условий их синтеза и очистки, также ИЖ могут быть достаточно дорогими и токсичными. Напротив, ГЭР дешевы, могут быть легко получены из широкодоступных материалов и могут относиться к продуктам и материалам зеленой химии и/или участвовать в ней.

Чтобы обеспечить пути для расширения применения ГЭР, безусловно, желательно выяснить их взаимодействие на молекулярном уровне, структурную организацию и взаимосвязь структур и свойств. Однако фундаментальные исследования, выполненные в этом направлении, ограничены несколькими экспериментальными и вычислительными методами [27; 32; 33]; общепризнанно, что на данный момент отсутствует понимание их структурных и динамических свойств на молекулярном уровне. С помощью рентгеноструктурного анализа, нейтронного рассеяния, колебательной спектроскопии, молекулярно-динамического моделирования была обнаружена и интенсивно исследована наноскопическая гетерогенная среда в ГЭР [33; 34].

При замораживании многие ГЭР могут переохладиться и даже переходить в аморфное состояние [35; 36]. Кроме того, известно, что жидкие ГЭР обладают характерными для стекловидной жидкости динамическими свойствами, такими как затянута экспоненциальная релаксация водородных связей [37], гетерогенная ориентационная релаксация и отсутствие связи между вращательными и поступательными движениями (трансляционная – вращательная развязка) [33]. Таким образом, можно предположить, что структурная организация ГЭР в



жидком и переохлажденном состояниях может иметь некоторые общие черты, а особенности молекулярной упаковки, обнаруживаемые при пониженных температурах в стеклообразном состоянии, связаны с таковыми при температурах их технологического применения. Это обстоятельство расширяет круг экспериментальных методик, которые могут дать полезную информацию на молекулярном уровне.

## **1.2. Исследование молекулярной подвижности в неупорядоченных средах и ее связи с молекулярной упаковкой**

### **1.2.1. Методы рассеяния нейтронов и мессбауэровского поглощения для исследования подвижности атомов**

Динамические свойства молекул в биологических системах являются сейчас объектом интенсивных исследований. Одним из методов исследования подвижности в молекулярных системах является метод рассеяния нейтронов [38–40]. В данном эксперименте нейтроны взаимодействуют с ядрами атомов в молекулах посредством сильного ядерного взаимодействия, в результате которого меняется волновой вектор нейтрона [41]. Данное взаимодействие короткодействующее ( $10^{-13}$  см). Анализ рассеянного пучка нейтронов позволяет получить информацию о структуре и динамике молекул в образце. При этом рассеянный пучок описывают как функцию изменения импульса и энергии. Рассеянные нейтроны записываются как функция угла рассеяния, однако детектор может лишь зафиксировать наличие нейтрона за счет реакции последнего с одним из ядер детектора, но не позволяет анализ энергии частицы. Измерение энергии частицы происходит до того, как она будет засчитана детектором либо путем измерения длины волны (Брэгговское отражение от кристалла), либо путем измерения скорости (во время-пролетной методике) [42]. Вероятность рассеяния нейтрона в единичный телесный угол выражают через дифференциальное сечение рассеяния:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{I'}{I} = b^2, \quad (1.1)$$

где  $I'$  – среднее число нейтронов, рассеянных в единицу времени в единицу телесного угла,  $I$  – падающий поток в единицу площади, а  $b$  – длина рассеяния (эффективный линейный размер рассеивателя). При этом информацию о динамике образца получают путем измерения динамического структурного фактора  $S(Q, \omega)$ , который дает вероятность рассеяния нейтрона с передачей энергии  $E = \hbar\omega$  и импульса  $p = \hbar Q$  ( $Q$  - волновой вектор):

$$\frac{\partial^2 \sigma}{\partial \Omega \partial \omega} = N \frac{k'}{k} b^2 S(Q, \omega), \quad (1.2)$$

здесь  $N$  – число идентичных атомов системы, отношение  $\frac{k'}{k}$  – коэффициент обеспечивающий равенство падающего и рассеянного потоков.

Длина, на которой рассеивается нейтрон, варьируется, поскольку относительная ориентация спинов нейтрона и ядра случайна. Таким образом, длина рассеяния на конкретном сайте имеет среднее значение и отклонение от среднего. Среднее сечение рассеяния находят как результат когерентного рассеяния, а флуктуации относят к некогерентному рассеянию, которое позволяет получить информацию о движении отдельных атомов. Некогерентное сечение рассеяния атома водорода  $^1\text{H}$  ( $b_{inc}^2$ ) в 20 раз больше, чем у других элементов [41]. Следовательно, при исследовании методом нейтронного рассеяния речь идет о наблюдении за динамикой атомов водорода. Это обстоятельство в силу очевидных причин, оказывается удобным при исследовании биологических систем. Измеряемый в нейтронном рассеянии сигнал отражает среднеквадратичное смещение атомов водорода, которое изучается как функция температуры. Кроме того, такая выборочная чувствительность метода позволяет исследовать отдельные части системы путем замены водорода в не интересующих областях на дейтерий. Например, для получения информации о динамике непосредственно самого белка в гидратированном состоянии для гидратации используют дейтерную воду ( $\text{D}_2\text{O}$ ) [43].

Также для исследования динамики молекул используют метод мессбауэровской спектроскопии. Данный метод основан на испускании  $\gamma$ -квантов при резонансных переходах из возбужденного в невозбужденное состояние ядра. В мессбауэровской спектроскопии используется семь изотопов ( $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{119}\text{Sn}$ ,  $^{121}\text{Sb}$ ,  $^{125}\text{Te}$ ,  $^{129}\text{I}$ ,  $^{151}\text{Eu}$ ,  $^{147}\text{Au}$ ). В биологических системах из перечисленных элементов присутствуют только атомы (ионы) железа [44–46]. Наблюдаемый в мессбауэровской спектроскопии сигнал в этих системах отражает среднеквадратичное смещение атома железа, которое изучается как функция температуры – по аналогии с рассеянием нейтронов.

Оба вышеупомянутых метода позволяют получить информацию о среднеквадратичном отклонении атомов (водорода или железа соответственно) от положения равновесия, возникающем вследствие их движения. Вероятность процессов, при которых происходят излучение и рассеяние, меняется с температурой. Выразить уменьшение интенсивности рассеяния, вызванное тепловым движением атомов, позволяет фактор Дебая-Уоллера ( $W$ ) [47; 48]:

$$I = I_0 \exp(-W), \quad (1.3)$$

где  $I_0$  соответствует интенсивности рассеяния на жесткой решетке, а экспонента представляется следующим образом:

$$\exp(-W) = \overline{|\langle \Phi_i | \exp(\bar{u}_n^2 Q^2) | \Phi_i^* \rangle|^2} \quad (1.4)$$

здесь  $\Phi_i$  – волновая функция, описывающая фононное состояние,  $Q$  – переданный импульс,  $u_n$  – смещение атома  $n$  относительно положения равновесия. В выражении (1.4) черта сверху означает усреднение по фононным состояниям при данной температуре.

При малых отклонениях  $u_n$  от положения равновесия возможно дальнейшее упрощение формулы (1.4), тогда можно представить фактор Дебая-Уоллера, через среднеквадратичные смещения  $\bar{u}_n^2$  атомов:

$$W \propto \bar{u}_n^2 Q^2, \quad (1.5)$$

При исследовании температурной зависимости среднеквадратичного отклонения атомов для неупорядоченных сред методами рассеяния нейтронов и мессбауэровского поглощения было обнаружено явление динамического перехода, связанное с резким увеличением подвижности атомов выше некоторой температуры (подробнее написано ниже, п. 1.2.2). Также методом рассеяния нейтронов была исследована связь между подвижностью атомов и молекулярной упаковкой. Так при температуре выше 250 К внутренне разупорядоченный белок тау демонстрирует большую подвижность в сравнении глобулярным белком связывающимся с мальтозой [49]. Также внутренне разупорядоченные белки казеина оказались более гибкими и подвижными, чем глобулярные белки лизоцима, миоглобина и конкавалина А при комнатной температуре [50]. С другой стороны температурные зависимости среднеквадратичного отклонения для денатурированного и нативного лизоцима совпадают [51].

### **1.2.2. Динамический переход, наблюдаемый методами рассеяния нейтронов и мессбауэровского поглощения**

Методами нейтронного рассеяния и мессбауэровского поглощения при исследовании стеклообразных сред и биологических объектов выше некоторой температуры был обнаружен резкий рост температурной зависимости среднеквадратичного отклонения (пример на рис. 1.1). Ниже данной температуры температурная зависимость была линейной, как и для кристаллических тел, что указывает на гармонические колебания атомов. Резкий же рост очевидно можно связать либо с ангармоничностью движения, либо с диффузионным (стохастическим) его характером. Изначально такое поведение связывали со стеклованием, однако в 1989 г. было предложено название «динамический переход» [46], а температуру, при которой оно проявляется, соответственно, температурой динамического перехода ( $T_d$ )

Явление динамического перехода наблюдали в такой стеклующейся среде как водно-глицериновая жидкость – методами мессбауэровского поглощения [52]

и рассеяния нейтронов [53]. Также методом нейтронного рассеяния был исследован динамический переход в орто-терфениле [54–56] и в декалине [57].

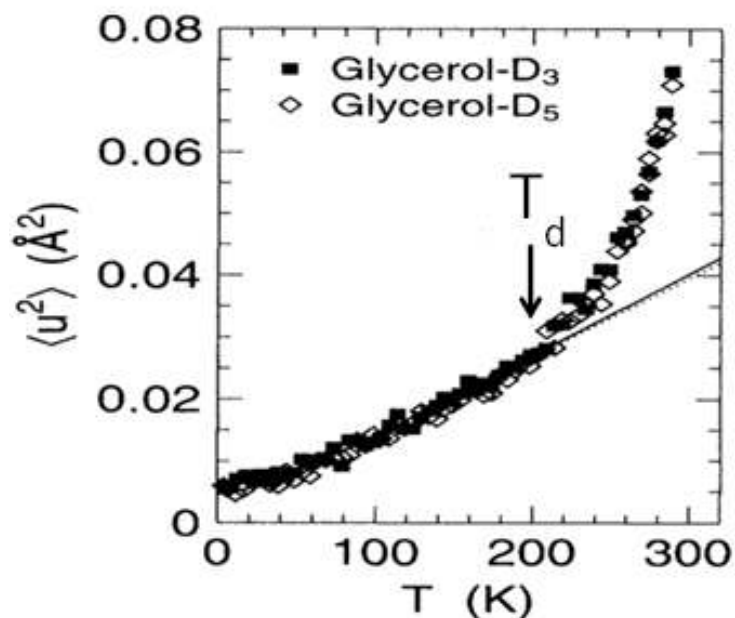


Рисунок 1.1. Температурная зависимость среднеквадратичного отклонения, полученная методом рассеяния нейтронов на спектрометре IN13 для двух изотопов глицерина: глицерин-D<sub>3</sub> и глицерин-D<sub>5</sub> [53].

Динамический переход методом рассеяния нейтронов был обнаружен при исследовании различных биологических объектов: белков [58–62], ДНК и РНК [63], биологических мембран [64–66]. Дело в том, что любые биологические объекты обладают обычно свойствами как упорядоченных, так и неупорядоченных сред: например, первичная структура белков имеет строгий порядок, вторичная же и третичная структуры уже демонстрируют некоторую степень беспорядка.

При исследовании биологических систем методом нейтронного рассеяния было обнаружено, что температурная зависимость среднеквадратичного отклонения для многих из них демонстрирует не один, а два резких роста (рис. 1.2): в температурном диапазоне 100-150К и 180-230К. При этом в литературе принято называть динамическим переходом эффект, наблюдаемый при 180-240К, рост же вблизи 100 К связывается обычно с размораживанием вращения метильных групп.

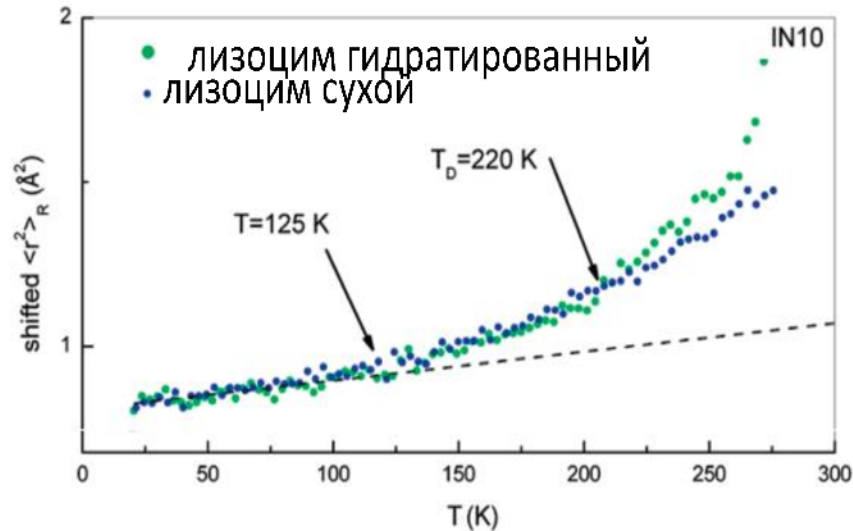


Рисунок 1.2. Температурная зависимость среднеквадратичного отклонения, полученная методом рассеяния нейтронов на спектрометре IN10 для сухого и гидратированного лизоцима [61].

Также динамический переход был исследован и другими методами: диэлектрической спектроскопии [67; 68], компьютерного моделирования [69; 70], Рамановской спектроскопии [71–73] и методом электронного парамагнитного резонанса [74; 75].

В многих работах исследовалось влияние степени гидратации ( $h$ ) биологических систем [58; 62; 67; 76]. Степенью гидратации называют отношение массы воды в образце к массе сухого материала:

$$h = \frac{m_{\text{гидр}} - m_{\text{сух}}}{m_{\text{сух}}}, \quad (1.6)$$

где  $m_{\text{гидр}}$  – масса гидратированного образца, а  $m_{\text{сух}}$  – сухого.

Особое внимание исследователей явление динамического перехода привлекло, когда обнаружилась корреляция динамического перехода и функциональной активности биологических систем [60; 77; 78]. Было обнаружено, что во многих биологических системах функциональная активность начинается лишь выше температуры динамического перехода. Примерами может служить способность связывания молекулы CO миоглобином [79], перенос электрона в фотосинтезирующих центрах бактерий *Rb. Sphaeroides* [80] и в комплексе белков цитохром с пероксидазы (Ccp) и цитохром с (Cc) [81]. Корреляция между биохимической активностью и динамическим переходом

также была обнаружена для белка бактериордопсина, который является протонным насосом [82; 83].

### 1.2.3. Твердотельный ЯМР

Одним из методов исследования низкотемпературной молекулярной подвижности является твердотельный ЯМР. Данный метод является селективным, так как позволяет наблюдать за сигналом от определенных ядер, например,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$  [84; 85], таким образом, получать информацию о подвижности белка (или других биологических молекул). Также возможно исследование молекулярной подвижности методом  $^2\text{H}$  ЯМР, что позволяет исследовать отдельно динамику гидратного слоя, при условии использования для гидратации дейтерированной воды [84]. Для исследования релаксационных процессов в стеклюющихся средах (например, орто-терфенил, толуол, пропилен карбонат) при использовании дейтерированных образцов также удобен метод  $^2\text{H}$  ЯМР [86].

Информацию о молекулярных движениях извлекают из спин-решеточной релаксации ядер  $T_1$ :

$$T_1^{-1} \sim \left( \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right), \quad (1.7)$$

$$T_1^{-1} \sim \left( \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right), \quad (1.8)$$

для трехуровневых систем (квадрупольное ядро ( $I=1$ ) или в случае двух эквивалентных ядер с  $I=1/2$ ), соответственно. Здесь  $\omega$  - Ларморовская частота исследуемого ядра, а  $\tau_c$  – время корреляции движения.

В случае метода  $^2\text{H}$  ЯМР, кроме анализа времен релаксации также проводят анализ линий спектра. Ядро дейтерия обладает квадрупольным моментом, что приводит к появлению Пейковского дублета в спектре (в случае движений с частотами меньше 1 кГц). Увеличение скорости движения приводит к изменению формы линий, пока не будет достигнут предел при частотах в несколько МГц. Таким образом, исследование времен корреляций движений по форме линий в спектрах  $^2\text{H}$  ЯМР возможно в диапазоне  $10^{-7}$ - $10^{-3}$  с. Однако информация о времени

спин-решеточной релаксации позволяет расширить временной диапазон исследуемых движений.

Также проводились исследования динамического перехода методом твердотельного ЯМР [84; 85; 87–89]. На рис. 1.3 приведены примеры спектров для дейтерированного белка С-фикоцианина [89]. Широкий и узкий Пейковские дублеты приписывают дейтериям цепи белка и метильных групп, соответственно. Узкая компонента в середине спектра, возникающая для гидратированных образцов выше 240К свидетельствует о том, что небольшая доля дейтериев полипептидной цепи белка демонстрирует слабоограниченное движение, которое требует наличия гидратной оболочки. Однако при степенях гидратации выше 0.3 интенсивность центральной линии не возрастает.

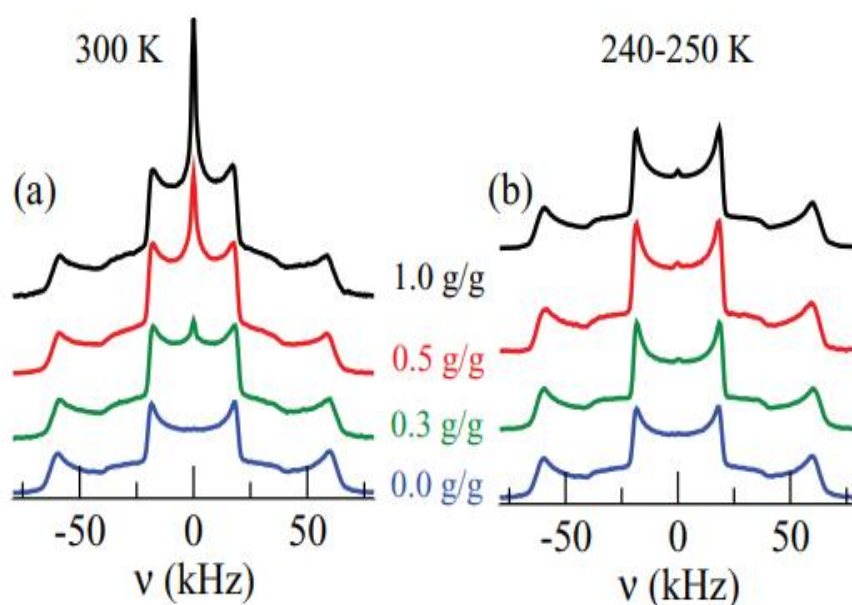


Рисунок 1.3. Спектры  $^2\text{H}$  ЯМР твердотельного эха ( $90_x^\circ - 20\mu\text{s} - 90_y^\circ$ ) для дейтерированного белка С-фикоцианина при различных степенях гидратации при температурах 300К и 250К (для степени гидратации 0.1) и 240К для остальных образцов [89].

Анализируя температурные зависимости скоростей спин-решеточной релаксации при различных значениях магнитного поля можно сделать выводы об энергиях активации движений для белков с различной молекулярной упаковкой [85]. Были обнаружены различия на границе между белком и растворителем. Энергитический ландшафт для внутренне разупорядоченного белка Сендай



оказался более плоским, в то время как четко определенный минимум энергии для глобулярного белка ограничивает локальную динамику. В случае мембранного белка энергия активации оказалась такой же, как и для глобулярного. Таким образом, молекулярная упаковка для динамики играет более важную роль, чем растворитель.

#### 1.2.4. Молекулярное моделирование

Молекулярно-динамическое моделирование – это вычислительная процедура для изучения эволюции молекулярной системы со временем. Данный подход требует знания о начальных координатах атомов и потенциалах взаимодействия. Обычно используется эмпирический потенциал взаимодействия, который учитывает вклад от связанных и несвязанных атомов. Тогда потенциал для атома с координатами  $\mathbf{R}$  будет записан в следующем виде [90]:

$$U(\mathbf{R}) = \frac{1}{2} \sum_{\text{связи}} K_b (b - b_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{углы}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{двугранные углы}} K_\chi [1 + \cos(n\chi - \delta)] + \sum_{\text{несвязанные пары}} (\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon r_{ij}}), \quad (1.9)$$

здесь  $K_b$ ,  $K_\theta$  и  $K_\chi$  – силовые константы для связей, углов и двугранных углов, а  $b$ ,  $\theta$  и  $\chi$  – соответствующие длины связей и углы, отсчитываемые от положений равновесия  $b_0$ ,  $\theta_0$ . Предпоследнее слагаемое – потенциал Леннарда-Джонса для взаимодействий в отсутствие связей, где  $\varepsilon_{ij}$  отвечает за глубину потенциальной ямы, а  $\sigma_{ij}$  – расстояние между атомами  $i$  и  $j$  в минимуме потенциала Леннарда-Джонса. Последнее слагаемое учитывает влияние частичных зарядов ( $q_i$ ), где  $\varepsilon_0$  и  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость вакуума и диэлектрическая проницаемость, соответственно. В обоих слагаемых  $r_{ij}$  – расстояние между атомами  $i$  и  $j$ . Были созданы различные семейства силовых полей (CHARMM [91], GROMOS [92], AMBER [93] и ENCAD), содержащие различные наборы параметров для эмпирической функции потенциальной энергии.

Соответственно, межмолекулярное взаимодействие между молекулами воды может быть представлено в виде:

$$U(\mathbf{R}) = \sum_{\text{несвязанные пары}} \varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon r_{ij}}. \quad (1.10)$$

В молекулярном моделировании используются различные модели для воды, они подразумевают разную геометрию молекул и содержат разные параметры для потенциала воды. Наиболее часто при моделировании белковых систем применяют либо неявные модели воды, либо учитывают явным образом при помощи следующих моделей воды: SPC, SPC/E и TIP3P [94].

Молекулярное моделирование позволяет рассчитать температурную зависимость среднеквадратичного отклонения для любой части системы, например, отдельно для гидратного слоя, для определенных атомов гидратного слоя, для молекулы белка или определенных аминокислот (групп аминокислот), составляющих данный белок [95]. Также метод молекулярного моделирования позволяет *in silico* провести «эксперименты», которые в принципе не возможны в реальности. Так, например, можно «заморозить» гидратную оболочку при определенной температуре, при этом меняя температуру белка или наоборот [96; 97]. Однако данный метод всегда требует некоторой экспериментальной проверки и подкрепления. Таковой, например, могут служить данные по рассеянию нейтронов, в случае обычных условий расчетов [97; 98].

### 1.2.5. Комбинационное рассеяние света

Комбинационное рассеяние света (Рамановская спектроскопия) основано на рассеянии кванта света в среде с генерацией или поглощением колебательного возбуждения. Обычно в методе комбинационного рассеяния света используют монохроматический источник и детектируют спектр рассеянного света. Спектр описывают как спектральную плотность мощности,  $I(\mathbf{q}, \omega)$ , где  $\mathbf{q}$  – волновой

вектор рассеяния, а  $\omega$  – частота. Однако в случае некристаллических тел зависимостью интенсивности от волнового вектора пренебрегается.

Путем подбора исследуемой частоты можно делать вывод о конформационных изменениях, возникновении подвижности целой молекулы или ее фрагментов. Так, например, частоты 2880 и 2850  $\text{см}^{-1}$  соответствует ассиметричным и симметричным колебаниям фрагмента  $\text{CH}_2$ , соответственно [73; 99; 100]. Наблюдая за интегральной интенсивностью линии на частоте 1130  $\text{см}^{-1}$  можно делать вывод об эволюции количества транс-конформаций С-С связей в ацильных хвостах липидов, а линия на частоте 722  $\text{см}^{-1}$  (колебания связи С-N) практически не меняется с температурой в бислоях, а значит, может служить эталоном при температурных исследованиях модельных мембран [71; 73; 99; 100]. Низкие же частоты ( $<200 \text{ см}^{-1}$ ) позволяют исследовать колебания больших фрагментов молекул или небольших молекул целиком [72].

В работе [71] методом комбинационного рассеяния света был исследован липидный бислой DPPC (липид с полностью насыщенными ацильными хвостами). Было обнаружено, что до 200 К спектр практически не меняется, однако при дальнейшем повышении температуры интенсивность линии на частоте 1130  $\text{см}^{-1}$  падает, при этом интегральная интенсивность спектра оставалась прежней. Данное явление удалось объяснить перестройкой С-С связей ацильных хвостов из транс-конформаций в другие. Интересно, что температура начала таких перестроек совпадает с температурой динамического перехода. Таким образом, оказывается, что роль растворителя не так уж важна при динамическом переходе, поскольку ацильные хвосты находятся далеко от молекул воды.

При исследовании трех различных кристаллических фаз глицина [72] для наблюдения были выбраны низкочастотные пики ( $<200 \text{ см}^{-1}$ ), что позволяло наблюдать за колебаниями практически целой молекулы, так как глицин – аминокислота небольшого размера. Полученные данные были сопоставлены с предсказанными температурными зависимостями частот и ширин линий при колебаниях в потенциале с кубическим ангармоническим членом. Было

обнаружено, что данные хорошо предсказываются вплоть до 250 К, однако выше данной температуры смещение частот удалось объяснить только смещением самого потенциала. Изменения были одинаковы для всех кристаллических фаз, то есть глицин в кристаллическом состоянии оказался подвержен конформационным изменениям при 250 К.

Как было написано выше, линия на частоте  $2880 \text{ см}^{-1}$  соответствует ассиметричным колебаниям фрагмента  $\text{CH}_2$ . Ее появление в диапазоне 150-230К приписывается появлению беспорядка в упаковке или торсионных колебаний. Исследование температурных зависимостей интенсивностей линий, соответствующих ассиметричным колебаниям фрагмента  $\text{CH}_2$  и связи С-С, в модельной мембране DPPC показало, что появление торсионных колебаний в данной мембране совпадает по температуре (200 К) с переходом ацильных хвостов от транс-конфигурации к гош [99]. Также оказалось, что добавление холестерина никак не влияет ни на конфигурацию ацильных хвостов, ни на подвижность в случае бислоя DPPC [73]. Однако в модельной мембране, состоящей из липидов с одной ненасыщенной связью в ацильном хвосте POPC, подвижность проявлялась вблизи 100 К, а изменение конфигурации липидных хвостов также при 200 К. Такое поведение было объяснено наличием свободного объема в мембране POPC из-за изгиба хвоста за счет двойной связи [73; 99]. Как и в случае с мембраной DPPC добавление холестерина не влияло на конфигурации хвостов, при этом температура возникновения торсионных движений повышалась до 200 К [73]. Такое поведение объяснили более плотной упаковкой липидных хвостов POPC вокруг молекулы холестерина, что в свою очередь приводит к подавлению гибкости [73]. При исследовании модельных мембран, состоящих из других ненасыщенных липидов (DOPC и DLPC), температура возникновения подвижности оказалось той же, что в модельной мембране POPC. Такое поведение было объяснено также дефектами в упаковке [100].

### 1.3. ЭПР спиновых меток и зондов

### 1.3.1. Стационарный ЭПР спиновых зондов и меток

Для исследования методом ЭПР необходимо наличие в образце парамагнитных центров. Обычно ими выступают спиновые зонды (растворяются в матрице образца) и спиновые метки (имеют ковалентную связь с молекулами образца). Наиболее часто в качестве парамагнитных центров используются нитроксильные радикалы, где неспаренный электрон принадлежит фрагменту N-O. Для исследования молекулярной подвижности методом ЭПР могут применяться как стационарные, так и импульсные методики.

Спин-гамильтониан нитроксильного радикала в постоянном поле X-диапазона ЭПР (используется в данной работе) можно записать следующим образом [101]:

$$\mathcal{H} = \beta \mathbf{B} \mathbf{g} \mathbf{S} + \hbar \mathbf{S} \mathbf{A} \mathbf{I}, \quad (1.11)$$

где  $\beta$  – магнетон Бора,  $\mathbf{B}$  – вектор магнитного поля,  $\mathbf{g}$  – тензор g-фактора,  $\mathbf{A}$  – тензор сверхтонкого взаимодействия,  $\mathbf{S}$  и  $\mathbf{I}$  – операторы спина электрона и ядра соответственно.

Здесь учтено зеемановское и сверхтонкое (со спином ядра азота) взаимодействия для электрона. В данном диапазоне ЭПР ядерное зеемановское взаимодействие ядра азота и квадрупольное взаимодействие (для ядра  $^{14}\text{N}$ ) с протонами окружения пренебрежимо малы.

В лабораторной системе отсчета  $x, y, z$ , где  $z$  – ось, направленная вдоль направления магнитного поля  $\mathbf{B}$ , гамильтониан можно записать в виде:

$$\mathcal{H} = \beta B g_{zz}(\theta, \varphi) S_z + \hbar S_z [A_{zx}(\theta, \varphi) I_x + A_{yz}(\theta, \varphi) I_y + A_{zz}(\theta, \varphi) I_z], \quad (1.12)$$

где углы  $\theta$  и  $\varphi$  определяют ориентацию магнитного поля в молекулярной системе координат. В этой системе координат оба тензора ( $\mathbf{g}$  и  $\mathbf{A}$ ) имеют диагональный вид (принято считать, что оси этих тензоров совпадают). Ось X молекулярной системы отсчета направлена вдоль связи N-O нитроксильного радикала, ось Z направлена вдоль p-орбитали, содержащей неспаренный электрон, ось Y

ортогональна двум другим осям. Слагаемые, содержащие  $S_x$  и  $S_y$ , в выражении (1.12) опущены, так как не вносят вклад в первый порядок теории возмущения.

Положение спектральных линий, заданное гамильтонианом (1.12):

$$B_m(\theta, \varphi) = \frac{g_e \omega}{g_{zz}(\theta, \varphi) \gamma} - m \frac{a(\theta, \varphi)}{\gamma}, \quad (1.13)$$

где  $g_e$  – g-фактор свободного электрона,  $\omega$  – рабочая частота спектрометра,  $\gamma$  – гиромагнитное соотношение для электрона,  $m$  – проекция ядерного спина на вектор  $\mathbf{a}(\theta, \varphi) = (A_{xz}, A_{yz}, A_{zz})$  (для  $^{14}\text{N}$   $m=0, \pm 1$ ). Выражение для  $g_{zz}(\theta, \varphi)$  и  $a(\theta, \varphi)$  в системе отсчета радикала:

$$g_{zz}(\theta, \varphi) = g_{xx} \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + g_{yy} \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + g_{zz} \cos^2 \theta, \quad (1.14)$$

$$a(\theta, \varphi) = |\mathbf{a}| = (A_{xx}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + A_{yy}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + A_{zz}^2 \cos^2 \theta)^{1/2}, \quad (1.15)$$

где  $g_{xx}$ ,  $A_{xx}$  и т. д. - главные значения соответствующих тензоров.

Усредняя по всем возможным ориентациям нитроксильного радикала в твердом теле:

$$F(B) = \frac{1}{4\pi} \sum_m \iint \sin \theta d\theta d\varphi f(B - B_m(\theta, \varphi)), \quad (1.16)$$

В выражении (1.16)  $f(B)$  определяет форму линий для всех неразрешенных сверхтонких взаимодействий с ядрами матрицы. Обычно эту функцию аппроксимируют гауссовой или лоренцевой линией. На рис. 1.4 изображены примеры спектра нитроксильного радикала и первой производной по полю.

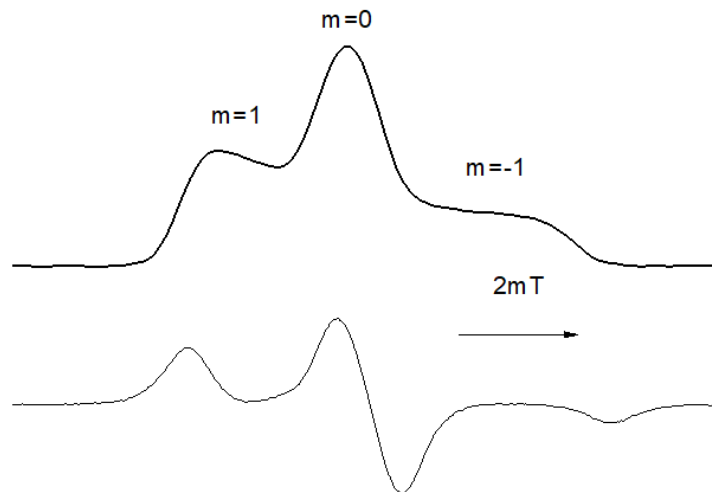


Рисунок 1.4. Спектр и производная по полю в твердом теле для нитроксильного радикала.

### **1.3.2. Малоугловые движения молекул в неупорядоченных средах – динамические и стохастические либрации**

В твердых телах трансляционные и вращательные движения молекул в значительной мере подавлены, активными остаются только их колебания вблизи положения равновесия. Ориентационные колебания молекул как целых могут происходить только на малые углы; такие колебания называются молекулярными либрациями. Либрации могут быть динамическими и стохастическими [102]. Динамические либрации – это обычные для твердых тел колебания, они происходят с частотой в терагерцовой области. Эти либрации проявляют себя в стационарном ЭПР. При понижении температуры, в твердых телах, стационарный спектр становится сильно анизотропным. Терагерцовые же движения приводят к уменьшению расщеплений в этом спектре [103; 104]. Метод стационарного ЭПР позволяет получить зависимость среднеквадратичного углового отклонения,  $\langle \alpha(t)^2 \rangle$ , которое может достигать максимального значения  $\sim 0,1 \text{ рад}^2$ .

Стохастические либрации являются специфическим типом движения для молекулярных сред – ввиду слабости межмолекулярных взаимодействий здесь потенциальная яма, которой ограничена молекула, получает возможность сама флуктуировать [102]. Эти флуктуации ведут к стохастическим флуктуациям магнитного поля, что приводит к спиновой релаксации. Таким образом, стохастические либрации могут наблюдаться в импульсном ЭПР – в его варианте электронного спинового эха. Каждая компонента спектра соответствует определенной ориентации спиновой метки. Когда импульс возбуждает узкий участок спектра, соответствующий наиболее анизотропной компоненте, ограниченные малоугловые движения ведут к большей релаксации, чем наблюдалась бы при возбуждении других участков спектра.

### **1.3.3. Детектируемые в стационарном ЭПР динамические либрации**

Так как стационарный ЭПР чувствителен к движениям быстрее  $10^{-8}$ с [105], становится возможным исследование динамических либраций [103; 104]. Стационарные спектры в твердом теле, полученные при различных температурах, позволяют найти температурную зависимость среднеквадратичного углового отклонения при таких движениях. Действительно, усредненная движением компонента сверхтонкого взаимодействия  $A'_{zz}$  может быть выражена через компоненты сверхтонкого взаимодействия в главных осях нитроксильного радикала [106]:

$$A'_{zz} = A_{zz} - \langle \sin^2 \alpha \rangle (A_{zz} - A_{\perp}), \quad (1.17)$$

где в случае малой амплитуды угла поворота  $\alpha$ , можно произвести замену  $\langle \sin^2 \alpha \rangle = \langle \alpha^2 \rangle$ .

Так как смещения атомов в формуле (1.5) прямо пропорциональны углу  $\alpha$  в (1.17), то можно считать, что измерение  $A'_{zz}$  в стационарном ЭПР с последующим определением  $\langle \alpha^2 \rangle$  дает качественно и количественно такую же информацию, что и измерение рассеяние нейтронов. Данные обоих методов были сопоставлены в [102] для молекулярного стекла ортотерфенила, результаты сопоставления оказались в очень хорошем согласии. При этом в температурной зависимости  $\langle \alpha^2 \rangle$  наблюдается такой же излом, что и в температурной зависимости среднеквадратичного смещения в методе рассеяния нейтронов. Таким образом, стационарный ЭПР может быть использован для изучения явления динамического перехода.

Величина компоненты  $2A'_{zz}$  может быть получена из величины расщепления между внешними пиками в стационарном спектре ЭПР. Температурная зависимость компоненты  $A'_{zz}$  приведена на рис. 1.5. Видно, что данная температурная зависимость может быть аппроксимирована прямой линией в низкотемпературной области. Чтобы найти температурную зависимость среднеквадратичного углового отклонения, необходимо найти величину  $A_{zz}$ . Данная величина может быть определена как главное значение усредненное



движением при нулевой температуре ( $A'_{zz}(T = 0) = A_{zz}$ ), а  $A_{\perp}$  можно взять равным 5G, так как данная компонента много меньше  $A_{zz}$  [107].

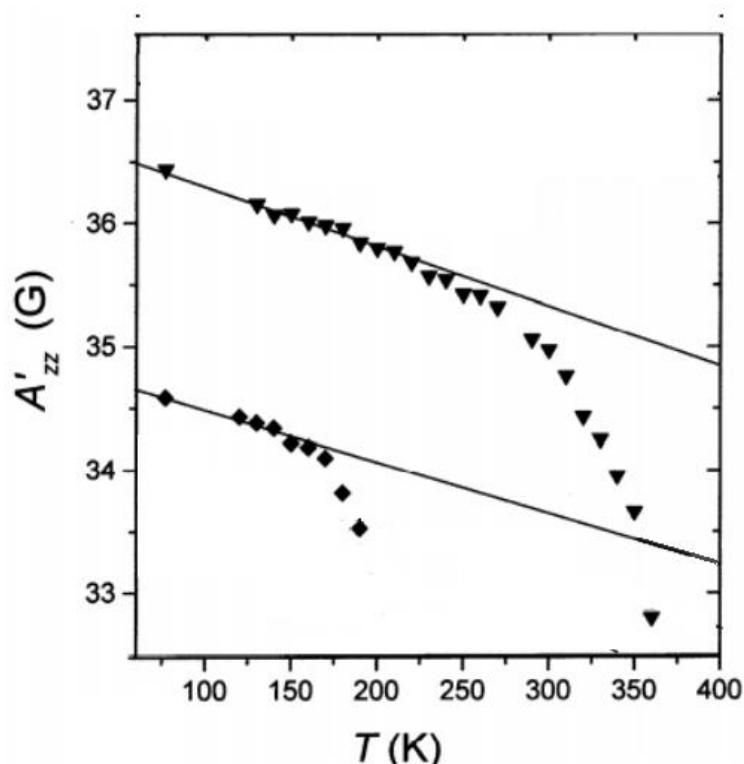


Рисунок 1.5. Температурная зависимость главного значения  $A'_{zz}$  для нитроксильного радикала в стеклах дибутилфталата (треугольники) и водно-глицериновой смеси (ромбы) [103].

На рис. 1.6 приведен пример температурной зависимости среднеквадратичного углового отклонения, полученной для нитроксильного радикала в стекле водно-глицериновой смеси. Интересно отметить, что полученная методом стационарного ЭПР спиновых зондов температурная зависимость среднеквадратичного углового отклонения демонстрирует то же поведение, что и температурная зависимость среднеквадратичного отклонения на рис. 1.1, полученная для глицерина методом нейтронного рассеяния [53].

В работах [108–110] были получены спектры нитроксильных радикалов в кристаллах, молекулярных стеклах, застеклованных полимерах и жидких кристаллах. Путем моделирования и подгонки удалось извлечь магнитные параметры. Было обнаружено, что гармонические либрации в кристаллах не наблюдаются в X-диапазоне ЭПР [108]. Увеличение молекулярной подвижности в

стеклах и жидких кристаллах вблизи температуры стеклования объяснено квази-либрациями. Получены температурные зависимости угловых смещений вокруг каждой из осей [108; 110]. Под квази-либрациями в данных работах понимается быстрые стохастические угловые движения зонда в клетке матрицы с амплитудой порядка  $\sim 5^\circ$ - $15^\circ$ .

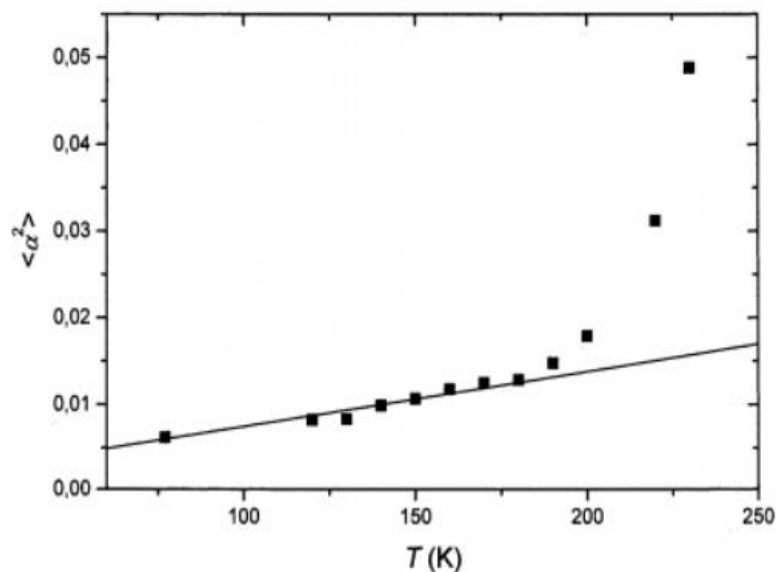


Рисунок 1.6. Температурная зависимость среднеквадратичного углового отклонения для нитроксильного радикала в стеклах водно-глицериновой смеси [111].

Также методом стационарного ЭПР спиновых зондов в работе [112] исследовали стеклование воды в тонких капиллярах. В ходе исследования в воде был растворен нитроксильный радикал и получены стационарные спектры при различных температурах. По полученной температурной зависимости главного значения  $A'_{zz}$  находят температуру, при которой главное значение становится равным 50G, что соответствует времени релаксации  $\sim 10^{-8}$ с. Найденная температура коррелирует с температурой стеклования, но оказывается выше. Связь между этими двумя температурами выведена полуэмпирически ранее. Таким образом, удастся найти температуру стеклования воды равной 135К.

В недавней работе [113] методом стационарного ЭПР была исследована зависимость интенсивности малоугловых либраций в зависимости от положения и степени гидратации мембраны, состоящей из молекул DPPC, в температурном

диапазоне 120-270 К. Оказалось, что вблизи поверхности мембраны движения значительно подавлены и среднеквадратичное угловое отклонение практически не меняется с температурой. Такое поведение практически не зависит от степени гидратации. В то же время в глубине мембраны либрационные движения значительно подавляются при понижении степени гидратации. Также в работе была определена температура динамического перехода в глубине мембраны, которая составила 240 К для полностью гидратированной мембраны и мембраны с низкой степенью гидратации мембраны и 225 К для мембраны с очень низкой степенью гидратации.

Однако метод стационарного ЭПР обладает и своими недостатками. Так, например, по спектрам стационарного ЭПР нельзя определить модель движения. Это могут быть изотропное или анизотропное Броуновское движение, ориентационные прыжки или либрации. Кроме того величина расщепления между двумя внешними пиками спектра зависит и от полярности растворителя или самого спинового зонда, которая может меняться с температурой и вносить существенные искажения [114].

### 1.3.4. Детектируемые в электронном спиновом эхо (ЭСЭ) стохастические либрации

Связь времен продольной и поперечной релаксации с флуктуациями локального магнитного поля в рамках теории Редфильда определяется следующим образом [103]:

$$\frac{1}{T_1} = \gamma^2 (\langle B_x^{*2} \rangle + \langle B_y^{*2} \rangle) \frac{\tau_c}{1 + \tau_c^2 \omega^2}, \quad (1.18)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{2T_1} + \gamma^2 \langle B_z^{*2} \rangle \tau_c \quad (1.19)$$

Здесь  $B_x^*$ ,  $B_y^*$ ,  $B_z^*$  - флуктуирующие магнитные поля, действующие на электрон, также введены обозначения  $\omega = \gamma B$  и  $\tau_c$  - время корреляции. Учитывая, что  $T_1 \gg T_2$ , то выражение (1.19) может быть переписано без учета первого слагаемого:

$$\frac{1}{T_2} = \gamma^2 \langle B_z^{*2} \rangle \tau_c \quad (1.20)$$

Условие применимости теории Редфильда [103]:

$$\gamma^2 \langle B_{x,y,z}^{*2} \rangle \tau_c^2 \ll 1. \quad (1.21)$$

Причинами релаксации (т.е. флуктуации локальных магнитных полей  $B_x^*$ ,  $B_y^*$ ,  $B_z^*$ ) могут служить дипольное взаимодействие электронов, флип-флоп переходы в ядерной системе, движение метильных групп нитроксильных радикалов, молекул окружения и движение самих нитроксильных радикалов, как целых.

Для стохастических молекулярных движений можно записать [115]:

$$\frac{1}{T_2} = \langle \Delta\omega^2 \rangle \tau_c. \quad (1.22)$$

В случае малого угла отклонения  $\alpha(t)$  вокруг оси X:

$$\Delta\omega \cong \alpha(t) \times \gamma \left[ B(g_{\perp} - g_{\parallel}) + \frac{m(A_{\perp}^2 - A_{\parallel}^2)}{(A_{\perp} \sin^2 \theta + A_{\parallel} \cos^2 \theta)} \right] \times \sin \theta \cos \theta \sin \varphi. \quad (1.23)$$

Здесь  $g_{\perp}$ ,  $g_{\parallel}$ ,  $A_{\perp}$  и  $A_{\parallel}$  – главные значения  $g$ -тензора и тензора сверхтонкого взаимодействия соответственно в аксиальном их приближении. Из последнего выражения (1.23) видно, что скорость релаксации зависит не только от анизотропии  $g$ -тензора и СТВ, но и от угла  $\theta$ , определяющего положение в спектре. Отсюда видно, что центральная компонента спектра (с  $m=0$ ) не подвержена влиянию анизотропии тензора сверхтонкого взаимодействия, откуда можно сделать вывод, что стохастические движения нитроксильного радикала в данной компоненте вносят относительно небольшой вклад. При этом компонента с  $m=-1$  (высокопольная и самая широкая) обладает наибольшей анизотропией.

Для получения времени поперечной релаксации используют двухимпульсную (Хановскую) последовательность:  $\pi/2 - \tau - \pi - \text{эхо}$  (также она может быть записана в виде  $90^\circ - \tau - 180^\circ - \text{эхо}$ ) (схема на рис. 1.7а). При записи эхо-детектируемого (ЭД)-спектра (рис. 1.7б) время задержки между импульсами  $\tau$  остается фиксированным, стационарное магнитное поле меняется. В случае фиксированного магнитного поля и изменения раздвижки между импульсами  $\tau$  можно записать спад электронного спинового эха (ЭСЭ) (примеры на рис. 1.7в).

Однако спиновая релаксация обусловлена несколькими причинами, при этом можно считать, что вклады в спиновую релаксацию, вызванные различными причинами независимы и аддитивны [116]. При сравнении спадов в различных положениях спектра можно выделить анизотропный вклад, в который обусловлен стохастическими либрациями. Также от положения в спектре зависит и вклад, обусловленный диполь-дипольным взаимодействием между спинами – так называемая «мгновенная диффузия». Последний вклад зависит только от локальной концентрации спинов электронов и не зависит от температуры, поэтому может быть легко учтен. Для получения скорости анизотропной релаксации,  $\Delta W$ , (вклад в релаксацию, связанный со стохастическими либрациями) можно делить спады ЭСЭ в центральной компоненте спектра (самая изотропная) и середине высокопольной компоненты (самая анизотропная) (положения в ЭД-спектре отмечены на рис. 1.7 как I и II, соответственно). Тогда результирующий спад ЭСЭ за счет стохастических либраций, полученный с помощью двухимпульсной последовательности может быть представлен следующим образом:

$$E_{2-p} = \text{const} \cdot \exp(-2\tau\Delta W_{2-p}), \quad (1.24)$$

А скорость анизотропной релаксации определяется следующим выражением (при либрациях вокруг оси X):

$$\Delta W_{2-p} = \frac{1}{T_2^I} - \frac{1}{T_2^{II}} = R_x^2 \langle \alpha^2 \rangle \tau_c, \quad (1.25)$$

где  $\langle \alpha^2 \rangle$  - среднеквадратичное угловое отклонение,  $\tau_c$  – время корреляции. Их произведение,  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$ , называют параметром подвижности. При извлечении параметра подвижности из скорости анизотропной релаксации (полученной в результате деления ЭСЭ в центральной и высокопольной компонентах) для нитроксильных спиновых меток в X-диапазоне ЭПР можно взять значение  $R_x^2 = 10^{17} \text{ c}^{-2}$  [103].

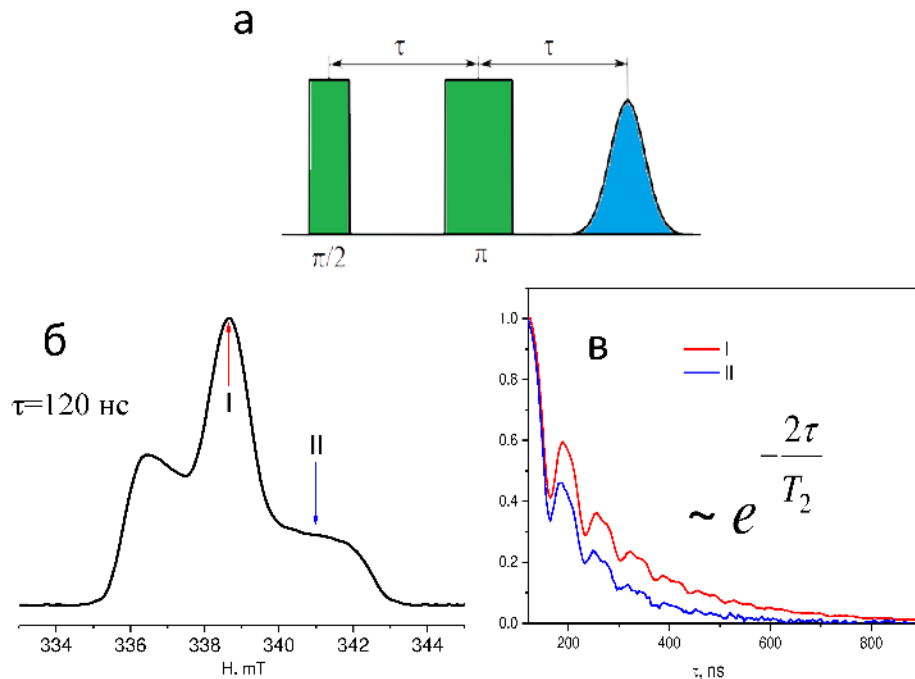


Рисунок 1.7. а – двухимпульсная последовательность для регистрации ЭСЭ, б – пример ЭД спектра, в – спады ЭСЭ в центральной (**I**) и высокопольной (**II**) компонентах.

### 1.3.5. Стохастические либрации в различных системах

В работе [117] была исследована скорость анизотропной релаксации в зависимости от размера нитроксильного радикала и стекла, в котором он растворен при одной температуре. Существенных различий для спиновых зондов различных размеров и структуры обнаружено не было, однако скорость анизотропной релаксации менялась при смене растворителя. Таким образом удалось показать, что наблюдаемые низкоамплитудные стохастические либрации являются коллективными, определяются матрицей на масштабах, соответствующих размеру спинового зонда, а также не зависят от его строения, таким образом, внутренние движения молекулы нитроксильного радикала на скорость анизотропной релаксации влиять не могут.

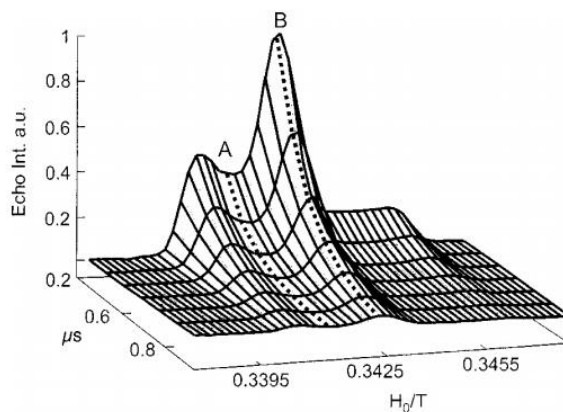


Рисунок 1.8. Двумерный ЭД спектр нитроксильного радикала. На спектре указаны положения наиболее и наименее быстро релаксирующих компонент А и В, соответственно [117].

Впоследствии двухимпульсный метод активно применялся для исследования низкоамплитудных молекулярных либраций. В качестве парамагнитных центров в подавляющем большинстве случаев служили нитроксильные радикалы в виду наличия в их спектре значительной анизотропии. Наиболее часто данным методом проводились исследования подвижности мембран [116; 118–123]. При изучении мембран обычно выбирают спин-меченные молекулы, способные встраиваться в мембрану известным образом, наиболее часто это стеариновые кислоты или липиды. Выбирая спиновые зонды с различным положением метки вдоль углеродной цепи, можно исследовать подвижность в различных областях мембраны.

Так в работе [118] были проведены исследования зависимости скорости анизотропной релаксации для различных положений по глубине в мембране содержащей 50% холестерина. При низких температурах (до 160К) скорость анизотропной релаксации возрастает с увеличением расстояния от метки до поверхности мембраны. При повышении температуры для положений больше десятого в углеродной цепи (считается от полярной головки липида) наблюдаются приблизительно одинаковые значения скорости анизотропной релаксации.

В работах [122; 124] были проведены сравнения температурных зависимостей скоростей релаксации, параметров подвижности, среднеквадратичной угловой амплитуды переориентаций и времени корреляции

движений для модельных мембран, состоящих из различных сортов липидов. Однако разделение параметра подвижности на среднеквадратичное угловое отклонение и время корреляции в импульсном методе невозможно, для данных целей данные двухимпульсного метода дополняют данными, извлеченными из стационарных спектров. Однако последний метод имеет свои недостатки, как было упомянуто ранее. В данных двух работах проводилось сравнение подвижности для модельных мембран состоящих из липидов, представленных в мембранах эукариот (DPPC) и липидов, входящих в мембранный состав архей (DHPC). Был обнаружен динамический переход при температурах 200-240К. В модельной мембране DHPC подвижность оказалась ниже [122]. При сравнении подвижности вблизи поверхности и в глубине модельных мембран, состоящих из липидов с полностью насыщенными связями в липидных хвостах (DPPC), одной ненасыщенной в одном из липидных хвостов (POPC), имеющем по одной ненасыщенной связи в каждом хвосте (DOPC), последние две модельные мембраны демонстрировали большую подвижность, причем подвижность возрастала для этих мембран вблизи ненасыщенных связей. Также большая подвижность для мембраны POPC по сравнению с DPPC наблюдалась в работе [99], где была объяснена менее плотной упаковкой первой мембраны за счет изгиба хвоста с ненасыщенной связью.

С использованием двухимпульсного метода ЭПР было исследовано влияние криопротектантов на подвижность мембран (сахарозы, трегалозы, сорбитола и глицерина) [116; 120]. Все криопротектанты за исключением сорбитола увеличивали подвижность исследуемой мембраны. Также было обнаружено, что для нитроксильного радикала в водном растворе дисахаридов (сахароза, трегалоза) наблюдаемая подвижность совпадает с подвижностью мембраны без криопротектантов.

Наблюдения за подвижностью спин-меченого антибактериального пептида аламетицина, встроенного в модельную мембрану [125], показали различную подвижность вдоль альфа-спирали пептида, несмотря на расположение пептида в данной концентрации преимущественно вдоль поверхности мембраны.



Выдвинуто предположение, что либрации пептида могут влиять на ионный транспорт, осуществляемый пептидом, так как время корреляции либраций меньше времени транспорта иона.

Динамический переход двухимпульсным методом ЭПР удалось наблюдать в фотосинтетическом реакционном центре бактерий [126], а также сухом, растворенном в буфере PBS (60% глицерина) и растворенном в воде гемоглобине [127]. Во всех случаях параметр подвижности возрастал выше 180К. Для сухого гемоглобина выше 240К наблюдалось насыщение температурной зависимости скорости анизотропной релаксации.

Исследование подвижности нитроксильного и тритильного радикалов проводилось в трегалозе и двух ионных жидкостях [128]. Скорость анизотропной релаксации для тритильного радикала определялась путем сравнения спадов спинового эха в двух частотных диапазонах, ввиду малой ширины спектра ЭПР для данного радикала. Были рассчитаны калибровочные коэффициенты для сравнения данных тритильного и нитроксильного радикалов. С учетом калибровочных коэффициентов температурные зависимости параметра движения совпадали. Однако использование в эксперименте тритильного радикала позволяло расширить температурный диапазон благодаря более медленной релаксации. Неудобством же в его применении является использование двух частотных диапазонов.

Исследование малоамплитудных стохастических либраций также зарекомендовало себя как структурный метод при исследовании мембран [99], где было показано, что для мембраны с более разупорядоченной структурой наблюдается большая подвижность. При исследовании ионных жидкостей двухимпульсным методом [129–134] при некоторой температуре наблюдалось падение скорости анизотропной релаксации с ростом температуры, после чего вновь следовал рост. Данное поведение было интерпретировано, как перестройка структуры матрицы ионной жидкости в температурном диапазоне, в котором наблюдалось падение скорости анизотропной релаксации.

### 1.3.6. Стимулированное эхо

Исследовать более медленные движения позволяет метод стимулированного спинового эха (ССЭ), в котором используется последовательность  $90^\circ$ - $\tau$ - $90^\circ$ - $T$ - $90^\circ$ - $\tau$ -эхо. В методе стимулированного эха подается трехимпульсная последовательность:  $\pi/2 - \tau - \pi/2 - T - \text{эхо}$  (или  $90^\circ - \tau - 90^\circ - T - 90^\circ$ ). Интенсивность сигнала стимулированного спинового эха будет:  $\exp(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{T}{T_1})$ . Трехимпульсный метод может применяться в двух вариантах: для электронно-ядерной модуляции (время задержки между импульсами  $\tau$  фиксировано) и для исследования медленных (микросекундных) движений (изменяется время задержки между импульсами  $\tau$ , время  $T$  выступает в качестве параметра). В первом случае сигнал получают при фиксированном значении поля (обычно в центральной компоненте в связи с ее наибольшей интенсивностью), затем вычитают сам релаксационный вклад [135; 136]. Во втором случае спады стимулированного эха, как и в двухимпульсном методе, снимают в двух положениях по полю (в центральной и высокопольной компонентах). Последующее их деление позволяет извлечь вклад анизотропной релаксации и учесть влияние медленных движений [115; 137].

При исследовании медленных стохастических движений спад стимулированного эха можно представить в виде:

$$E_{3-p}(2\tau, T) = \text{const} \cdot \exp(-2\tau W_{3-p}), \quad (1.26)$$

где  $W_{3-p}$  зависит от  $T$  и имеет вид:

$$W_{3-p}(T) = \frac{1}{2} |R_x| \Omega_x T. \quad (1.27)$$

В формуле (1.27)  $\Omega_x$  – параметр, характеризующий ширину распределения функции для угловых скоростей движения вокруг оси  $X$ .

В работе [138] для исследования медленных движений в кластерах иономеров путем внедрения нитроксильных радикалов использовался высокопольный ЭПР (94ГГц) и вариант метода, в котором временная задержка между импульсами  $\tau$  остается постоянной, а  $T$  возрастает. Высокопольный ЭПР

позволяет исследовать переориентации с различной симметрией. В результате моделирования были оценены амплитуда и характерное время движения, однако не были учтены другие вклады в спиновую релаксацию, например от движений протонов.

Позднее был предложен иной вариант использования метода стимулированного эха [139; 140], где спады спинового эха записывались с ростом  $\tau$  в двух положениях по полю, а раздвижка между импульсами  $T$  выступала в качестве параметра. Как и в двухимпульсном методе при аппроксимации отношения спадов в двух положениях прямой линией в полулогарифмической шкале, можно извлечь скорость анизотропной релаксации при данной температуре и данной раздвижке  $T$ . Было показано, что данный метод позволяет изучать медленные движения с временами корреляции  $\tau_c > 10^{-6}$  и амплитудой  $\sim 0,1$ - $1^\circ$ .

Данный метод активно использовался для исследования медленных движений в модельных мембранах [115; 139; 141; 142]. В работе [115] было показано, медленные вращения появляются в модельных мембранах вблизи липидных хвостов при меньших температурах, чем вблизи поверхности. При добавлении в модельную мембрану холестерина (50%) было обнаружено подавление медленных вращений, но усиление стохастических либраций [141], при этом в следующей работе [142] было показано, что подавление медленных вращений происходит только у поверхности мембраны, но усиливает при углублении в гидрофобную часть. При исследовании медленных вращений трихогина в модельной мембране, для которого известно, что в зависимости от концентрации по отношению к липиду он может занимать положение вдоль поверхности мембраны (низкая концентрация  $\sim 1:200$ ) и трансмембранное (высокая  $\sim 10:200$ ), было обнаружено, что медленные вращения в исследуемом диапазоне температур проявляется только при высокой концентрации трихогина [143]. Также медленные движения исследовались в молекулярных стеклах [137], где вероятно, коррелировали с альфа-релаксацией.

Для исследования подвижности дейтерированных частей молекул или молекул целиком можно использовать метод стимулированного спинового эха в другом варианте. Например, в работе [135] времена вращения дейтерированных метильных групп нитроксильного радикала исследовались путем анализа Пейковского дублета, полученного после обработки и Фурье-преобразования данных ССЭ. Слияние Пейковского дублета происходит при временах движения  $\sim 10^{-5}$  с. Далее данная методика была применена для исследования переориентаций молекул воды в гидратном слое модельных мембран [136], было обнаружено, что переориентации со скоростями  $\sim 10^{-5}$  с возникают в температурном диапазоне, в котором наблюдается резкий рост параметра движения для данных мембран, полученный двухимпульсным методом.

## Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕТОДИКА

Структуры нитроксильных радикалов, используемых в данной работе, приведены на рис. 2.1. Спиновые зонды **I**, **VI**, **VII** были приобретены в Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Спиновые зонды **II**, **III** и спиновая метка **V** были предоставлены И. А. Григорьевым и И. А. Кирилюком (НИОХ СО РАН, Новосибирск).

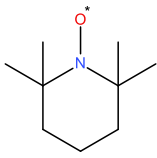
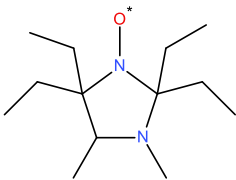
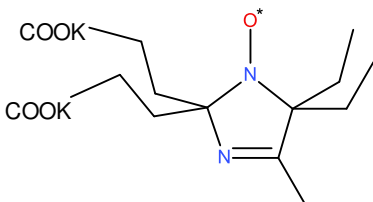
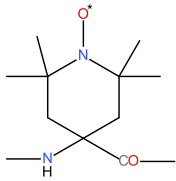
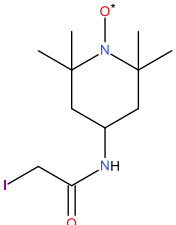
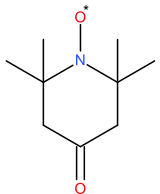
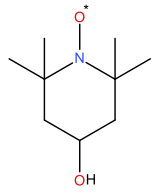
			
<b>I (Темпо)</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	
			
<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI (ТЕМПОН)</b>	<b>VII (ТЕМПОЛ)</b>

Рисунок 2.1. Структуры используемых в данной работе нитроксильных радикалов.

Структуры фосфолипидов DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) и липид, спин-меченный в области гидрофильной головки, T-PCSL (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho(TEMPO)choline) (получены от Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабастр, США) приведены на рис. 2.2. Структуры стеариновых кислот, спин-меченных нитроксильной меткой DOXYL в пятом (5-DSA) и шестнадцатом (16-DSA) положениях, (получены от Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) приведены на рис. 2.3.

Спин-меченые аналоги антимикробных пептидов были синтезированы и предоставлены профессором Ф. Формаджио и его коллегами (Падуя, Италия), как описано в [144]. В данной методике аминокислота (Aib) заменяется спиновой меткой ТОАС (рис. 2.1).

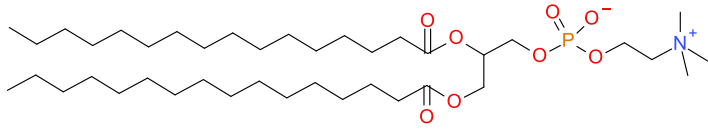
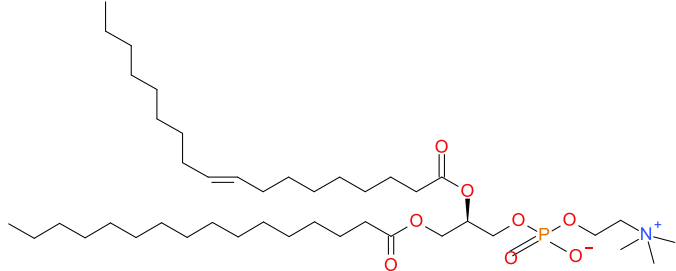
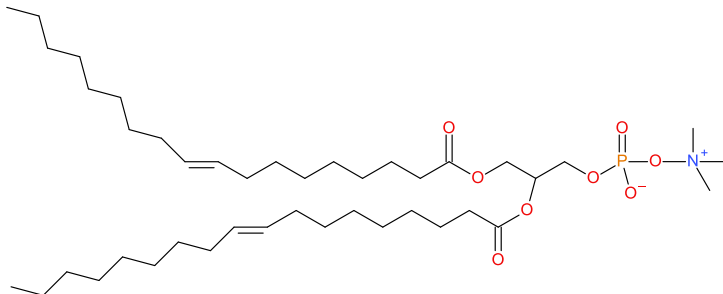
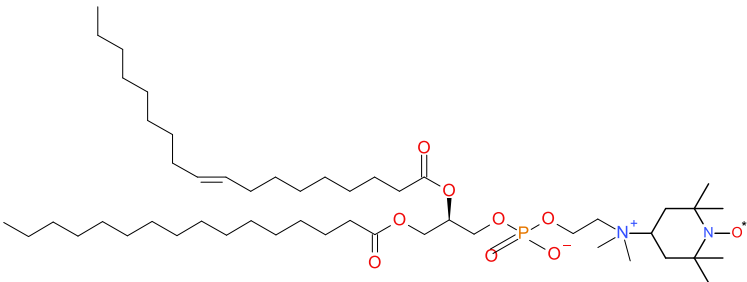
	DPPC
	POPC
	DOPC
	T-PCSL

Рисунок 2.2. Структуры используемых в работе фосфолипидов.

Лизоцим, казеин, мочеви́на и тиомочеви́на были приобретены в Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

Все измерения были проведены на ЭПР спектрометре Bruker ELEXSYS E580 9 ГГц FT-EPR (Bruker, Германия), оборудованном криостатом Oxford

Instruments CF 935. Криостат охлаждали струей холодного газообразного азота. Температуру контролировали с точностью  $\pm 0,5$  К.

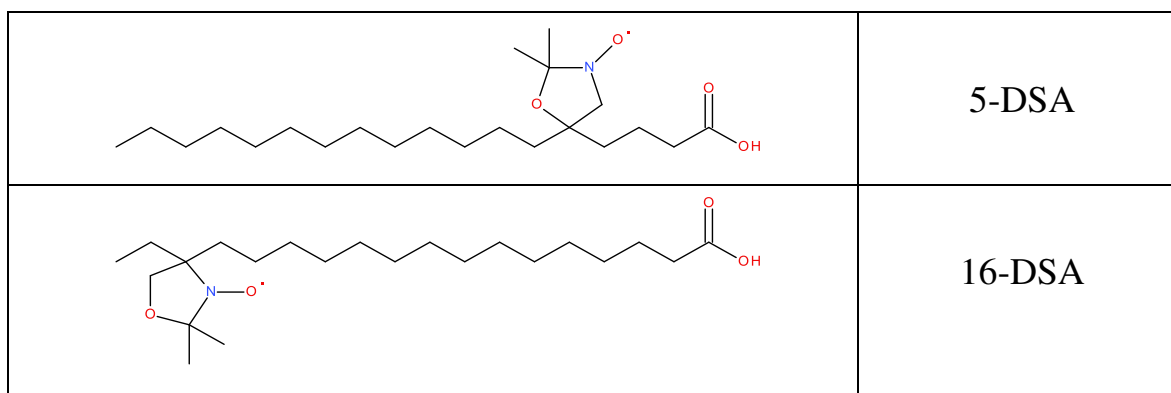


Рисунок 2.3. Структуры используемых в работе спин-меченых стеариновых кислот.

Стационарные спектры были записаны с использованием резонатора Bruker ER 4118X-MD5. От эффектов перемодуляции и насыщения в стационарных спектрах ЭПР избавлялись путем правильного выбора амплитуды модуляции и уровня СВЧ-мощности. Импульсные измерения проводились с использованием резонатора Bruker ER 4118X-MS3.

Для измерений ЭСЭ резонатор был пересвязан, чтобы обеспечить мертвое время сигнала  $\sim 100$  нс. В двухимпульсной и трехимпульсной СВЧ последовательностях ( $90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau - \text{эхо}$  и  $90^\circ - \tau - 90^\circ - T - 90^\circ - \text{эхо}$ ), длительности  $90^\circ$ - и  $180^\circ$ -градусных импульсов были 16 и 32 нс, соответственно. При исследовании скорости анизотропной релаксации временная задержка между импульсами  $\tau$  менялась от 120 нс с шагом 4 или 8 нс, при этом в трехимпульсных экспериментах время  $T$  выступало в качестве параметра и оставалось фиксированным в рамках одного эксперимента.

В экспериментах стимулированного эха по исследованию дейтерной модуляции использовалась трехимпульсная СВЧ последовательность ( $90^\circ - \tau - 90^\circ - T - 90^\circ - \text{эхо}$ ) с постоянной задержкой  $\tau$  (200 нс) и сканированием по времени  $T$  с шагом 16 нс. Сигнал был получен при значении поля, соответствующего максимуму эхо-детектированного спектра ЭПР.

## ГЛАВА 3. НЕКООПЕРАТИВНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДВИЖЕНИЯ НА ТВЕРДЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ

### 3.1. Описание задачи

Изучение стохастических либраций (см. п. 1.3.2) может быть использовано для получения информации о наноструктуре липидных бислоев, полимеров и ионных жидкостей, о природе динамических переходов в мембранах и белках, о молекулярных механизмах действия белков и пептидов, о внутренней гибкости молекул (см. п. 1.3.5). Движения молекулы во многом обусловлены матрицей, в которой она растворена. Таким образом, кооперативный эффект, возникающий при перестройке клетки, окружающей парамагнитную частицу может приводить к спаду ЭСЭ. Для более глубокого понимания молекулярных механизмов, определяющих этот тип движения, целесообразно поставить эксперименты, в которых могут проявляться только отдельные движения молекул. Кооперативные эффекты могут быть исключены для молекул, адсорбированных на неорганических поверхностях, например, диоксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в низких концентрациях.

В настоящей работе мы изучаем стохастические молекулярные либрации для различных типов спин-меченых молекул, адсорбированных на поверхности  $\text{SiO}_2$ . Было обнаружено, что спиновая релаксация, вызванная стохастическими либрациями на поверхности  $\text{SiO}_2$ , увеличивается с температурой, пока не достигает своего максимума. Значения полученных максимумов находятся в диапазоне от 1 до 2 мкс<sup>-1</sup> и зависят от типа молекулы. В рамках модели случайных прыжков между двумя близкими ориентациями [145] удалось объяснить особенности поведения температурных зависимостей скорости анизотропной релаксации для молекул, адсорбированных на поверхности. Учитывая особенности исследуемых молекул, удалось сделать выводы о связи



поведения температурной зависимости скорости анизотропной релаксации с типом стохастических либраций.

### 3.2. Образцы

В данной части работы изучалась подвижность спин-меченых молекул на поверхности диоксида кремния (порошок пирогенного кремнезема – коммерчески доступный продукт ЗАО «Полисорб», Челябинская область, РФ (размер частиц 20 нм, удельная поверхность 300 м<sup>2</sup>/г)). В качестве спин-меченых молекул были выбраны нитроксильные радикалы **I** - **III**, спин-меченые стеариновые кислоты (5-DSA и 16-DSA) и спин-меченые аналоги антимикробных пептидов: трихогин (nOct-Aib-Gly-Leu-**TOAC**<sup>4</sup>-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Lol), аламетицин (Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Glu(OMe)-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-**TOAC**<sup>16</sup>-Aib-Glu(OMe)-Glu(OMe)-Phe), тилопептин (Ac-Trp-Val-Aib-Aib-Ala-Gln-Ala-Aib-Ser-Aib-Ala-Leu-**TOAC**<sup>13</sup>-Gln-Lol). Спин-меченые аналоги антимикробных пептидов далее обозначаются TriTOAC<sup>4</sup>, AlaTOAC<sup>16</sup>, TyloTOAC<sup>13</sup>, соответственно.

Образцы были приготовлены Самойловой Р. И. Адсорбция проводилась путем помещения порошка диоксида кремния на поверхность фильтра Amicon Ultrafree-MC Durapore PVDF (Millipore, MA, США) и добавления раствора спин-меченного вещества в метаноле. После 30 мин адсорбции неадсорбированное вещество и растворитель удаляли центрифугированием (2000 об/мин, 4 мин, 20 °C). Образец сушили потоком аргона и помещали в ампулу из ЭПР-стекла диаметром 3 мм. Затем откачивали воздух (10<sup>-3</sup> торр) и ампулу запаивали.

### 3.3. Результаты

Стационарные спектры ЭПР были записаны при комнатной температуре и приведены на рис. 3.1 (данные для образцов **III**/SiO<sub>2</sub> и TriTOAC<sup>4</sup>/SiO<sub>2</sub> не приведены). Они соответствуют тем, которые обычно наблюдаются для

иммобилизованных нитроксильных радикалов. Исключением являются спектры для радикалов **I** и **II**, которые демонстрируют некоторую подвижность. Для всех остальных систем спектры на рис. 3.1 отражают анизотропную природу магнитных взаимодействий, определяющих форму линии ЭПР (анизотропию как  $g$ -фактора, так и сверхтонкого взаимодействия). Дополнительное уширение линий, указывающее на агрегацию молекул, не наблюдается ни в одном спектре. Также количества спин-меченных молекул, оцененные по интенсивности спектров ЭПР до и после адсорбции, были примерно одного порядка.

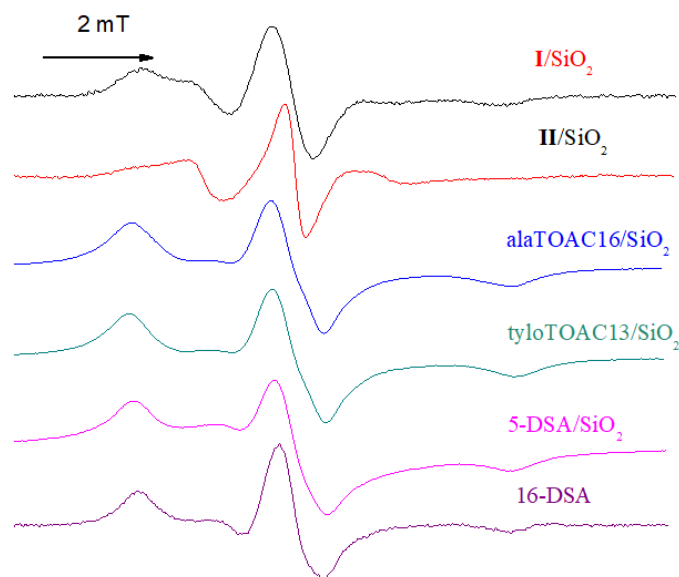


Рисунок 3.1. Стационарные спектры ЭПР при комнатной температуре спин-меченных молекул, адсорбированных на поверхности  $\text{SiO}_2$ .

Пример спадов ЭСЭ для образца  $\text{TriTOAC4/SiO}_2$  при 240 К в двух положениях по полю (в высокопольной (2) и центральной (1) компонентах, как указано на рис. 1.7), а также результат их деления приведены в полулогарифмической шкале на рис. 3.2. Линейная аппроксимация логарифма отношения спадов позволяет найти скорость анизотропной релаксации ( $\Delta W$ ). В данной работе аппроксимация проводилась для временного диапазона 0,24-0,92  $\mu\text{s}$  в шкале  $2\tau$ , как показано вертикальными пунктирными линиями на рисунке 3.2 б.

Значения  $\Delta W$  для образцов  $\text{TriTOAC4/SiO}_2$  и  $\text{III/SiO}_2$  приведены на рисунке

3.3. При низких температурах наблюдался отрицательный наклон логарифма отношения спадов ЭСЭ, что объясняется анизотропным вкладом мгновенной диффузии в спад ЭСЭ. Так как данный вклад не зависит от температуры, то его легко удалось учесть, сдвинув все точки для одного образца на одну величину так, что бы при 80 К (в отсутствие движений) наблюдалось нулевое значение наклона (скорости анизотропной релаксации).

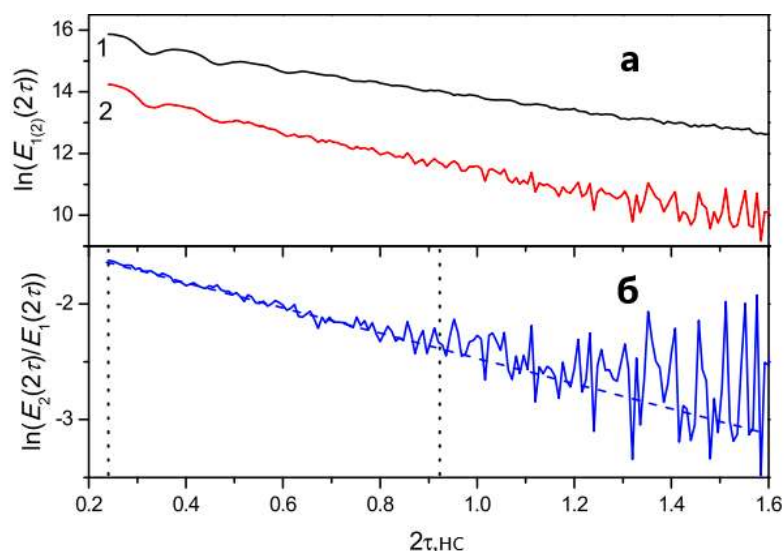


Рисунок 3.2. (а) В полулогарифмической шкале спады ЭСЭ в положениях по полю 1 и 2 (рис. 1.7) и (б) отношение этих спадов с показанным линейным приближением (пунктирная линия). Аппроксимация проведена во временном диапазоне, очерченном вертикальными пунктирными линиями; тангенс угла наклона дает значение  $\Delta W$ . Образец –  $\text{TiTOAC4/SiO}_2$  при 240 К.

При этом величина наклона при 80 К и тот факт, что уширение, свидетельствующее об агрегации спинов, не наблюдается в стационарных спектрах ЭПР, позволили найти локальную концентрацию спинов и оценить расстояние между ними, которое оказалось равным  $\sim 10$  нм, что существенно больше размера молекул. Из чего следует вывод, что молекулы на поверхности могут считаться разбавленными, то есть не взаимодействующими друг с другом.

Можно заметить (из рис. 3.3), что резкий рост температурной зависимости скорости анизотропной релаксации наблюдается примерно выше 130 К. Выше  $\sim 230$  К наблюдается насыщение температурной зависимости (постоянное значение скорости анизотропной релаксации) с незначительным падением выше  $\sim 250$  К. Данное поведение ранее не наблюдалось, поэтому была предпринята

попытка объяснить его в рамках модели случайных прыжков между двумя близкими ориентациями [145].

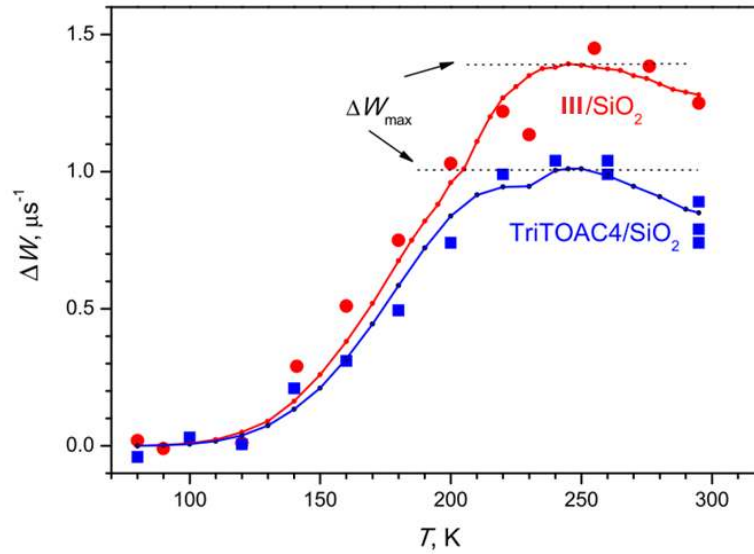


Рисунок 3.3. Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации  $\Delta W$  для образцов TriTOAC4/SiO<sub>2</sub> (квадраты) и III/SiO<sub>2</sub> (круги). Сплошные кривые: моделирование с использованием уравнения (6.1) с  $\tau_c = 65$  нс и  $\alpha = \exp(-1,94 - \frac{529 \text{ K}}{T})$  для образца III/SiO<sub>2</sub> и с  $\tau_c = 40$  нс и  $\alpha = \exp(-1,68 - \frac{523 \text{ K}}{T})$  для TriTOAC4/SiO<sub>2</sub>. Две горизонтальные пунктирные линии показывают достигнутые максимальные значения  $\Delta W_{\max}$ .

Важно отметить, что модель случайных прыжков между близкими ориентациями тоже относится к случаю стохастических молекулярных либраций. Отличием здесь является лишь конкретизация модели движения и снятие ограничений, связанных с применением теории Редфильда для описания спиновой релаксации (см. п. 1.3.4).

Моделирование в рамках данной модели было проведено с использованием формулы [145]:

$$E(2\tau) = \text{const} \left[ (chR\tau + \frac{w}{R} shR\tau)^2 - \frac{\Delta\omega^2}{4R^2} sh^2 R\tau \right] e^{-2w\tau}, \quad (3.1)$$

$$\text{где } w = \frac{1}{2\tau_c} \text{ и } R^2 = w^2 - \frac{\Delta\omega^2}{4}.$$

Можно заметить, что в случае быстрого движения  $\langle \Delta\omega^2 \rangle \tau_c^2 \ll 1$ , когда также  $\tau \gg \tau_c$ , уравнение (3.1) сводится к экспоненциальной зависимости  $E(2\tau) = \text{const} \cdot \exp(-2\tau\Delta\omega^2\tau_c)$ , что полностью согласуется с уравнениями (1.24) и (1.25). Однако

преимуществом этой модели является ее применимость к любому значению  $\langle \Delta\omega^2 \rangle \tau_c^2$ , то есть эта модель действительно не ограничивается условием быстрого движения, лежащим в основе теории спиновой релаксации Редфильда.

Эхо-детектированные спектры ЭПР моделировались с использованием формулы (3.1). Параметры тензора сверхтонкого взаимодействия и g-тензора оценивались по полученным спектрам стационарного ЭПР. Результаты моделирования представлены на рис. 3.4. В расчетах варьировались только два входных параметра,  $\tau_c$  и  $\alpha$ .

Расчетные кривые на рис. 3.4 при малых  $\alpha$  являются линейными и хорошо совпадают с предсказаниями уравнений (1.24) и (1.25), как и ожидалось в рамках теории Редфильда. Параметр  $R_x^2$  из уравнения (1.25) оказался равным  $1,9 \cdot 10^{17} \text{ рад}^{-2} \text{ с}^{-2}$ . При больших  $\alpha$  кривые становятся существенно нелинейными. Этот результат может быть связан с нарушением условия теории Редфильда  $\langle \Delta\omega^2 \rangle \tau_c^2 \ll 1$ . Действительно, для  $\tau_c=40 \text{ нс}$  на рис. 3.4 видно, что линейность искажается при 0,02 рад. Используя уравнения (1.24) и (1.25) получаем, что  $\langle \Delta\omega^2 \rangle \approx R_x^2 \alpha^2$ , поэтому линейность искажается при  $\langle \Delta\omega^2 \rangle \tau_c^2 \approx 0,1$ .

Однако во временном окне эксперимента ЭСЭ, показанном на рис. 3.4 двумя вертикальными пунктирными линиями, расчетные кривые можно аппроксимировать прямыми линиями с эффективным наклоном  $\Delta W_{\text{eff}}$ . Видно, что значение  $\Delta W_{\text{eff}}$  при изменении  $\alpha$  при заданном  $\tau_c$  достигает своего максимального значения  $\Delta W_{\text{eff}}$ . Эти значения представлены на рис. 3.5 как функция  $\tau_c$ . Сравнение расчетных данных, представленных на рис. 3.5, с найденными в экспериментах значениями  $\Delta W_{\text{eff}}$  (рис. 3.3) позволяет оценить углы переориентации  $\alpha$  и время корреляции  $\tau_c$  при температуре, при которой достигается максимум (250 К). Мы обнаружили, что для образца  $\text{III/SiO}_2$   $\alpha=0,02 \text{ рад}$  и  $\tau_c=65 \text{ нс}$ , а для образца  $\text{TrIIOAC4/SiO}_2$   $\alpha=0,02 \text{ рад}$  и  $\tau_c=40 \text{ нс}$ . Для двух данных случаев было проведено моделирование при постоянном  $\tau_c$  и  $\alpha$ , меняющимся по Аррениусовскому закону, во всем экспериментальном температурном диапазоне. Результаты моделирования представлены на рис. 3.4 в виде сплошных линий.

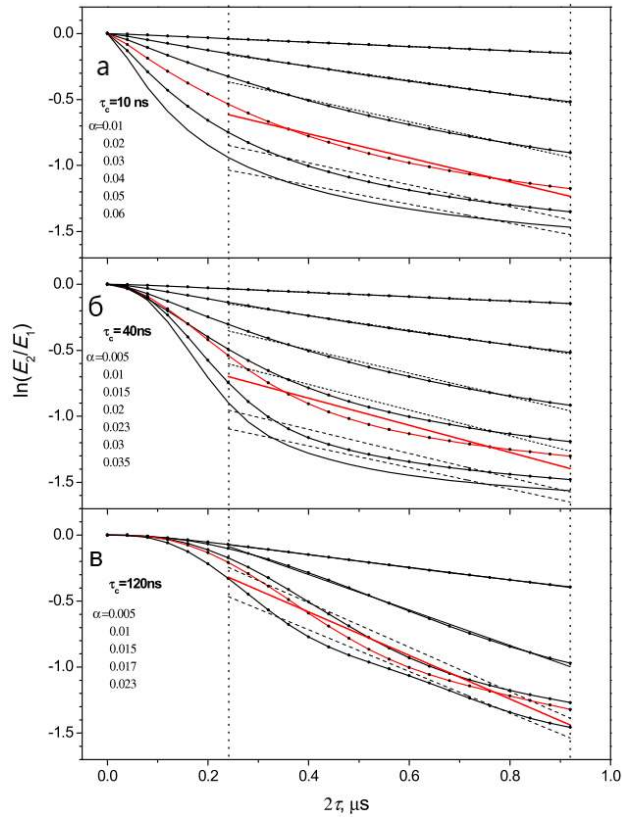


Рисунок 3.4. Полученные в результате моделирования в рамках модели прыжков между двумя близкими ориентациями отношения спадов в двух положениях спектра (1 и 2). Данные приведены в полупологарифмической шкале для трех времен корреляции и различных углов  $\alpha$ , указанных в порядке увеличения начального наклона. Вертикальными пунктирными линиями обозначен временной диапазон, в котором проводилась аппроксимация. Пунктирные наклонные прямые линии - линейная аппроксимация; сплошными прямыми линиями обозначен максимальный наклон, достигаемый для данного  $\tau_c$ .

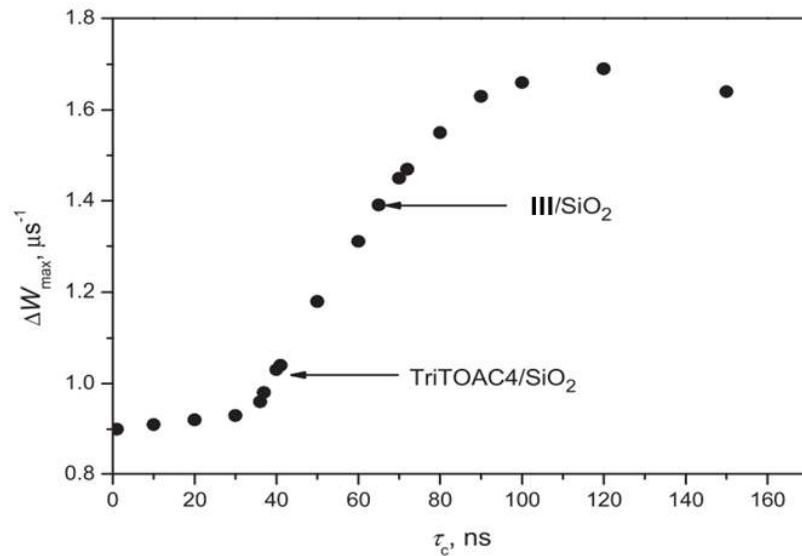


Рисунок 3.5. Расчетная зависимость максимальной скорости анизотропной релаксации от времени корреляции в рамках модели прыжков между двумя близкими ориентациями. Две горизонтальные стрелки указывают на две экспериментальные ситуации, представленные на рис. 3.2.

Необходимо отметить, что моделирование проводилось для ориентационного движения относительно одной из осей. Чтобы получить скорость анизотропной релаксации в случае ориентационных движений относительно двух независимых осей ( $x$  и  $y$ , так как ориентационные движения относительно оси  $z$  не дают вклада в скорость анизотропной релаксации), приведенные на рис. 3.5 значения должны быть помножены на 2. Однако из рис. 3.3 и 3.5 видно, что  $\Delta W_{\text{eff}}$  максимальное для обоих образцов не достигается в случае движения относительно двух независимых осей.

На рис. 3.6 показано сравнение спектров ЭД ЭПР, полученных при использовании двухимпульсной ( $2\tau=0,24$  мкс) и трехимпульсной ( $2\tau=0,24$  мкс,  $T=2$  мкс) последовательностей при комнатной температуре. Видно, что эти два спектра совпадают с хорошей точностью. Этот результат означает, что время корреляции действительно лежит в наносекундной шкале, так как на стимулированное эхо влияет движение только тогда, когда временной интервал  $T$  меньше или сравним с  $\tau_c$  [115; 140].

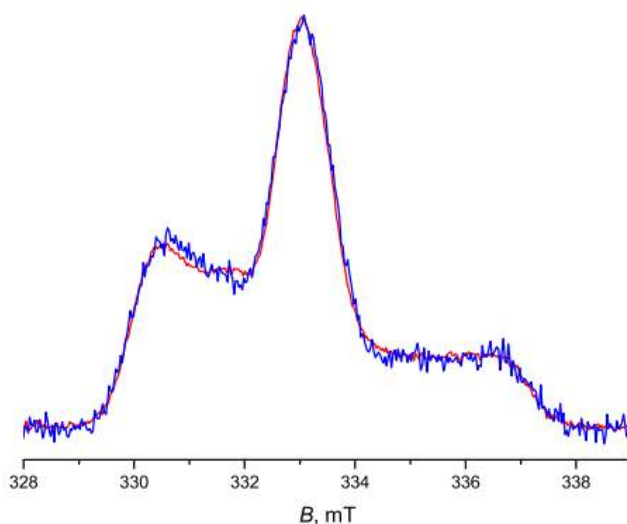


Рисунок 3.6. Спектры ЭД-ЭПР для образца TrTiOAC4/SiO<sub>2</sub>, полученные при комнатной температуре с использованием двухимпульсной микроволновой последовательности ( $2\tau=0,24$  мкс) (плавная линия) и трехимпульсной микроволновой последовательности ( $2\tau=0,24$  мкс,  $T=2$  мкс) (зашумленная линия), нормированные на центральный пик.

Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации для остальных шести образцов приведены на рис. 3.7. Интересно, что  $\Delta W$  начинает

расти выше 100 К для 5-DSA/SiO<sub>2</sub> и выше ~130 К для всех остальных образцов. Выше ~200 К рост  $\Delta W$  замедляется до тех пор, пока не будет достигнуто плато примерно при 250 К, с последующей тенденцией к уменьшению  $\Delta W$ . Максимальное значение  $\Delta W$ , наблюдаемое для I/SiO<sub>2</sub>, II/SiO<sub>2</sub>, alaTOAC16/SiO<sub>2</sub> и tyloTOAC13/SiO<sub>2</sub>, составляет около 1 мкс<sup>-1</sup> (рис. 3.7 а, б). Максимальные значения  $\Delta W$  для 16-DSA/SiO<sub>2</sub> и 5-DSA/SiO<sub>2</sub> составляют примерно  $2 \pm 0,05$  и  $1,5 \pm 0,1$  мкс<sup>-1</sup> соответственно (рис. 3.7 в).

Пунктирные линии, проведенные на рис. 3.7, представляют собой линейные аппроксимации данных при низких температурах и на участке, где происходит рост  $\Delta W$  вплоть до плато. Пересечения этих линий позволяют получить начальную температуру  $T_0$ , а именно начальную температуру для молекулярного движения в этом эксперименте. Видно, что  $T_0$  составляет около 100 К для образца 5-DSA/SiO<sub>2</sub> и находится между 125 и 135 К для всех остальных систем.

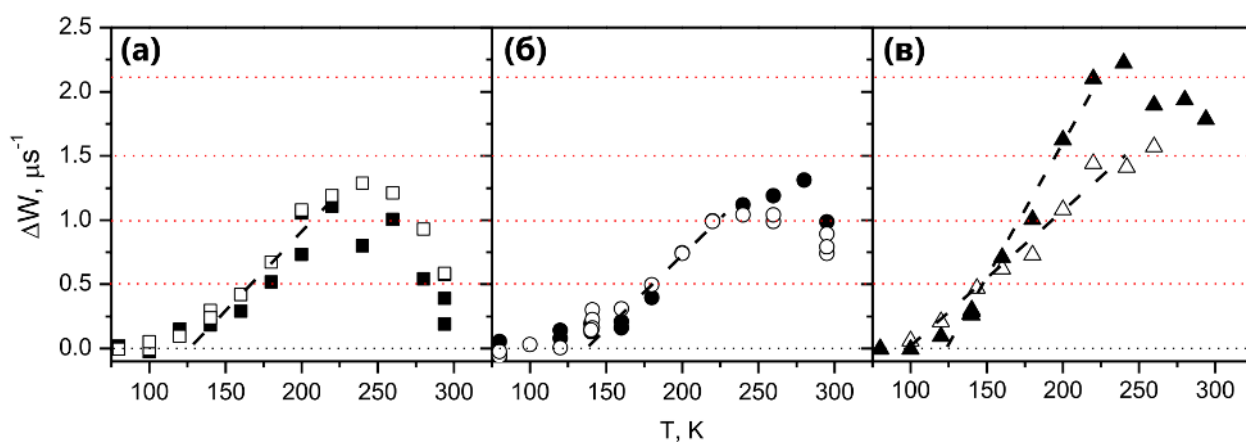


Рисунок 3.7. Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации  $\Delta W$  для образцов: а) I (ТЕМПО)/SiO<sub>2</sub> (светлые квадраты), II/SiO<sub>2</sub> (закрашенные квадраты); б) alaTOAC16/SiO<sub>2</sub> (закрашенные кружки) и tyloTOAC13/SiO<sub>2</sub> (светлые кружки); в) для 16-DSA/SiO<sub>2</sub> (закрашенные треугольники) и 5-DSA/SiO<sub>2</sub> (светлые треугольники).

### 3.4. Обсуждение

Стационарные спектры ЭПР при комнатной температуре (рис. 3.1) для I/SiO<sub>2</sub> и II/SiO<sub>2</sub> соответствуют стационарным спектрам нитроксильных радикалов, демонстрирующих подвижность со временем корреляции, к которым



чувствителен стационарный ЭПР. Эта подвижность может быть объяснена относительно слабой связью между нитроксильными радикалами и поверхностью. То есть, судя по стационарным спектрам ЭПР, данные радикалы начинают испытывать свободное вращение, которое может приводить к резкому падению скорости анизотропной релаксации вблизи комнатной температуры, что наблюдается на рис. 3.7а.

Спады ЭСЭ, измеренные в широком диапазоне температур, были успешно смоделированы с использованием простой модели [145] случайных скачков на углы  $\pm \alpha$  вокруг оси, лежащей в плоскости  $xu$  каркаса молекулы. Это упрощение реальной стохастической динамики либраций продуктивно для воспроизведения спадов ЭСЭ для произвольных углов  $\alpha$  и времен корреляции  $\tau_c$ . В случае быстрых движений [ $\langle \Delta\omega^2 \rangle \tau_c^2 \ll 1$ ], смоделированный спад ЭСЭ сводится к экспоненциальной зависимости  $E(2\tau) = \exp(-2\tau\Delta W)$ , где  $\Delta W = \Delta\omega^2 \tau_c$ . Этот результат согласуется с результатом, полученным с помощью модели стохастических либраций [115; 118; 120; 124; 139]. Однако при больших  $\Delta\omega$  значение  $\Delta W$  в модели прыжков между двумя состояниями достигает максимума, не зависящего от  $\alpha$ . Таким образом, расчеты объясняют экспериментальное поведение температурной зависимости  $\Delta W$  при насыщении. Также было достигнуто количественное согласие с экспериментальными данными (рис. 3.3).

Обнаруженная здесь температурная зависимость  $\Delta W$  (рис. 3.3 и 3.7) выходит на плато, при этом  $\Delta W_{\max} \approx 1 \text{ мкс}^{-1}$  для нитроксильных радикалов **I** и **II**, и для всех трех пептидов, адсорбированных на поверхности,  $\Delta W_{\max} \approx 1,5 \text{ мкс}^{-1}$  для **I/SiO<sub>2</sub>** и **5-DSA/SiO<sub>2</sub>** и  $\approx 2 \text{ мкс}^{-1}$  для **16-DSA/SiO<sub>2</sub>**.

Результаты моделирования показали, что предельное значение  $\Delta W_{\max} \approx 1 \text{ мкс}^{-1}$  воспроизводится моделью одноосных либраций вокруг оси, лежащей в плоскости  $xu$  каркаса молекулы нитроксильного радикала. Если предположить, что либрации могут происходить независимо вокруг двух разных осей, то скорости релаксации, вызванные этими двумя типами движения, следует умножить, что означает, что  $\Delta W_{\max} \approx 2 \text{ мкс}^{-1}$ . Это объясняет наблюдаемые здесь

данные для системы 16-DSA/SiO<sub>2</sub> (рис. 3.7 в). Интересно, что расчетное значение  $\Delta W_{\max} \approx 2 \text{ мкс}^{-1}$  может быть достигнуто при временах корреляции больше 100 нс. Однако оценки времени корреляции для либрационного движения, обнаруженного ЭСЭ [118; 122; 125], показывают, что  $\tau_c$  находится в наносекундном масштабе времени, поэтому такая возможность может быть исключена.

16-DSA, скорее всего, связан с поверхностью SiO<sub>2</sub> через свою карбоксильную группу и нитроксильный фрагмент на другом конце молекулы. Длинный алифатический хвост при низких температурах обладает протяженной транс-конформацией, по крайней мере, вблизи спиновой метки. Алифатический хвост из-за его длины и относительно слабой адсорбции, может свободно перемещаться в двух направлениях, перпендикулярных своей оси. Ожидается, что под действием этого движения нитроксильный радикал будет совершать независимые движения также вокруг двух осей в плоскости ху молекулярной системы координат (двухосная либрация); или плоская либрация внутри конуса [146].

Для молекулы 5-DSA, связанной с поверхностью SiO<sub>2</sub>, могут возникать некоторые ограничения на это двухосное движение из-за близости нитроксильного фрагмента к высокополярной карбоксильной группе, которая, как ожидается, будет сильно связана с поверхностью. Таким образом, найденное здесь  $\Delta W_{\max} \approx 1,5 \text{ мкс}^{-1}$  можно объяснить как промежуточную ситуацию между одноосным и двухосным движениями. В этом отношении структура **III** (рис. 2.1) похожа на структуру 5-DSA (рис. 2.3); это структурное сходство объясняет близкое значение  $\Delta W_{\max} \approx 1,5 \text{ мкс}^{-1}$ , наблюдаемое для **III**/SiO<sub>2</sub> и 5-DSA/SiO<sub>2</sub>.

Можно заметить, что на рис. 3.3 и 3.7 все системы можно разделить на два типа: системы, в которых движения начинаются при  $\sim 100 \text{ К}$  и при  $\sim 130 \text{ К}$ . Интересно отметить, что литературные данные также свидетельствуют о том, что в зависимости от системы стохастические либрации, обнаруженные ЭСЭ, проявляются либо около 100 К, либо около 130 К. Случай  $T_0 \approx 100 \text{ К}$  был обнаружен для спин-меченых стеариновых кислот, взаимодействующих с

мембранным Na, K-насосом [121], для спин-меченных фосфолипидов в бислое DPPC/холестерин (50:50 мол.%) [118], для антимикробного пептида аламетицина, спин-меченного в положениях 8 и 16 аминокислотной последовательности и связанного с фосфолипидным бислоем [125], для замороженных ионных жидкостей [129; 131] (здесь движения появляются между 80 и 100 К), для спин-меченных молекул в бислое, образованном ненасыщенными фосфолипидами [124]. Случай  $T_0 \approx 130$  К был обнаружен для спин-меченных молекул в бислоях полностью насыщенных фосфолипидов [122], для антимикробного пептида аламетицина, спин-меченного в положении 1 и связанного с фосфолипидным бислоем [125].

На рисунке 3.8 показано схематическое представление типов движения, которые могут появиться для изучаемых здесь систем. Либрационные движения связанных с поверхностью молекул могут быть двух типов: изгибные и крутильные (торсионные) [147]; оба типа могут быть одноосными или двухосными. Для нитроксильных радикалов **I** и **II** ожидается только одноосное изгибное движение относительно их связей с поверхностью из-за ограничений, налагаемых анизотропией связывающего потенциала. Для спин-меченных пептидов может появиться одноосное изгибающее движение относительно пептидных связей. В случаях нитроксильного радикала **III**, 5-DSA и 16-DSA метка может выполнять двухосное изгибающее движение из-за гибкости длинного алифатического хвоста (с некоторыми ограничениями в случае **III** и 5-DSA). А 5-DSA отличается от всех остальных наличием свободного алифатического хвоста, который может совершать крутильные движения (в случае радикала **III** хвоста два, что, вероятно, мешает вращению). Влияние крутильного движения на движение спиновой метки может объяснить, почему для системы 5-DSA/SiO<sub>2</sub>  $T_0 \approx 100$  К, в то время как во всех остальных системах  $T_0 \approx 130$  К: для этих систем преобладают изгибные движения, так как торсионные затухают.

Гипотеза о преобладании крутильных или изгибных движений может быть подтверждена данными комбинационного рассеяния для бислоев, состоящих из

ненасыщенных и насыщенных фосфолипидов [99]. В самом деле, ожидается, что крутильные движения липидных алифатических хвостов будут связаны с антисимметричным колебанием группы Н-С-Н в этих хвостах из-за той же локальной симметрии для обоих типов этих движений. Данные комбинационного рассеяния для антисимметричного колебания группы Н-С-Н [99] показывают, что для ненасыщенных липидов уширение линии начинается около  $\sim 100$  К, в то время как для насыщенных липидов уширение линии начинается при гораздо более высоких температурах (около 170 К). Это наблюдение может быть объяснено более рыхлой липидной упаковкой в первом случае, что позволяет крутильным движениям развиваться вдоль алифатической цепи, тогда как во втором случае кручение может подавляться из-за более плотной упаковки.

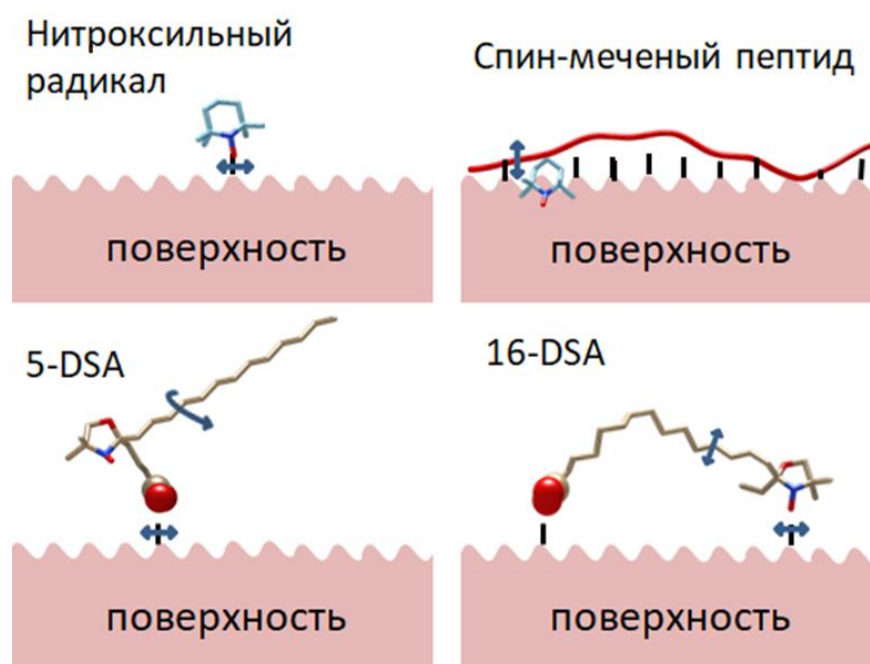


Рисунок 3.8. Схематическое изображение различных типов движений, испытываемых спиновыми метками: одноосные изгибные движения для нитроксильных радикалов I и II и для спин-меченного пептида alaTOAC16, двухосные изгибные движения для 5-DSA и 16-DSA. В случае 5-DSA на движение спиновой метки может влиять крутильное движение свободного алифатического хвоста.

### 3.5. Заключение к главе 3

Изучение движений, обнаруженных ЭСЭ, для спин-меченных молекул,

адсорбированных на твердой поверхности, позволяет уточнить вклад отдельных некооперативных движений. Результаты исследований, проведенных в настоящей работе, показывают, что максимальная скорость спиновой релаксации, наблюдаемая в распадах ЭСЭ, увеличивается для очень гибких молекул, таких как стеариновая кислота. Это увеличение скорости было интерпретировано как результат появления двухосного (или плоского) движения вместо одноосного движения, характерного для более жестких молекул.

Полученные здесь результаты также предполагают, что начало обнаруженных методом ЭСЭ либрационных движений имеет место около 130 К для систем, в которых можно ожидать только изгибные движения. В то же время, если молекулы имеют достаточную длину и межмолекулярную свободу для крутильного движения, либрации появляются уже при температуре около 100 К. В целом, полученные данные могут помочь при анализе стохастических молекулярных либраций, обнаруженных ЭСЭ, в замороженных биологических средах, замороженных ионных жидкостях, полимерах и других молекулярных твердых телах.

## Глава 4. ЛИПИДНЫЕ БИСЛОИ DPPC И POPC В ГЕЛЕВОЙ ФАЗЕ

### 4.1. Описание задачи

Низкотемпературные движения в биологических средах являются объектом интенсивных исследований. Так, например, методами рассеяния нейтронов и мессбауэровской адсорбции для молекулярных стекол и биологических объектов был обнаружен динамический переход вблизи 170-230 К – резкий рост подвижности атомов, обусловленный появлением стохастических движений или ангармоническими колебаниями (см. п. 1.2.2). Также была обнаружена корреляция динамического перехода и биохимической активностью для некоторых биологических систем. Механизм данного явления, несмотря на интенсивные исследования, до сих пор не изучен.

Метод импульсного ЭПР позволяет исследовать стохастические либрации парамагнитных молекул в наносекундном (см. п. 1.3.5) и микросекундном временных диапазонах (см. п. 1.3.6). Исследование малоамплитудных стохастических либраций также зарекомендовало себя как структурный метод при исследовании мембран [99], где было показано, что для мембраны с более разупорядоченной структурой наблюдается большая подвижность (см. п. 1.3.5). В данной работе проведено подробное сравнительное исследование низкотемпературной стохастической подвижности для липидных бислоев DPPC и POPC, что позволяет связать особенности поведения температурной зависимости скорости анизотропной релаксации со степенью упорядоченности липидного бислоя. В качестве спиновых зондов были выбраны молекулы, занимающие различные положения по глубине в бислое, что позволяет делать выводы о влиянии кооперативных эффектов на стохастические движения парамагнитных центров.

## 4.2. Образцы

В качестве спиновых зондов использовались молекулы спин-меченого липида T-PCSL, 5-DSA и спин-меченого аналога пептида трихогина (Fmoc-TOAC<sup>1</sup>-Gly-Leu-Aib<sup>4</sup>-Gly-Gly-Leu-Aib<sup>8</sup>-Gly-Ile-Leu-OMe), далее именуемого TriTOAC1.

Спин-меченые молекулы (TriTOAC1, 5-DSA и T-PCSL) совместно растворяли с фосфолипидами (DPPC и POPC) в 2,2,2-трифторэтанол. Молярные соотношения TriTOAC1/POPC и TriTOAC1/DPPC составляли 1:250 в обоих случаях, тогда как молярные соотношения 5-DSA/DPPC и T-PCSL/DPPC были 1:100 в обоих случаях. Затем растворитель осторожно удаляли потоком газообразного азота. Все образцы помещали в вакуум на 24 ч. Затем полученные пленки гидратировали в избытке воды при перемешивании на Bio Vortex V-1 (Biosan, Латвия). Образцы с POPC гидратировались при температуре около 5 °C в течение 12 ч, образцы с DPPC гидратировали в течение 4 часов при примерно 56 °C, затем хранили при примерно 5 °C в течение 12 часов и при -5 °C в течение 12 часов, соответственно. Затем гидратированные образцы концентрировали центрифугированием. Конечное количество воды было приблизительно равно количеству липидов по массе. Таким образом, были приготовлены четыре образца с многослойными везикулами TriTOAC1/DPPC, TriTOAC1/POPC, 5-DSA/DPPC и T-PCSL/DPPC. Кроме того, образец T-PCSL/DPPC/D<sub>2</sub>O был приготовлен путем гидратации пленки D<sub>2</sub>O. Сухой образец 5-DSA/DPPC получали перетирированием смеси 5-DSA и DPPC в порошок с дополнительной сушкой в течение 24 ч в эксикаторе над гидроксидом калия. В конечном итоге все образцы были запаяны в стеклянных ампулах и заморожены в жидком азоте.

### 4.3. Результаты

На рис. 4.1 приведен пример спада ЭСЭ в трехимпульсном эксперименте в двух положениях по полю (указаны стрелками на вставке к рис. 4.1а). Видно, что затухание эха действительно происходит быстрее для высокопольной компоненты. Сравнение спада эха в высокопольной и центральной компоненте эхо-детектированного спектра ЭПР позволяет получить вклад ориентационного движения (и вклада «мгновенной диффузии» [139], который, однако, не зависит от температуры и, следовательно, может быть легко исключен).

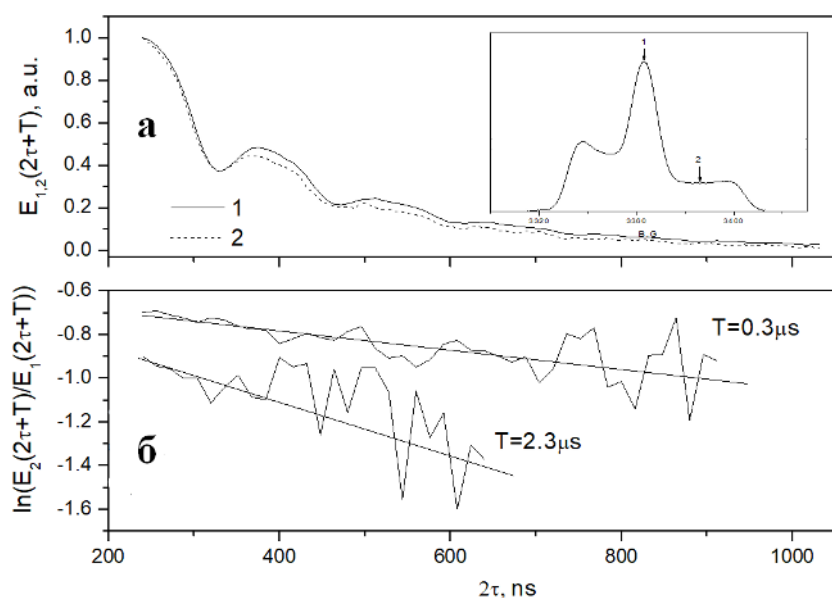


Рисунок 4.1. (а) Спад спинового эха в двух положениях по полю, 1 и 2, показанных на вставке. (б) Полугарифмический график отношения спадов в положениях 1 и 2, для временных задержек  $T = 0,3$  и  $2,3$  мкс. Прямые линии – линейная аппроксимация. Кривые смещены по вертикальной оси для лучшей наглядности. Образец - бислой TriTOAC1/DPPC, температура 180 К.

Спады сигналов двухимпульсного ЭСЭ были получены в интервале температур 80–216 К (выше 220 К спад эха был слишком быстрым для наблюдения сигнала). Полученные значения  $\Delta W_{2-p}$  (см. формулу (1.25)) представлены как функция температуры на рис. 4.2 для образцов TriTOAC1/POPC, TriTOAC1/DPPC и T-PCSL/DPPC. На рис. 4.3 представлены аналогичные данные для модельной мембраны 5-DSA/DPPC и для сухой смеси 5-DSA/DPPC. Данные для модельной мембраны 5-DSA/DPPC (рис. 4.3) согласуются



результатами [99; 120], которые были получены ранее с большим температурным шагом. Из рис. 4.2 и 4.3 видно резкое увеличение температурных зависимостей  $\Delta W_{2-p}$  - оно начинается при  $\sim 130$  К и становится выраженным выше 170–180 К. Между тем для сухого образца (рис. 4.3) рост значительно слабее.

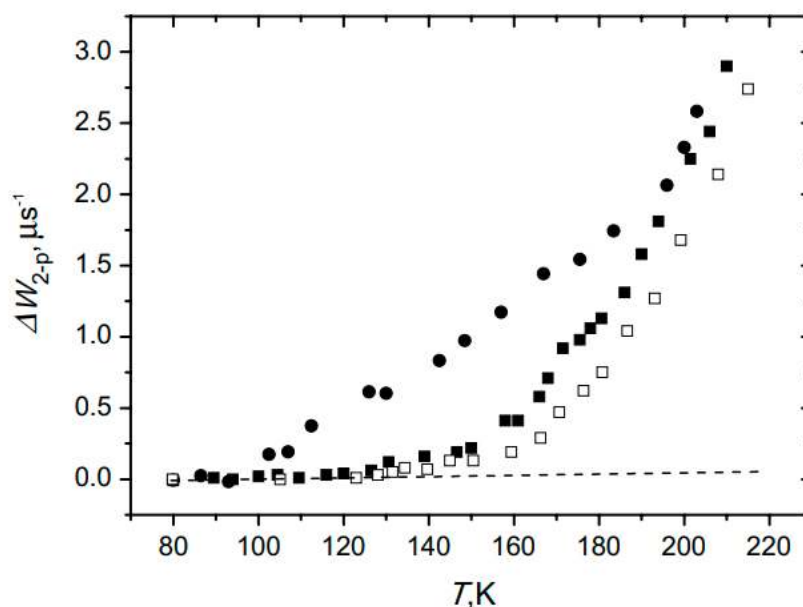


Рисунок 4.2. Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации в двухимпульсных экспериментах для TgTOAC1/POPC (закрашенные круги), TgTOAC1/DPPC (закрашенные квадраты) и T-PCSL/DPPC (пустые квадраты). Пунктирная линия - экстраполяция низкотемпературных данных.

Для бислоя POPC (рис. 4.2) стоит отметить резкое увеличение  $\Delta W_{2-p}$  выше 100 К и выше 180 К (этот результат согласуется с ранее опубликованным в [99]). Необходимо отметить, что  $\Delta W_{2-p}$  должно быть равно  $\Delta W_{3-p}(0)$ , что действительно наблюдалось в наших экспериментах (данные не показаны).

В данной работе все температурные зависимости были получены в режиме повышения температуры. Один эксперимент с бислоем 5-DSA/DPPC был проведен при снижении температуры: температура понижалась после прогрева до 200 К. Эти данные также приведены на рис. 4.3, видно, что скорость анизотропной релаксации не зависит от того охлаждался ли образец или нагревался.

Трехимпульсные спады эха были получены в интервале температур 80–212К с изменением параметра  $T$  от 0,3 до 4 мкс. Данные  $\Delta W_{3-p}(T)$  (см. формулу (1.27)), полученные для бислоя TriTOAC1/POPC, показаны на рис. 4.4. Ясно, что зависимость  $\Delta W_{3-p}(T)$  от временной задержки  $T$  может быть хорошо аппроксимирована прямыми линиями, что согласуется с формулами (1.26) и (1.27). Ниже  $\sim 170$ – $180$  К аппроксимирующие линии для бислоев DPPC и POPC имеют очень малые или даже нулевые наклоны. Для бислоев TriTOAC1/DPPC и 5-DSA/DPPC трехимпульсные эксперименты аналогичным образом показали увеличение наклонов, начиная выше  $170$ – $180$  К (данные не приведены).

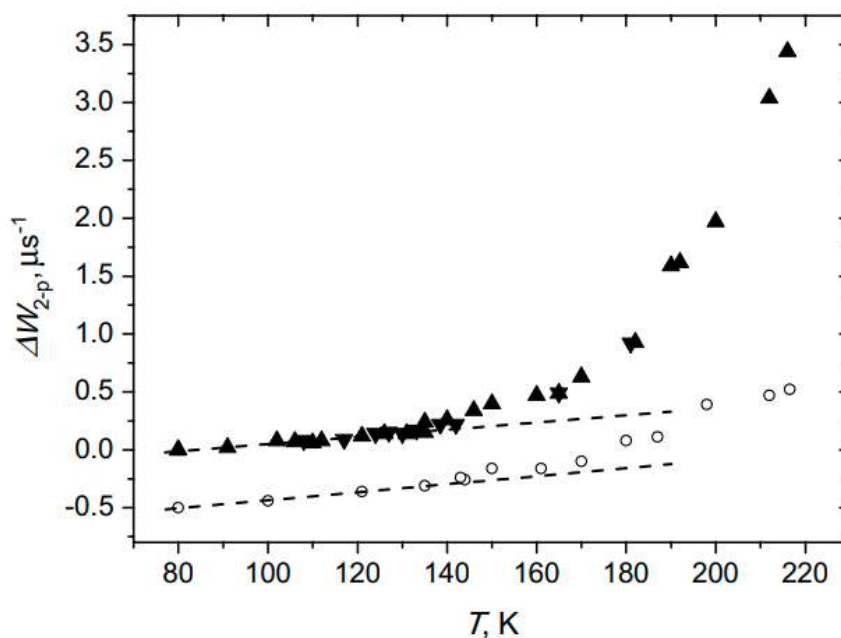


Рисунок 4.3. Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации в двухимпульсных экспериментах для 5-DSA/DPPC (треугольники вверх: температура увеличивается, треугольники вниз: температура снижается) и сухой смеси 5-DSA/DPPC (светлые кружки, данные сдвинуты вниз). Пунктирные линии - экстраполяция низкотемпературных данных.

Методом ESEEM изучалось движение молекул воды в гидратной оболочке бислоя. Анализ полученных в  $D_2O$ -гидратированных бислоях данных включал преобразование Фурье первоначально обнаруженных временных сигналов огибающей стимулированного спинового эха, как это описано в [136]. На рис. 4.5 показаны частотные спектры огибающей стимулированного спинового эха, записанные для бислоев T-PCSL/DPPC/ $D_2O$  при трех различных температурах.

Пик на частоте 2,2 МГц возникает из-за сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона спиновой метки с дейтериями матрицы, расположенными на расстояниях от 0,5 до 1 нм [148] (2,2 МГц - ларморовская частота ядер дейтерия в X диапазоне спектрометра ЭПР).

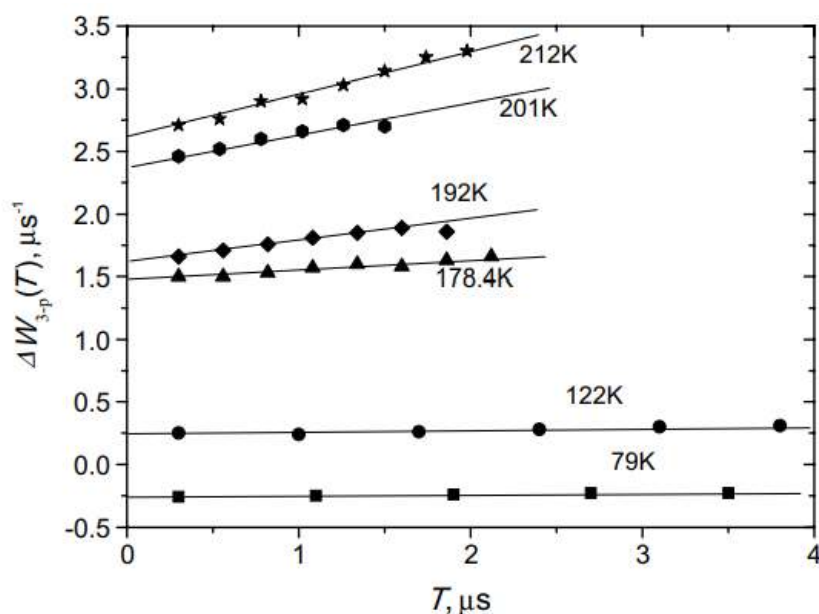


Рисунок 4.4. Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации в трехимпульсных экспериментах для бислоя TгiTOAC1/POPC. Прямые линии показывают, что данные могут быть аппроксимированы линейными зависимостями, предсказываемыми уравнениями (1.26), (1.27).

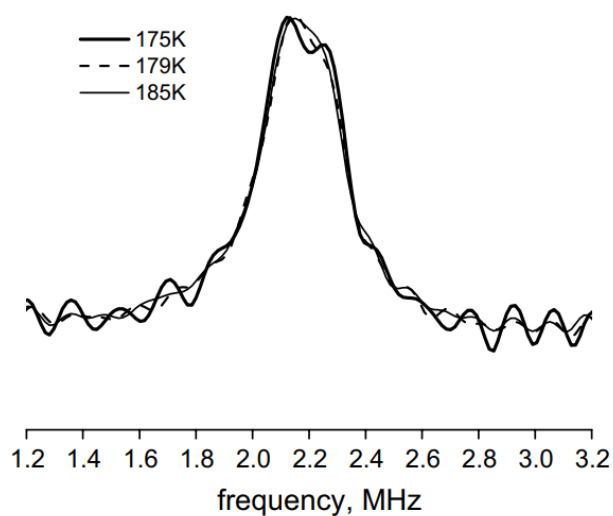


Рисунок 4.5. Модульные Фурье преобразования огибающей стимулированного спинового эха для бислоев TгiTOAC1/DRPC/D2O при различных температурах.

Изменение спектров не было замечено ниже 175 К и выше 185 К. Дублетное расщепление, наблюдаемое при 175 К на рис. 4.5, вызвано анизотропным ядерным квадрупольным взаимодействием с ядром дейтерия. В этом отношении частотные спектры модуляции огибающей стимулированного спинового эха можно назвать «ЯМР-подобными спектрами» [135; 136]. Анизотропия усредняется, если молекула движется со скоростью больше  $10^5 \text{ с}^{-1}$  [135; 136]. Тогда исчезновение дублета, наблюдаемого при температуре выше 179 К на рис. 4.5, можно смело приписать началу общего движения молекул воды со скоростью  $10^5 \text{ с}^{-1}$  и более (в [136] был сделан аналогичный вывод, но для несколько большего интервала температур).

#### 4.4. Обсуждение

На рис. 4.2 и 4.3 видно ускорение температурной зависимости  $\Delta W_{2-p}$ , начиная с 130 К для молекул спин-меченых стеариновых кислот и пептидов в модельной мембране из полностью насыщенных липидов DPPC. Данный факт, в соответствии с результатами предыдущей главы можно интерпретировать как результат проявления изгибных колебаний в этих бисоях. В мембране же из ненасыщенных липидов POPC ускорение температурной зависимости  $\Delta W_{2-p}$  наблюдается начиная с температуры 100 К, что в свою очередь можно связать с появлением крутильных колебаний.

Примечательно, что данные по рассеянию нейтронов на бислое полностью насыщенных липидов DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) [65], а также на пурпурных мембранах [65; 78] для среднеквадратичного отклонения  $\langle x^2 \rangle$  также демонстрируют перегиб при  $\sim 130 \text{ К}$ , с дальнейшим ускорением температурной зависимости  $\langle x^2 \rangle$ . Таким образом, можно предположить, что температурная зависимость  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  на рис. 4.6 также может быть объяснена проявлением динамического перехода, наблюдаемого в рассеянии нейтронов.

Согласно (1.24) и (1.25) скорость двухимпульсных спадов ЭСЭ позволяет получить параметр движения  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  из скорости спиновой релаксации  $\Delta W_{2-p}$ . Данные  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$ , пересчитанные таким образом из значений  $\Delta W_{2-p}$ , представлены для бислюа 5-DSA/DPPC на рис. 4.6. Видно, что  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  подчиняется температурной зависимости аррениусовского типа, как показано на рис. 4.6. Сплошная линия проведена здесь через экспериментальные точки.

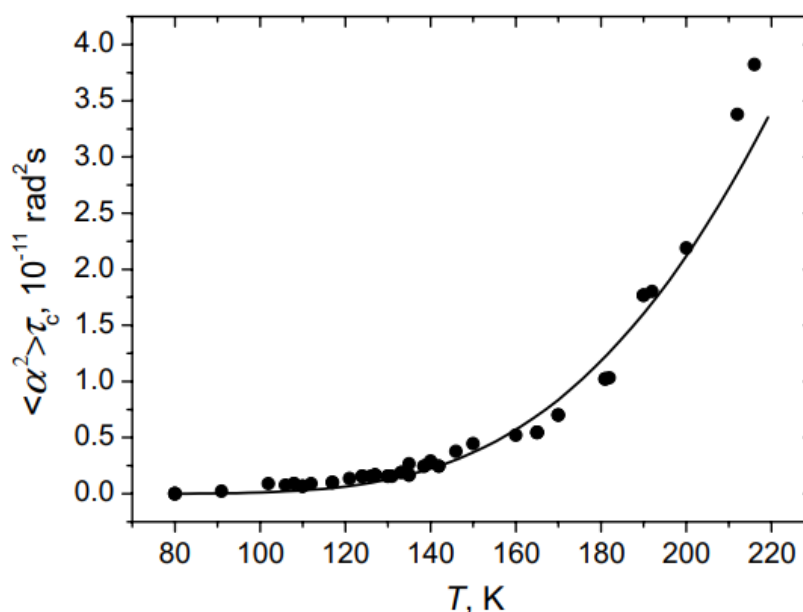


Рисунок 4.6. Значения  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  для бислюев 5-DSA/DPPC пересчитаны из данных на рис. 4.3 с использованием уравнений (30) и (31); сплошная линия - приближение в рамках закона Аррениуса,  $\exp(6,00-1050 \text{ K/T})$ .

В рамках данного эксперимента разделение  $\langle \alpha^2 \rangle$  и  $\tau_c$  не представляется возможным. Казалось бы, что можно использовать подход для оценки  $\langle \alpha^2 \rangle$  и  $\tau_c$  по отдельности, который основан на уменьшении с температурой расщепления линий в стационарных спектрах ЭПР [118; 122; 125]. Однако на данные формы линий может оказывать влияние полярность матрицы (которая может изменяться в зависимости от температуры), также данные будут содержать информацию о гармонических либрациях (которые не проявляются в спиновой релаксации). Тем не менее, результаты, представленные в [118; 122; 125] для спин-меченных биологических мембран также предоставляют значения  $\tau_c$  в субнаносекундном временном диапазоне, которые аналогичны оценкам здесь по рамановскому

рассеянию. Аррениусовское поведение  $\langle \alpha^2 \rangle$  было замечено в [122], для двух типов спин-меченных липидов в бислое DPPC с энергиями активации, равной  $15,0 \pm 1,5$  кДж/моль и  $13,0 \pm 0,3$  кДж/моль.

Аррениусовскую температурную зависимость можно объяснить в рамках простой модели затрудненной переориентации молекулы между двумя узлами с неравной вероятностью и разной степенью вырождения. Тогда потенциальная энергетическая щель между узлами соответствовала бы энергии активации в температурной зависимости  $\langle \alpha^2 \rangle$ , предэкспоненциальный фактор - их относительной вырожденности, в то время как вероятность преодоления разделяющего барьера приведет к поведению Аррениусовскому поведению  $\tau_c$ .

Это объяснение позволяет предположить, что динамический переход в биологических средах происходит из-за прохождения системой через энергетический ландшафт, существующий для переориентаций молекул в биологических средах. Концепция энергетического ландшафта широко обсуждается в связи с явлением динамического перехода, наблюдаемым при рассеянии нейтронов [60; 77; 149]. В работах [150; 151] комбинация рассеяния нейтронов и МД-моделирования показала, что атомы белка совершают ограниченные движения, которые можно разделить на три класса: локализованная диффузия, вращение метильных групп и скачки между потенциальными ямами [150; 151]. Наша модель аналогична третьей модели. Результаты, полученные в данной работе и в [122] свидетельствуют о том, что эти барьеры возникают для молекулярных переориентаций, и что эти барьеры приблизительно составляют 10–20 кДж/моль.

Исследование ЭСЭ спин-меченного лизоцима (предыдущая глава) показало изгиб температурной зависимости  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  вблизи 130 К. Такое поведение вблизи 130 К было также замечено в некоторых исследованиях рассеяния нейтронов на других белках [76; 152; 153], в которых оно было приписано вращению метильных групп, попадающему во временное окно эксперимента при данной температуре. Данные на рис. 4.3 показывают, что изгиб вблизи 130 К происходит

только в присутствии воды. Вращение метильных групп вряд ли может объяснить разницу в поведении температурной зависимости, наблюдаемой для гидратированного и сухого образца.

Для исследуемого здесь бислоя POPC данный изгиб не наблюдается, вероятно, потому, что он перекрывается с более интенсивным переходом около 100 К (рис. 4.2). Этот переход может быть связан с началом подвижности бислоя POPC, который является менее жестким, чем слой DPPC [71; 99].

Результаты трехимпульсных экспериментов, представленные на рис. 4.3 и 4.4 согласуются с теоретическими выражениями (1.26), (1.27), которые предсказывают экспоненциальное затухание сигнала ЭСЭ для увеличения временных задержек  $\tau$  и  $T$ . Данные для  $\Delta W_{3-p}(T)$  (рис. 4.4) показывают, что выше 170–180 К  $\Delta W_{3-p}(T)$  начинает увеличиваться с задержкой по времени  $T$ ; так медленное вращение становится видимым. Медленное вращение, обнаруженное ЭСЭ, находится в микро- и миллисекундных временных диапазонах [137].

Интересно подчеркнуть, что, согласно данным на рис. 4.5, молекулы воды в гидратной оболочке также начинают переориентироваться в микросекундном временном масштабе при близких температурах (от 175 до 179 К). Это совпадение с началом медленных вращений означает, что движения внутри бислоя и в гидратном слое связаны, как уже подчеркивалось в нескольких исследованиях [60; 149; 150]. Отметим, что исследование гидратированного миоглобина методом калориметрии [60] показало, что стеклование воды в гидратной оболочке происходит вблизи 170 К.

Спиновые метки амфифильных молекул, используемых в этой работе, TriTOAC1, 5-DSA и T-PCSL, располагаются на разной глубине в мембране: для TriTOAC1 и 5-DSA метки погружены во внутреннюю часть гидрофобной мембраны, в то время как метка T-PCSL расположена на поверхности гидрофильной мембраны. Кроме того, молекулы 5-DSA и T-PCSL выстраиваются ортогонально поверхности мембраны, тогда как TriTOAC1 демонстрирует планарную ориентацию [154]. Однако температурные зависимости скорости анизотропной релаксации  $\Delta W_{2-p}$  в бислоях DPPC, представленные на рис. 4.2 и 4.3

во всех этих трех случаях выглядят очень похоже. Это сходство может появиться только в том случае, если в движение вовлечен не только фрагмент молекулы, несущий спиновую метку, но и его непосредственное липидное окружение. Другими словами, молекулярные движения, обнаруженные здесь с помощью метода ЭСЭ, имеют кооперативный характер.

#### 4.5. Заключение к главе 4

Проведенное детальное исследование температурной зависимости скорости анизотропной релаксации показало появление стохастических либраций в полностью насыщенных мембранах DPPC выше 130 К; эти либрации заметно увеличиваются выше 170–180 К. Было обнаружено, что параметр движения  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  подчиняется аррениусовскому типу температурной зависимости. Этот результат позволяет предположить, что движения связаны с преодолением межмолекулярных барьеров, существующих для переориентации биомолекул в пределах энергетического ландшафта в этих системах. По нашим и литературным оценкам величина этих барьеров составляет от 10 до 20 кДж/моль.

Для молекул спин-меченых стеариновых кислот и пептидов в модельной мембране из полностью насыщенных липидов DPPC ускорение температурной зависимости  $\Delta W_{2-p}$  происходит начиная с температуры 130 К, что свидетельствует о проявлении преимущественно изгибных колебаний в этих бисоях. В мембране же из ненасыщенных липидов POPC это ускорение наблюдается начиная с температуры 100 К, что в свою очередь можно связать с проявлением крутильных колебаний.

В трехимпульсном эксперименте выше 170–180 К были обнаружены медленные вращения, проявляющиеся в микро- и миллисекундных временных диапазонах. Медленное вращение подразумевает появление гибкости липидов. С другой стороны, эксперименты с получением модуляции огибающей спинового эха с спин-мечеными бислоями, гидратированными D<sub>2</sub>O, показывают, что в этом



температурном диапазоне также имеет место общее движение молекул воды на временном масштабе  $\sim 10^{-5}$  с, таким образом, движения липидов и воды связаны.

Наблюдаемое сходство данных для трех спин-меченых молекул, существенно различающихся по химической структуре и локализации в мембране, указывает на кооперативный характер молекулярных движений в липидных бислоях.

## Глава 5. ЛИПИДНЫЕ БИСЛОИ DOPC В ГЕЛЕВОЙ ФАЗЕ

### 5.1. Описание задачи

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) способен изучать ориентационные движения спин-меченых молекул. При низких температурах ориентационные движения молекул в конденсированных средах ограничены клеткой, образованной ближайшими молекулами; эти движения развиваются как стохастические молекулярные либрации со временем корреляции  $\tau_c$ , лежащим в наносекундном временном масштабе.

Стохастические молекулярные либрации в двухимпульсном ЭСЭ вызывают затухание эха со скоростью, пропорциональной параметру движения  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$ , где  $\langle \alpha^2 \rangle$  — среднеквадратичная угловая амплитуда, а  $\tau_c$  — время корреляции. Для биологических систем и молекулярных стекол было показано, что параметр движения увеличивается с температурой (см. п. 1.3.5). Ожидается, что значение  $\langle \alpha^2 \rangle$  увеличивается с температурой при уменьшении значения  $\tau_c$ . Таким образом, изменение  $\langle \alpha^2 \rangle$  доминирует и параметр  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  можно использовать для сравнительной оценки доступного пространства для движения.

Из сравнительного исследования фосфолипидных бислоев, состоящих из ненасыщенных и насыщенных фосфолипидов (см. [99] и главу 4), также известно, что этот параметр больше для более рыхлой структуры. Таким образом, этот параметр может быть использован для исследования межмолекулярных структур (молекулярных упаковок) в молекулярных средах различного происхождения, в том числе, например, в молекулярных средах. замороженные ионные жидкости [129; 130; 132; 133].

В данной работе проведено сравнительное исследование температурных зависимостей параметра движения для модельных бислоиных мембран DPPC, POPC и DOPC. (с полностью насыщенными связями а ацильных хвостах, одной ненасыщенной связью в одном хвосте, по одной ненасыщенной связи в обоих

хвостах, соответственно. В качестве спиновых зондов были выбраны стеариновые кислоты, спин-меченые в пятом (5-DSA) и шестнадцатом (16-DSA) положении. Для сравнения также были использованы литературные данные [120; 155].

## 5.2. Образцы

Спин-меченные стеариновые кислоты (5-DSA и 16-DSA) и фосфолипиды (POPC, DPPC и DOPC) были совместно растворены в хлороформе в молярном соотношении 1:250. Затем растворитель был осторожно удален потоком азота, а полученная смесь помещена на 24 ч под вакуум в эксикатор. Полученные пленки гидратировались в избытке дистиллированной воды в течение 4 ч при 56 °C в случае смеси DPPC/5-DSA, в течение 12 ч при 5 °C в случае смеси POPC/5-DSA и 3 часа при комнатной температуре в случае смесей DOPC/5-DSA и DOPC/16-DSA (таким образом, все липиды находились в жидкой фазе, выше их температур плавления). Затем образцы концентрировали центрифугированием; конечные количества воды и фосфолипидов в образцах были приблизительно равными по массе. В результате этой процедуры образовывались многослойные везикулы. Подготовленные образцы помещали в пробирки из ЭПР-стекла с внешним диаметром 3 мм, которые затем были герметично запаены и заморожены погружением в жидкий азот.

## 5.3. Результаты

Измерения проводились в диапазоне температур 80–210 К; выше 210 К спиновая релаксация была слишком быстрой для наблюдения сигнала ЭСЭ. На рис. 5.1 показаны типичные примеры эхо-детектированных спектров ЭПР, полученные при трех фиксированных временах задержки  $\tau$ . Спектры нормированы на интенсивность центральной компоненты. На рис. 25 видно, что низкопольная и высокопольная компоненты с увеличением  $\tau$  заметно

уменьшаются. Еще один эффект, видимый на рис. 5.1 – это изменение формы линий ЭД ЭПР: края спектра (**II**) релаксируют медленнее по сравнению с другими частями спектра.

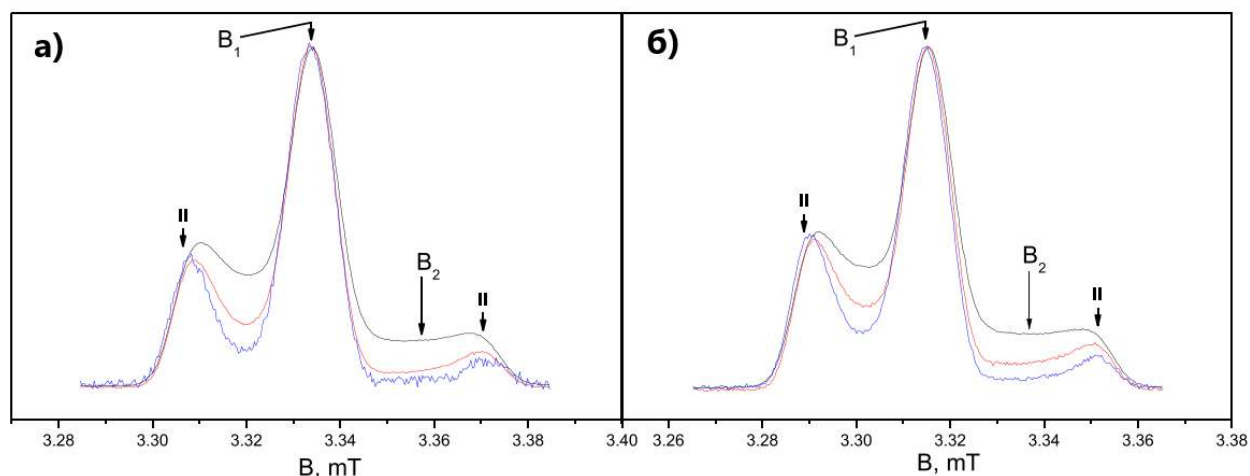


Рисунок 5.1. Спектры ЭД-ЭПР для бислоев POPC/5-DSA (а) и DOPC/5-DSA (б), полученные при 190 К с помощью двухимпульсной последовательности, с фиксированным временным интервалом  $\tau$ , равным, соответственно, 120, 320 и 720 нс. Спектры нормированы на центральный пик. Позиции полей  $B_1$  и  $B_2$  обозначают те, где были получены спады ЭСЭ. Также указаны положения поля для параллельной ориентации спиновой метки в магнитном поле (**II**).

Эти два положения соответствуют каноническим ориентациям спиновой нитроксильной метки, то есть ось  $Z$  молекулярной системы координат направлена параллельно магнитному полю. (В узкой центральной компоненте канонические ориентации не разрешены.) Таким образом, для канонических ориентаций электронный спин релаксирует сравнительно медленно, что полностью согласуется с моделью стохастических молекулярных либраций [115].

Полученные данные  $\Delta W_{2-p}$  для DOPC/5-DSA и POPC/5-DSA представлены на рис. 5.2. Аналогичные данные для бислоя 5-DSA/DPPC, представленные в предыдущей главе, также показаны на рис. 5.2 для сравнения. Для исключения примеси независимого от температуры вклада «мгновенной диффузии» в спад ЭСЭ «мгновенной диффузии», все данные для каждого образца были сдвинуты на одно и то же значение, чтобы обеспечить нулевую величину при низких температурах - между 80 и 90 К. Параметр  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  может быть извлечен из представленных значений  $\Delta W_{2-p}$  как описывалось ранее. Эти результаты также

представлены на рис. 5.2 путем соответствующего масштабирования правой вертикальной оси.

Также была исследована обратимость наблюдаемых температурных зависимостей. Эти измерения были выполнены для бислоя 5-DSA/DOPC в двух режимах: при повышении температуры с 80 К до 204 К и при понижении температуры с 204 К до 80 К. Результаты представлены на рис. 5.2; видно, что наблюдаемое поведение совершенно обратимо.

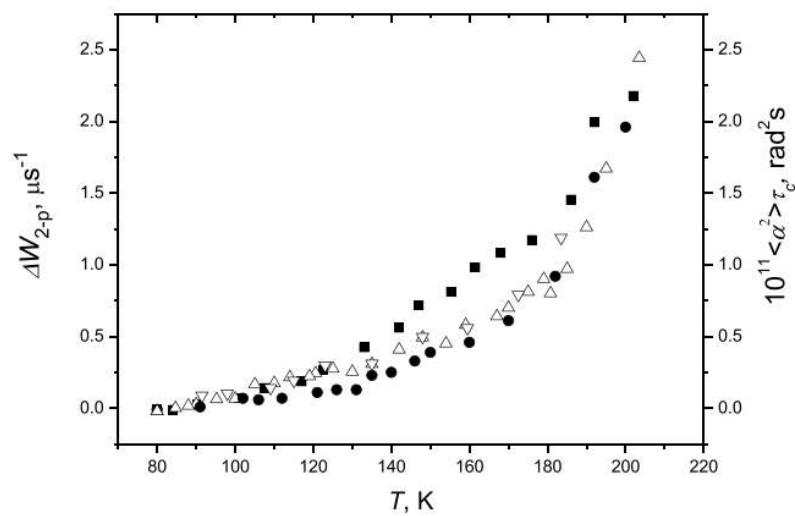


Рисунок 5.2. Температурная зависимость скорости релаксации  $\Delta W_{2-p}$ , полученная в двухимпульсных экспериментах для бислоев POPC/5-DSA (квадраты), бислоев DOPC/5-DSA (треугольники вверх: температура увеличивается, треугольники вниз: температура уменьшается), а также ранее полученные данные (предыдущая глава) для бислоев DPPC/5-DSA (круги).

Температурные зависимости данных  $\Delta W_{2-p}$ , полученные для 16-DSA, встроенной в те же модельные мембраны, представлены на рис. 5.3. Данные для бислоев DPPC/16-DSA и POPC/16-DSA были взяты из работы [120]. Можно заметить, что температурные зависимости на рис. 5.3 демонстрируют схожее поведение с данными на рис. 5.2. Однако на рис. 5.3 для бислоя DOPC/16-DSA наблюдается излом, имеющий место при  $\sim 140$  К. Также примечательно, что данные для бислоя POPC/16-DSA намного больше, чем для бислоя POPC/5-DSA.

Эксперименты с трехимпульсным стимулированным ЭСЭ проводились с фиксированной временной задержкой  $T$  между вторым и третьим микроволновыми импульсами и увеличивающейся временной задержкой  $\tau$  между

первым и вторым импульсами. Было обнаружено, что спад ЭСЭ является экспоненциальным (данные не показаны), и были рассчитаны скорости экспоненциального затухания  $\Delta W_{3p}(T)$ . Результаты представлены на рис. 5.4 для бислоев DOPC/5-DSA, DOPC/16-DSA, POPC/5-DSA и DPPC/5-DSA. Видно, что зависимости  $W_{3p}(T)$  от задержки  $T$  достаточно хорошо аппроксимируются прямыми линиями, что согласуется с моделью медленных вращений [115].

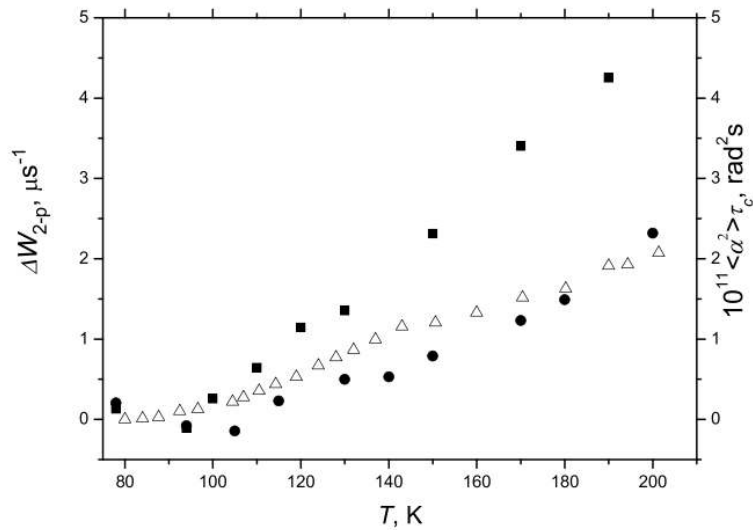


Рисунок 5.3. То же, что на рис. 5.2, с тем же значением символов, для 16-DSA вместо 5-DSA. Для бислоев DPPC/16-DSA данные взяты из [120].

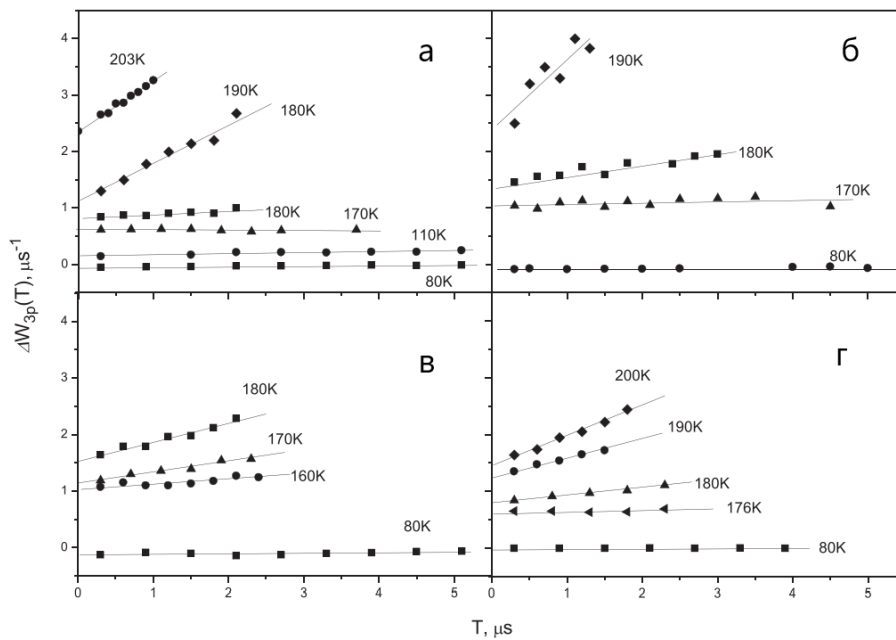


Рисунок 5.4. Температурные зависимости скорости релаксации  $W_{3p}(T)$ , полученные в трехимпульсных экспериментах: а) DOPC/5-DSA, б) POPC/5-DSA, в) DOPC/16-DSA, г) DPPC/5-DSA. Данные аппроксимированы прямыми линиями.

Аппроксимационные прямые на рис. 5.4 имеют нулевой наклон до  $\sim 170$  К для образцов с 5-DSA и до  $\sim 160$  К для образцов с 16-DSA. Это согласуется с теоретическим предсказанием, когда активны только быстрые (наносекундные) стохастические молекулярные либрации; поэтому ниже этих температур имеют место только эти движения. Увеличение наклона при более высоких температурах означает, что появляются медленные микросекундные вращения. Отметим также, что  $\Delta W_{3p}(0) \approx \Delta W_{2p}$  (рис. 5.3), как и следовало ожидать.

#### 5.4. Обсуждение

Данные на рис. 5.2 и 5.3 показывают, что параметр движения  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  для стохастических молекулярных либраций увеличивается с температурой для всех исследованных бислоев (DOPC, POPC, DPPC), что дополнительно подтверждает, что увеличение  $\langle \alpha^2 \rangle$  с температурой преобладает над уменьшением  $\tau_c$ . Таким образом, этот параметр позволяет сравнительно оценить доступное пространство для движения. Это утверждение подтверждается также сравнением бислоев POPC/5-DSA и DPPC/5-DSA. Действительно, большее значение  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  в первом случае можно легко отнести к неупорядоченной межмолекулярной упаковке из-за наличия перегиба двойной связи C=C в молекулярной структуре липидов (рис. 2.2), что действительно увеличивает доступное для движения пространство. Кроме того, сравнение данных 5-DSA и 16-DSA (рис. 5.2 и 5.3, соответственно) показывает большее значение  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  в последнем случае, что согласуется с хорошо установленным фактом, что внутренняя часть мембраны является более неупорядоченной, чем поверхность мембраны.

Так как липид DOPC имеет в своей структуре два излома двойных связей C=C (рис. 24), то можно ожидать, что для бислоев DOPC беспорядок будет еще более заметным. Однако из рис. 5.2 и 5.3 видно, что данные для бислоя DOPC находятся между данными для бислоев POPC и DPPC. Таким образом,

межмолекулярная упаковка в бислое DOPC более упорядочена, чем в бислое POPC.

Для объяснения этого на первый взгляд парадоксального факта можно отметить, что дефектность бислоя DOPC может снизиться, если два концевых сегмента липидных хвостов DOPC (за пределами связей C=C) будут складываться кооперативно, параллельно друг другу (схематическое изображение на рис. 5.5), специфическое складывание действительно привело бы к увеличению упорядоченности мембраны, приближая ее к случаю упаковки DPPC.

Данные на рис. 5.2 и 5.3, однако, показывают, что при понижении температуры беспорядок увеличивается, и ниже 130 К экспериментальные точки для бислоя DOPC совпадают с таковыми для бислоя POPC. И этот процесс обратим с температурой. На первый взгляд, это предположение противоречит интуиции, поскольку понижение температуры обычно приводит к более упорядоченным межмолекулярным структурам (как при переходе жидкость-гель). Однако в этом отношении следует отметить, что аналогичный эффект уменьшения порядка с понижением температуры четко наблюдался для упаковки биомолекул в фотосинтетических реакционных центрах [74; 75], где пространственное разделение кофакторов цепь переноса электрона изучалась с помощью эха вне фазы для спин-коррелированных радикальных пар. Этот метод очень чувствителен к расстояниям между кофакторами в наноразмерном диапазоне: достигнутая точность составила около  $\pm 0,04$  нм для расстояний разделения около 3 нм. Полученные результаты [74; 75] показали, что при понижении температуры с  $\sim 200$  К до  $\sim 100$  К беспорядок биосистемы действительно увеличивается в наноразмерном диапазоне расстояний, и это упорядочение/разупорядочение является обратимым с температурой. Разупорядочение при низких температурах было интерпретировано как свидетельство того, что энергетический ландшафт биосистемы становится более изрезанным, так что биомолекулы могут быть захвачены во многих неглубоких энергетических ямах. И эта интерпретация может также объяснить, почему хвосты DOPC могут стать более беспорядочными при понижении температуры.



Таким образом, мы можем предположить, что молекулярная упаковка в бислое DOPC обратимо изменяется с понижением/повышением температуры: при низких температурах липидные хвосты менее упорядочены, тогда как при высоких температурах хвосты имеют тенденцию складываться совместно (схема на рис. 5.5).

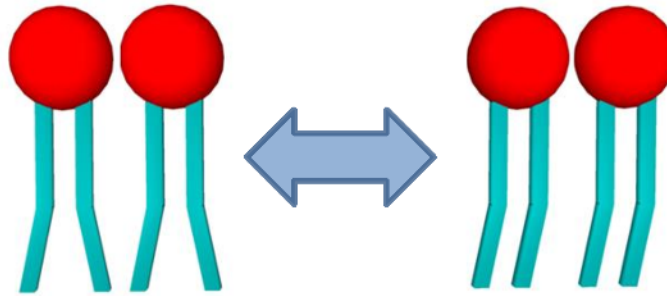


Рисунок 5.5. Схематическое изображение менее упорядоченной (слева) и более упорядоченной (справа) упаковки в бислое DOPC при криогенных температурах.

Еще одна особенность изменения упаковки молекул в DOPC/16-DSA представляет собой излом около  $\sim 140$  К, показанный на рис. 5.3 для температурной зависимости  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$ . Отсутствие такого перегиба на рис. 5.2 для бислоя DOPC/5-DSA означает, что это изменение межмолекулярной упаковки в бислое DOPC более выражено во внутренней части мембраны.

Также неупорядоченность цепей в бислоев фосфатидилхолина при низких температурах изучалась методом спектроскопии комбинационного рассеяния света [100]. Однако данные, полученные для бислоев DOPC, POPC и DPPC ниже 170 К, не сильно различались для этих трех случаев. Вероятно, это связано с тем, что спектры комбинационного рассеяния чувствительны к внутримолекулярной упаковке, в то время как параметр  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$ , получаемый методом ЭСЭ, действительно исследует межмолекулярную упаковку.

Данные на рис. 5.4 подразумевают, что вращения в микросекундной шкале времени не обнаруживаются ниже 170 К для бислоев с 5-DSA и ниже 160 К для бислоев с 16-DSA так как наблюдаются нулевые наклоны аппроксимационных прямых для T-зависимостей. Этот результат дополнительно оправдывает

применение модели стохастических наносекундных либраций. (Выше этих температур медленные микросекундные вращения также могут вносить вклад в найденные значения  $\Delta W_{2-p}$ .) С другой стороны, данные на рис. 5.4 ясно указывают на разупрочнение бислоя выше 160–170 К на межмолекулярном уровне (в микросекундной шкале времени), что однозначно подтверждает изменение энергетического ландшафта бислоя.

Конечно, совместная упаковка липидных хвостов DOPC была предложена здесь из косвенных экспериментов. Так что эта гипотеза требует дополнительного обоснования с помощью других экспериментальных подходов. Это может быть моделирование молекулярной динамики (МД), которое в настоящее время оказалось эффективным инструментом для изучения динамики и упаковки липидного бислоя [156; 157].

Данные на рис. 5.2 и 5.5 позволяют также предположить, что межмолекулярная структура бислоя DOPC со складывающимися вместе липидными хвостами сохраняется выше 170 К. Можно предположить, что эта специфическая упаковка имеет место до перехода DOPC гель-жидкость (256 К). Однако выше этой точки эти хвосты определенно неупорядочены, что хорошо известно из МД моделирования [156], широкоугольного рентгеновского рассеяния [158] и ЯМР [159]; это разупорядочение является естественным следствием того, что кинетическая энергия молекул в жидкостях становится сравнимой с межмолекулярным взаимодействием. В этом отношении интересно отметить, что данные дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) показывают, что переход гель-жидкость для бислоя DOPC гораздо более расширен с температурой, чем для бислоя DPPC [100]. Гипотеза кооперативного складывания позволяет объяснить это расширение вовлеченным дополнительным процессом - процессом переупаковки DOPC из упорядоченного состояния в неупорядоченное, который может иметь место до плавления.

Данные ДСК также показывают, что энтальпии  $\Delta H$  перехода гель-жидкость близки для бислоев DOPC и DPPC, однако они существенно больше, чем для бислоя POPC [100; 160]. Модель кооперативного сворачивания снова позволяет

объяснить это поведение как следствие того факта, что при переходе высокоупорядоченное состояние в бислоях DOPC и DPPC заменяется неупорядоченным состоянием, в то время как в бислое POPC порядок существенно не меняется.

### 5.5. Заключение к главе 5

Экспериментальные данные, полученные в данной работе для бислоев DOPC и POPC, взятые вместе с данными о бислоях полностью насыщенных липидов DPPC, позволяют заключить, что для бислоев DOPC значения параметра движения  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$  находятся между значениями для бислоев POPC и DPPC, будучи ближе к случаю POPC ниже 130 К и к случаю DPPC выше 170 К. Этот результат можно объяснить особой упаковкой хвостов DOPC: их концевые сегменты (за пределами двойной связи) при температуре выше 170 К упаковываются совместно. Было обнаружено, что процесс переупаковки между 130 К и 170 К обратим при повышении или понижении температуры. Уменьшение порядка ниже 170 К указывает на то, что энергетический ландшафт при низких температурах более жесткий, чем при более высоких температурах.

Измерения стимулированного ЭСЭ позволяют обнаружить начало медленных микросекундных вращений. Выше  $\sim 160$ – $170$  К для всех трех исследованных бислоев (DOPC, POPC и DPPC) появляются медленные вращения, что указывает на размягчение матрицы. Это размягчение допускает более благоприятные конформации липидов выше  $160$ – $170$  К, что согласуется с предложенной здесь переупаковкой липидов. Другими словами, эти данные стимулированного ЭСЭ показывают, что энергетический ландшафт меняется с изменением температуры.

## **Глава 6. ГЛОБУЛЯРНЫЙ БЕЛОК ЛИЗОЦИМ [161; 162] И ВНУТРЕННЕ РАЗУПОРЯДОЧЕННЫЙ БЕЛОК КАЗЕИН**

### **6.1. Описание задачи**

Функции белков определяются их трехмерными третичными структурами. Однако существуют белки, обладающие неструктурированными областями значительного размера, тем не менее, остающиеся биологически активными, такие белки были названы внутренне неупорядоченными белками (см. п. 1.1.2).

В этой работе метод ЭСЭ (см. п. 1.3.4) был применен для исследования стохастических либраций во внутренне разупорядоченном белке – бычьем казеине. Эти либрации являются общим свойством молекулярных твердых тел и высоковязких жидкостей. Либрации, регистрируемые ЭСЭ в молекулярных системах, определяются ближайшим окружением молекулы (см. главы 4 и 5). Поэтому этот подход может служить инструментом для изучения молекулярной упаковки в молекулярных системах. В качестве эталона для исследования был выбран глобулярный фермент – белок лизоцим куриного яйца, который обладает хорошо задокументированной конформационной стабильностью [163]. Полученные данные свидетельствуют о том, что переходы от беспорядка к порядку могут быть вызваны также повышением температуры при криогенных температурах.

### **6.2. Образцы**

В качестве внутренне разупорядоченного белка был выбран бычий казеин. Казеины являются основными белками молока и принадлежат к семейству фосфорилированных белков, включающему четыре генетических типа ( $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеины); все эти белки считаются внутренне разупорядоченными. Для сравнения был выбран глобулярный белок лизоцим куриного яйца. Для

исследования молекулярных движений методом ЭПР были использованы спиновый зонд **VI**, **VII** и спиновая метка **V**. Синтез спин-меченых белков был проведен по протоколам, описанным в [164; 165] для лизоцима и в [24] казеина.

Лизоцим в количестве 7,5 мг был растворен в 100 мкл 50 мМ буфере ацетата натрия (рН = 5). Нитроксильный радикал **V** в количестве 6,3 мг (10-кратный избыток по отношению к белку) был растворен в 20 мкл метанола, после чего объем раствора метки был доведен до 200 мкл добавлением ацетата натрия. Полученный раствор метки был добавлен к раствору белка, в течение 24 часов раствор перемешивался при 40 °С.

1,5 мг мицеллярного казеина (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) были растворены в буфере (4 М гуанидин хлорид, 20 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 0.1 М буферного раствора Трис-НСl, рН=6) с 1000-кратным избытком Трис-(2-карбокситил)-фосфина (ТСЕР), после чего раствор выдержали 4 часа на магнитной мешалке при 55°С.

Далее ТСЕР был удален путем центрифугирования с использованием Amicon Ultra-15 3кДа (Millipore, Берлингтон, Массачусетс, США). После чего к раствору добавили метку **V** в 50-кратном избытке. После 16 часов на магнитной мешалке при температуре 50°С

Несвязавшаяся с лизоцимом или казеином метка была удалена путем многократного центрифугирования при 14000 g с использованием фильтра (Amicon/Millipore, США). Для уменьшения концентрации спинов в образце меченный лизоцим был смешан с немеченным.

Полученный спин-меченый лизоцим был изучен Г. Ю. Шевелевым (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) в сравнении с немеченым лизоцимом после трипсинолиза с использованием MALDI-TOF масс-спектрологии (спектрометр Bruker Daltonics Ultraflex). Результаты показали, что, скорее всего, спиновая метка **V** ковалентно присоединена к группе NH<sub>2</sub> первой аминокислоты лизина (К) лизоцима.

Образцы лизоцима со спиновыми зондами **VI** и **VII** и казеина со спиновым зондом **VII** были приготовлены путем совместного растворения в

дистиллированной воде. Для исключения в эксперименте ЭПР сигнала от нитроксильного радикала VI, диффундировавшего в водную фазу после гидратации была добавлена аскорбиновая кислота в 10-кратном избытке по отношению к нитроксильному радикалу.

Полученные растворы спин-меченых белков были помещены в эксикатор над гидроксидом натрия на 24 ч, после чего полученные образцы считались сухими – то есть степень гидратации  $h$ , определяемая как отношение массы воды к массе белка считалась равной нулю ( $h=0$ ). Для получения степени гидратации 0,4 высушенные образцы гидратировались в эксикаторе парами воды ( $H_2O$ ), а также в некоторых случаях  $D_2O$ . Степень гидратации контролировалась путем взвешивания.

Концентрация спиновых меток и зондов контролировалась методом стационарного ЭПР при сравнении со стандартом, согласно этим измерениям молярное соотношение нитроксильных радикалов и белка находилось в соотношении примерно 1/100 во всех случаях.

### 6.3. Результаты

На рисунке 6.1 представлены спектры стационарного ЭПР, полученные для гидратированных образцов при комнатной температуре. Форма спектров для спин-меченых белков свидетельствует о иммобилизованности метки, что говорит о ковалентной связи между меткой и белком. Стационарный спектр ТЕМПОЛа в казеине свидетельствует о выходе спинового зонда в жидкую фазу, что естественно ввиду гидрофильной природы данного спинового зонда. Во всех случаях, представленных на рис. 6.1 не наблюдается дополнительного уширения, характерного для сильных спин-спиновых взаимодействий, что соответствует образцам с разбавленными парамагнитными центрами.

На рис. 6.2 представлены спектры импульсного ЭПР, записанные при различных раздвижках  $\tau$  между импульсами для спин-меченого лизоцима при

178 К. Спектры нормированы на центральную изотропную компоненту (1), такая нормировка позволяет исключить механизмы релаксации, независимые от положения по полю. Из рис. 6.2 видно, при увеличении времени  $\tau$  между импульсами амплитуда высокопольной компоненты (2), являющейся самой анизотропной, спадает наиболее интенсивно. Релаксация в крайних положениях спектра, соответствующих каноническим ориентациям метки, незначительна, что позволяет приписать ее низкоамплитудным либрациям.

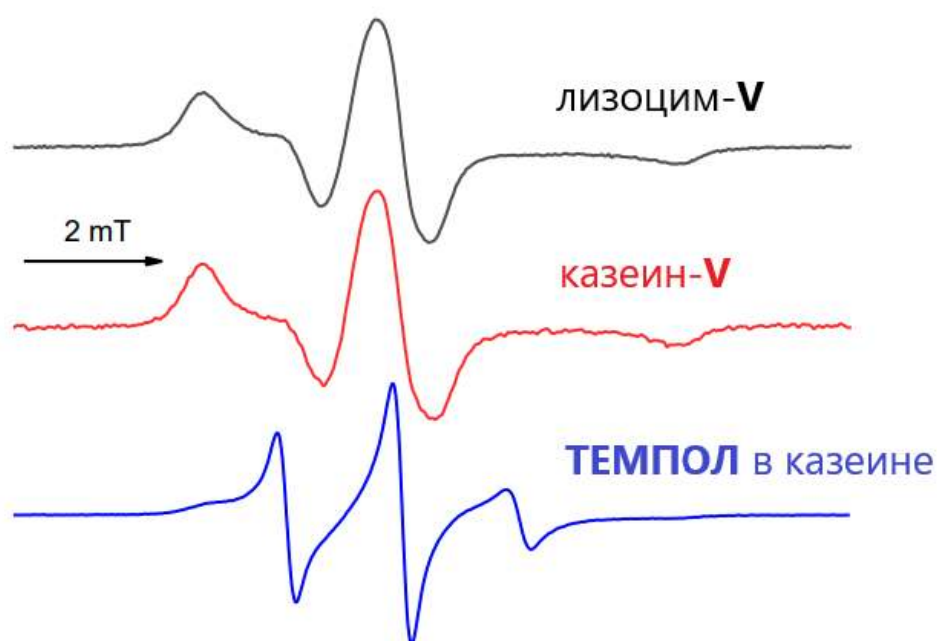


Рисунок 6.1 Стационарные спектры ЭПР при комнатной температуре для спин-меченых лизоцима и казеина, гидратированных  $D_2O$ , и зонда ТЕМПОЛ в гидратированном казеине. Степень гидратации  $h=0.4$ . Соотношение спиновых меток к белку приблизительно 1:100 во всех случаях.

Скорость анизотропной релаксации,  $\Delta W$ , была получена как результат линейной аппроксимации отношения спадов ЭСЭ в положениях по полю 1 и 2 в полулогарифмической шкале. Температурные зависимости скорости анизотропной релаксации ( $\Delta W$ ) для сухого ( $h=0$ ) и гидратированного ( $h=0,1$ ) образцов с нитроксильным зондом VI в лизоциме и спин-меченого лизоцима ( $h=0,4$ ) могут быть представлены как это показано на рис. 6.3. Формы линий стационарных спектров ЭПР для этих образцов свидетельствуют о

иммобилизованности спиновых зондов, то есть, отсутствия выхода в водную фазу (что естественно для сухого образца).

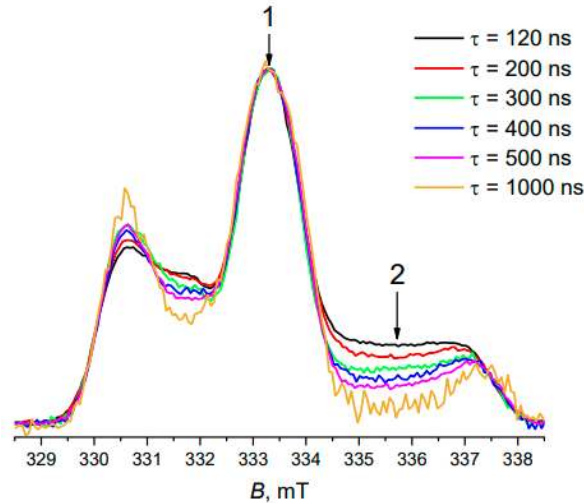


Рисунок 6.2 Эхо-детектированный спектр ЭПР для спин-меченого лизоцима ( $h=0,4$ ) при 178 К при различных значениях задержки между двумя импульсами ( $\tau=120, 200, 300, 400, 500, 1000$  нс).

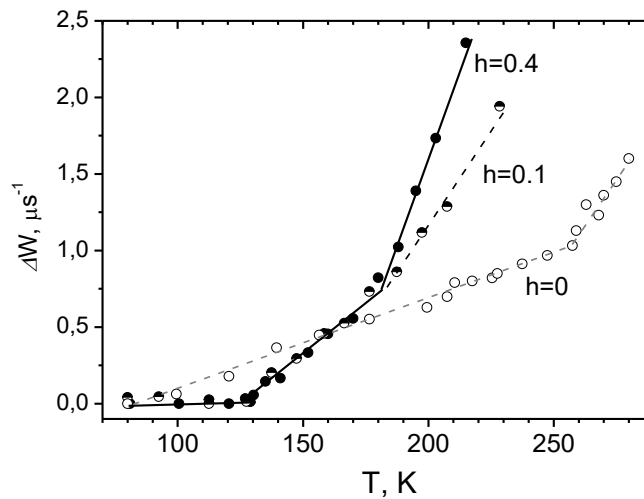


Рисунок 6.3. Температурная зависимость параметра движения  $\Delta W$  для зонда VII (Темпон) в лизоциме ( $h=0$  и  $0,1$ ) и спин-меченого лизоцима ( $h=0,4$ ) [161]. Прямые линии проведены для удобства восприятия.

В спектрах стационарного ЭПР для гидратированного лизоцима со спиновым зондом VI при комнатной температуре наблюдались узкие линии



(данные не приведены), свидетельствующие о выходе нитроксильного зонда в водную фазу, что естественно, ввиду гидрофильности данного нитроксильного радикала. Поэтому в случае образца лизоцим/VI ( $h=0,1$ ) была добавлена аскорбиновая кислота, как описано в методике эксперимента, - такое добавление приводит к окислению нитроксильной метки с превращением ее в диамагнитный продукт. Стационарный спектр после добавления аскорбиновой кислоты свидетельствовал об отсутствии сигнала от зондов в водной фазе (данные не приведены).

Видно, что температурная зависимость  $\Delta W$  для сухого лизоцима может быть аппроксимирована прямой линией вплоть до 260 К, выше данной температуры наблюдается отклонение от линейности. Гидратированные образцы демонстрируют резкое увеличение температурной зависимости  $\Delta W$  выше  $\sim 130$  К, также можно увидеть резкий рост температурной зависимости выше  $\sim 180$  К, слабо выраженный для образца со степенью гидратации  $h=0,1$ .

Согласно нашим оценкам, эти температурные точки определяются с точностью  $\pm 6$  К для излома около 130 К и с точностью  $\pm 3$  К для излома около 180 К.

Температурные зависимости скорости анизотропной релаксации для всех сухих и полностью гидратированных образцов приведены на рис. 6.4. Большая часть данных, представленных на рис. 6.4, была получена в условиях увеличения температуры, однако при ее понижении наблюдалась хорошая воспроизводимость. Данные были скомпонованы для большей наглядности на рис. 6.4 следующим образом: данные для всех образцов (а) с белком лизоцимом, (б) с белком казеином, (в) спин-меченые гидратированные белки ( $h=0,4$ ), (д) спин-меченые дегидратированные белки.

Нами также были проделаны эксперименты по изучению методом ESEEM «ЯМР-подобных»  $^2\text{H}$ -спектров [131,132] при гидратировании белка тяжелой водой. На рис. 6.5 приведены частотные спектры ESEEM для спин-меченых казеина и лизоцима, гидратированных в  $\text{D}_2\text{O}$  ( $h=0,4$ ) при различных температурах. Пик на частоте 2,2 МГц возникает из-за сверхтонкого взаимодействия

неспаренного электрона спиновой метки с дейтериями матрицы, расположенными на расстояниях от 0,5 до 1 нм [148] (2,2 МГц - ларморовская частота ядер дейтерия в X диапазоне спектрометра ЭПР).

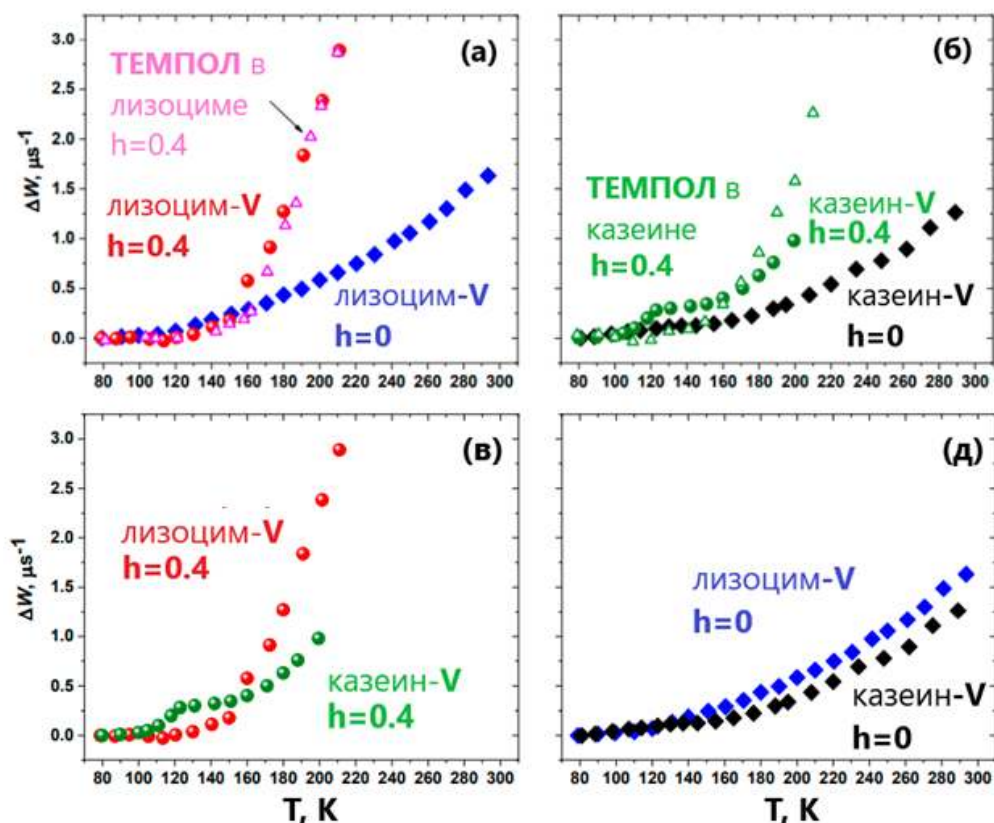


Рисунок 6.4. Температурные зависимости скорости анизотропной релаксации: (а) дегидратированный и гидратированный спин-меченый лизоцим и ТЕМПОЛ в гидратированном лизоциме, (б) дегидратированный и гидратированный спин-меченый казеин и ТЕМПОЛ в гидратированном казеине, (в) гидратированные спин-меченые лизоцим и казеин, (г) дегидратированные спин-меченые лизоцим и казеин.

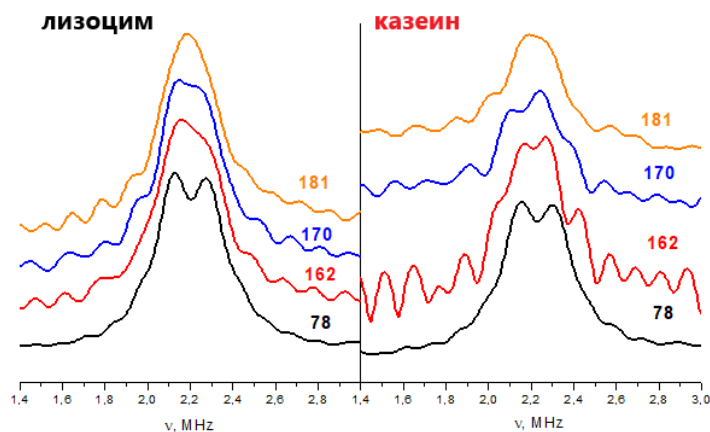


Рисунок 6.5 Модуль Фурье преобразования спектров модуляции огибающей стимулированного спинового эха для спин-меченого лизоцима (слева) и спин-меченого казеина (справа) (гидратация  $D_2O$ ,  $h=0,4$ ) при различных температурах.

Явно выраженное дублетное расщепление при 78 К на рис. 6.5, вызвано анизотропным ядерным квадрупольным взаимодействием с ядром дейтерия. Это расщепление исчезает, если молекула движется со скоростью больше  $10^5 \text{ с}^{-1}$  [135; 136]. Тогда исчезновение дублета при 180 К на рис. 6.5, можно смело приписать началу общего движения молекул воды со скоростью  $10^5 \text{ с}^{-1}$ .

Также методом стационарного ЭПР были исследованы низкотемпературные динамические либрации (см. п. 1.3.3). Эти данные позволяют определить среднеквадратичный угол отклонения из величины расщепления крайних пиков спектра, которая соответствует удвоенному значению компоненты сверхтонкого взаимодействия  $A'_{zz}$ , усредненной движением [106]:

$$\langle A'_{zz} \rangle = A_{zz}^0 - \langle \alpha^2 \rangle (A_{zz}^0 - A_{\perp}^0). \quad (8.1)$$

Здесь индекс «0» означает главные значения тензора сверхтонкого взаимодействия, взятые при температуре  $T=0 \text{ К}$ . Значение  $A_{zz}^0$  было получено линейной экстраполяцией низкотемпературных данных к нулевой температуре, значение  $A_{\perp}^0$  было выбрано равным 0,8 мТ [166].

Температурные зависимости среднеквадратичного угла отклонения для гидратированных образцов спин-меченых лизоцима и казеина приведены на рис. 6.6, из которого видно, что температурные зависимости для лизоцима ниже 195 К и для казеина ниже 235 К могут быть аппроксимированы прямыми линиями, что соответствует гармоническим колебаниям в твердом теле. Таким образом, отклонение от этих линейных зависимостей при  $195 \pm 5 \text{ К}$  и  $235 \pm 5 \text{ К}$  может быть связано с переходом от гармонических движений к ангармоническим (или динамическим переходом по принятой в методе рассеяния нейтронов терминологии [102]).

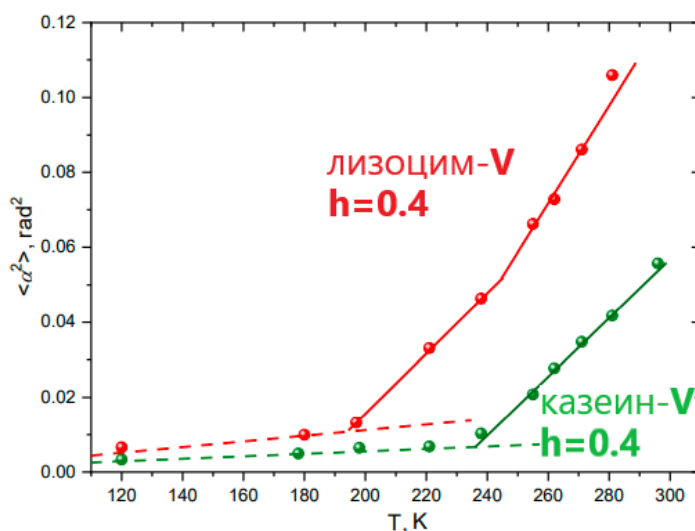


Рисунок 6.6. Температурные зависимости среднеквадратичного углового отклонения,  $\langle \alpha^2 \rangle$ , извлеченные из данных стационарного ЭПР с использованием выражения 8.1 для гидратированных спин-меченых лизоцима и казеина. Пунктирными линиями выделена линейная температурная зависимость, соответствующая гармоническим движениям. Непрерывные линии приведены для удобства восприятия.

#### 6.4. Обсуждение

Из данных на рисунке 6.3 (а, б) видно, что температурные зависимости скорости анизотропной релаксации возрастают быстрее для гидратированных образцов, чем для дегидратированных. Данный факт говорит о большей подвижности матрицы гидратированного белка по сравнению с дегидратированным. Близость температурных зависимостей на рис. 6.3 (д) для дегидратированных лизоцима и казеина может указывать на схожую межмолекулярную упаковку белков в данном состоянии.

Кроме того, как показано на рис. 6.3 для сухого лизоцима, данные для стохастических либраций демонстрируют линейный тренд вплоть до 260 К, что согласуется с данными по рассеянию нейтронов [76; 152; 167; 168], которые приписывались гармоническому движению. Однако в нашем случае следует предположить, что это гармоническое движение сильно затухает (поэтому оно становится стохастическим или диффузионным), иначе релаксация спинового зонда не будет чувствительна к этому движению. Выше 260 К в сухом лизоциме наблюдается заметный перегиб, который не наблюдался при рассеянии

нейтронов для лизоцима, однако наблюдался методом рассеяния нейтронов при данной температуре для сухого бычьего сывороточного альбумина [169]. Это различие в данных для двух методов может быть связано с различием в экспериментальном временном окне – ЭСЭ обнаруживает движения с  $\tau_c < 10^{-7}$  s, что на несколько порядков больше, чем при рассеянии нейтронов. Вероятно, этот перегиб указывает на переход в сухом лизоциме при 260 К. Однако также метод ЭСЭ позволяет находить температурную зависимость параметра движения, то есть произведения среднеквадратичного угла отклонения и времени корреляции, в то же время метод рассеяния нейтронов позволяет извлекать среднеквадратичное отклонение. Этот вопрос, безусловно, требует дальнейшего изучения.

При сравнении данных гидратированных образцов с ТЕМПОЛом и спин-меченых белков можно отметить, что температурная зависимость скорости анизотропной релаксации совпадает для обоих гидратированных образцов с лизоцимом (рис. 6.3 а). Можно предположить, начало молекулярной подвижности в гидратированном лизоциме при 130 К связано со стеклованием гидратного слоя. Стекловидный характер воды в гидратной оболочке был признан в различных исследованиях [94]. В различных экспериментах предполагалось, что переохлажденная вода претерпевает стеклование около 136 К [112; 170–172]. Эта температура близка к температуре возникновения молекулярной подвижности на рис. 6.3 и 6.4.

Однако поведение температурных зависимостей для образцов с казеином для ТЕМПОЛа и спин-меченого белка резко отличаются между собой (рис. 6.3 б). Рост скорости анизотропной релаксации в казеине с ТЕМПОЛом начинается при больших температурах, становясь более резким с повышением температуры. Данное поведение может указывать на то, что движения в гидратной оболочке казеина и полипептидной цепи казеина происходят более или менее независимо, с ограничениями подвижности белка.

Необходимо отметить, что подвижность в гидратированном казеине возникает при меньшей температуре (100 К), чем в гидратированном лизоциме

(130 К). Данный факт говорит о большей свободе для молекулярных ориентационных движений в матрице казеина при таких низких температурах.

Однако вблизи 120 К в температурной зависимости скорости анизотропной релаксации в образце спин-меченого гидратированного казеина возникает явный изгиб. Поскольку стохастические либрации обусловлены окружением молекулы [155; 161; 173], данный изгиб может означать структурный переход в ближайшем окружении молекулы. Такой переход с замедлением температурной зависимости может возникать, когда доступные степени свободы в структуре внутренне разупорядоченного белка позволяют переупаковку, при которой эта структура становится более плотной и/или более жесткой даже в сравнении с глобулярным белком (лизозима).

Интересно также отметить, что в дегидратированном состоянии (рис. 6.3д) белки демонстрируют схожее поведение, это доказывает, что наблюдаемая особенность – внутреннее свойство гидратированного состояния, то есть, когда они способны функционировать.

В литературе широко известен переход от беспорядка к порядку для внутренне разупорядоченных белков при связывании с партнером [15–22; 163]. Например, данные по нейтронному рассеянию и рассеянию света [174] показали, что  $\beta$ -казеин частично сворачивается и отвердевает при связывании кальция, а также, что в несвязанном состоянии он мягче, чем упакованные белки. Отличие этих описанных случаев от нашего состоит в том, что переход в данной работе происходит с изменением температуры. Отметим, что в литературе такие индуцированные температурой переупаковки в структуре внутренне разупорядоченных белков ранее не наблюдались.

Низкотемпературные молекулярные либрации, наблюдаемые методом импульсного ЭПР для глобулярных белков в других работах, демонстрируют схожее поведение с тем, что наблюдается здесь для лизоцима. Для человеческого альбумина [119], Na,K-насоса [121] и гемоглобина [127] резкий рост скорости анизотропной релаксации наблюдался в диапазоне 160-180 К, что находится в соответствии с данными на рис. 6.3 а. Исследование внутренне

разупорядоченного белка (С-конца ядерного белка вируса Сендай) методом ЯМР релаксации [85] выявило меньшую активационную энергию движения протонов, принадлежащих поверхности белка-растворителя, в сравнении с глобулярными белками.

Ускорение температурной зависимости скорости анизотропной релаксации для гидратированного лизоцима при 180 К рис. 6.3 и 6.4, также может быть связано с движениями молекул воды в гидратной оболочке. Во-первых, потому что и нитроксильный радикал VII (ТЕМПОЛ), и спиновая метка, которые, как ожидается, будут расположены в гидратной оболочке и во внутренней части белка, соответственно, демонстрируют довольно похожее поведение. Во-вторых, на рис. 6.5 дуплет, обусловленный взаимодействием с ядром дейтерия, наблюдаемый при низких температурах, исчезает полностью при 180 К, что говорит о начале переориентаций молекул в гидратной оболочке в микросекундном временном диапазоне при этой температуре. Подобный эффект наблюдался ранее для бислоев [136; 155]. Причина, по которой это не наблюдается при рассеянии нейтронов, опять же может быть в разных экспериментальных временных окнах.

Интересно сравнить данные, полученные для спинового зонда [175] на поверхности, то есть в отсутствие эффекта кооперативности, с данными, полученными для биологических систем. На рис. 6.7 приведены данные для образца  $\text{Tr}i\text{TOAC}4/\text{SiO}_2$  (рис. 3.3),  $\text{Tr}i\text{TOAC}1$  в модельных мембранах POPC и DPPC (данные с рис. 4.2) и спин-меченого лизоцима (данные с рис. 6.4). На рис. 6.7 для лизоцима и бислоев DPPC наблюдается усиление релаксации выше ~160–180 К по сравнению со случаем индивидуального движения на поверхности. Это усиление указывает на то, что появляются различные каналы спиновой релаксации, вызванной движением, которые работают мультипликативным образом; скорее всего, эти релаксационные каналы связаны с кооперативным движением. Рис. 6.7 также показывает, что кооперативные движения могут приводить к скорости  $\Delta W$  намного выше, чем найденная для движений отдельных адсорбированных молекул (так что кооперативные движения выше 160–180 К

доминируют). Между тем, для движения, начинающегося при 100 К (TriTOAC1/POPC рис. 6.7), кооперативные движения, вероятно, возникают даже при этой температуре.

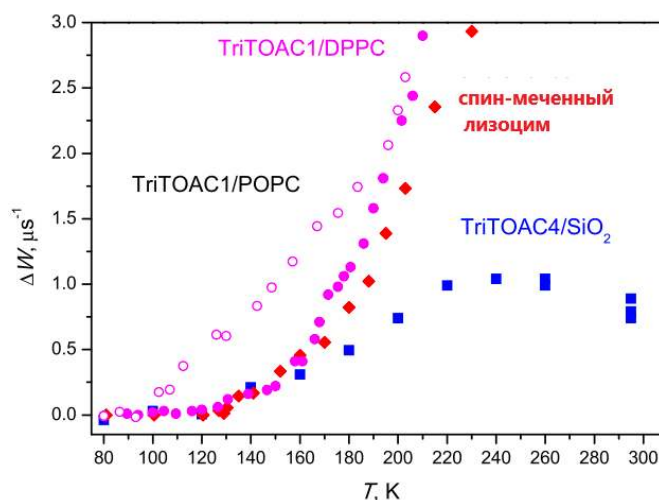


Рисунок 6.7. Сравнение данных для образца TriTOAC4/SiO<sub>2</sub> (квадраты, такие же, как на (рис. 3.3)) с аналогичными данными для спин-меченного лизоцима (рис. 6.4) (ромбы), для спин-меченных пептидов в бислоях DPPC (рис. 4.2) (закрашенные круги) и в бислое POPC (рис. 4.2) (светлые круги).

Данные стационарного ЭПР по температурным зависимостям  $\langle \alpha^2 \rangle$ , имеющиеся в литературе для таких глобулярных белков, как гемоглобин [127; 176], человеческий сывороточный альбумин [119; 176],  $\beta$ -лактоглобулин [176], очень похожи на данные, представленные на рис. 6.6 для лизоцима, где резкий рост  $\langle \alpha^2 \rangle$  начинается приблизительно при 200 К. Температурная зависимость среднеквадратичного отклонения атомов для  $\beta$ -казеина, полученная методом квази-упругого рассеяния нейтронов, демонстрирует два резких роста: 100 К и 240 К [62]. Для внутренне разупорядоченного белка тау резкий рост температурной зависимости наблюдается при 100 К и 250 К [49].

Изгиб температурной зависимости скорости анизотропной релаксации для гидратированного казеина при 120 К можно объяснить как проявление упорядочивания по аналогии с данными, полученными также методом импульсного ЭПР для фосфолипидных бислоев. Данные исследования проводились для конформационно упорядоченных или неупорядоченных липидов: DPPC [122; 123; 155], POPC [124; 155], DOPC [123; 155]. Мембраны из молекул DPPC представляют пример упорядоченной среды, в то время как



мембраны из молекул POPC и DOPC являются примером неупорядоченной среды. Таким образом, можно предположить сходство упаковки лизоцима и гелевой фазы бислоя DPPC, а также казеина и POPC (DOPC). Действительно, стохастические либрации возникают в модельных мембранах при 130 К, в то время как в мембранах POPC и DOPC они возникают уже при 100 К [155; 173].

Имеющиеся данные импульсного ЭПР говорят об универсальности температур начала стохастических либрационных движений, 100 К и 130 К (см. главу 3). Вероятно, при 130 К размораживаются изгибные колебания, а при 100 К – торсионные (см. главу 3)[177]. При этом наблюдаемые в биологических системах стохастические молекулярные либрации являются кооперативным эффектом[175; 177].

Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации для бислоя DOPC начинает расти при 100 К, замедляя свой рост приблизительно при 140К. Данное поведение удалось объяснить, предположив упорядочивание бислоя вблизи 140 К, возникающее благодаря выстраиванию концов хвостов молекулы DOPC параллельно друг другу. Такой переход в гелевой фазе бислоя DOPC оказался обратимым с ростом или понижением температуры (см. главу 5).

На рис. 6.8 к температурным зависимостям для лизоцима и казеина были добавлены данные для модельных мембран DPPC и DOPC. Можно заметить схожее поведение скорости анизотропной релаксации лизоцима и DPPC с одной стороны, казеина и DOPC с другой. Таким образом, можно предположить схожее объяснение изгиба, наблюдаемого для казеина при 120 К: перестройка пептидных остатков в структуре казеина приводит к его упорядочиванию.

Также литературные данные, полученные методом стационарного ЭПР для DPPC, демонстрируют резкий рост среднеквадратичного углового отклонения при 200 К, что согласуется с данными для лизоцима в данной работе. Температурная зависимость  $\langle \alpha^2 \rangle$  для DOPC резкий рост возникает при 240К в случае, когда спиновая метка находится у поверхности бислоя, что согласуется с результатом для казеина. Однако в случае, когда спиновая метка находится в глубине бислоя (метка в шестнадцатом положении углерода ацильного хвоста)

температура смещается к 160 К, то есть движения внутри бислоя DOPC слишком быстрые и сравнивать их с движениями в казеине не представляется возможным.

Можно предположить универсальность температур начала резкого роста температурной зависимости среднеквадратичного углового отклонения, полученной из спектров стационарного ЭПР:  $\sim 200$  К и  $\sim 240$  К для структурированных глобулярных белков и внутренне разупорядоченных белков, соответственно. Данное предположение требует дальнейших исследований.

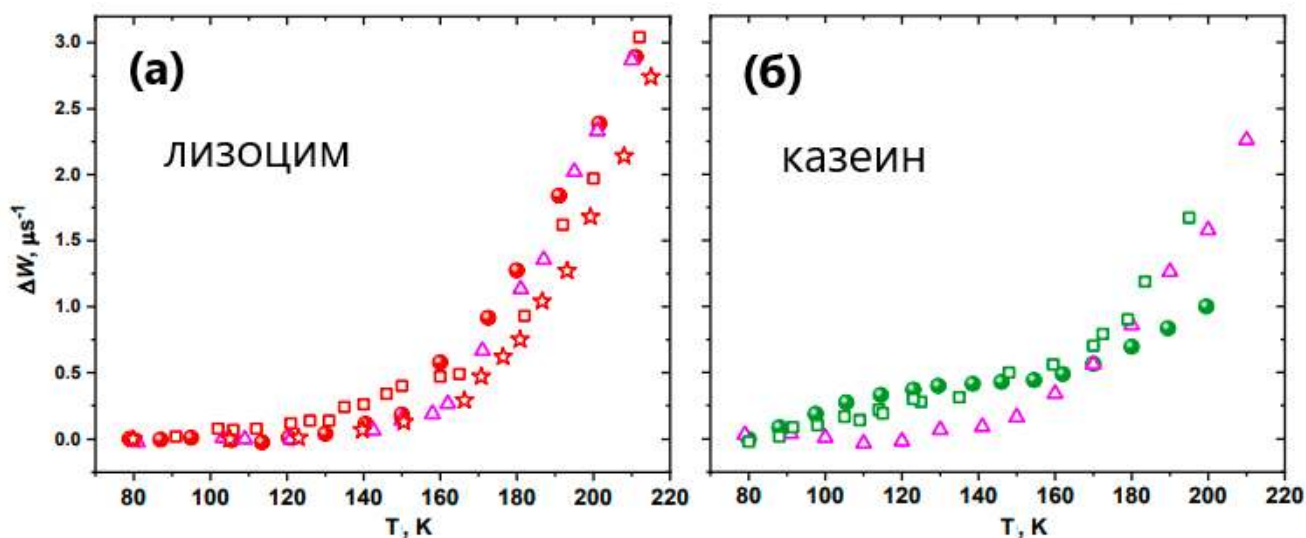


Рисунок 6.8. Температурные зависимости скорости анизотропной релаксации для гидратированных белков (то же, что на рис. 6.4) в сравнении с литературными данными для липидных бислоев: (а) спин-меченый лизоцим (круги), ТЕМПОЛ в лизоциме [161] (треугольники), спин-меченая стеариновая кислота (метка в пятом положении углерода ацильного хвоста) в бислое DPPC (квадраты) [155] и липиды, спин-меченые в области полярной головки в бислое DPPC (звездочки) [155], (б) спин-меченый казеин (круги), ТЕМПОЛ в казеине (треугольники), спин-меченая стеариновая кислота (метка в пятом положении углерода ацильного хвоста) в бислое DOPC (квадраты) [173].

## 6.5. Заключение к главе 6

Результаты данного исследования показывают, что при криогенных температурах (100 – 120 К) внутренне разупорядоченный белок казеин обладает большей внутренней свободой движений, чем структурированный глобулярный белок лизоцим: по данным импульсного ЭПР в первом случае стохастические либрации возникают уже при 100 К, в последнем только выше 130 К. Однако в

случае казеина наблюдается изгиб при 120 К с замедлением роста температурной зависимости выше данной температуры. Данный изгиб можно объяснить переупаковкой казеина с повышением температуры, когда он становится более плотным и/ или жестким.

Альтернативное объяснение может состоять в том, что возникновение стохастических либраций при 130 К и резкий рост температурной зависимости вблизи 180 К в гидратированном лизоциме могут быть связаны со стеклованием нано-ограниченной воды около 136 К [112; 170–172] и началом общих переориентаций молекул воды вблизи 180 К [136; 155]. Это объяснение однако представляется менее вероятным ввиду аналогичного возникновения стохастических либраций при 130 К для молекул, адсорбированных на твердой неорганической поверхности – см. главу 3.

Также обнаружено сходство в подвижности изученных здесь белков и описанных в главах 4 и 5 более простых систем – гелевой фазы липидных бислоев. Такая аналогия может означать схожую упаковку глобулярного белка лизоцима и бислоя, состоящего из конформационно упорядоченных липидов, в то время как упаковка внутренне разупорядоченного белка казеина напоминает таковую для бислоя, состоящего из конформационно неупорядоченных липидов, содержащих двойные связи в каждом из ацильных остатков. В случае последних упорядочивание с ростом температуры можно объяснить возможностью коррелированной перестройки двух липидных остатков таким образом, что надмолекулярная структура становится более упорядоченной. Можно предположить, что обнаруженный здесь переход при 120 К также можно объяснить перестройкой пептидных остатков с большим упорядочением всей структуры.

## ГЛАВА 7. ПЕРЕОХЛАЖДЕННЫЕ ГЛУБОКО-ЭВТЕКТИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ

### 7.1. Описание задачи

Глубоко-эвтектические растворители (ГЭР) вызывают значительный интерес, так как потенциально могут быть использованы в ряде различных технологических областей (см. п. 1.1.3). Для увеличения перечня возможных приложений ГЭР полезно исследовать их структурную организацию и связь между свойствами и структурой. На данный момент понимание о структурно-динамических свойствах ГЭР на молекулярном уровне отсутствует.

ЭПР спиновых зондов в стационарной и импульсной (ЭСЭ) версиях оказался многообещающим инструментом при исследовании особенностей молекулярной упаковки ионных жидкостей (см. п. 1.3.5), к которым иногда относят ГЭР ввиду их ионной структуры. В этих исследованиях были обнаружены неоднородности плотности/жесткость в ионных жидкостях вблизи температуры стеклования  $T_g$  с выявлением наноструктурных аномалий.

В данной работе объектами исследования были выбраны смеси холин хлорид-мочевина (релайн) и холин хлорид -тиомочевина с мольным соотношением 1:2 в обоих случаях. Температуры плавления данных смесей составляют 12 °C (285 K), и 69 °C (342 K), соответственно [25]. Эти смеси исследовали, например, в качестве возможных растворителей для получения нановолокон  $\alpha$ -хитина (диаметром 20–30 нм). Было обнаружено, что только при использовании смеси холин хлорид -тиомочевина получают нановолокна. Таким образом, эти два типа ГЭР в этом отношении обладают разными физико-химическими свойствами. Эти два ГЭР при замораживании могут переохлаждаться, образуя прозрачное стекло при низких температурах. В настоящей работе были изучены структурные особенности релайна и смеси холин хлорид – мочевина методом ЭПР спиновых зондов.

## 7.2. Образцы

Холина хлорид был синтезирован по стандартной методике Барановым Д. С (ИХКГ СО РАН, Новосибирск). Температура плавления полученного холин-хлорида совпадает с литературными данными ( $303^{\circ}\text{C}$ ) [25]. Холина хлорид был смешан с мочевиной (или с тиомочевиной) в молярном соотношении 1:2, обе смеси были нагреты до  $80^{\circ}\text{C}$  при постоянном перемешивании. Раствор с мочевиной был охлажден до комнатной температуры, затем оба раствора были перелиты в стеклянные ампулы для ЭПР-исследований. Для измерений ниже комнатной температуры растворы были мгновенно заморожены в жидком азоте и представляли собой прозрачное стекло.

## 7.3. Результаты

Все спектры стационарного ЭПР были получены в режиме повышения температуры от 78 К. Оба образца – с мочевиной и тиомочевиной – являлись прозрачными стеклами вплоть до 270 К. Выше 270 К происходила кристаллизация обоих образцов, поэтому при данной температуре измерения были прекращены. Для смеси холин хлорид – мочевина (так называемый релайн) также был получен стационарный спектр при 298 К (комнатная температура), при которой образец находится в жидком состоянии.

На рис. 7.1 приведены стационарные спектры ЭПР при различных температурах. Спектры нормированы на второй интеграл, таким образом, спектральная интенсивность пропорциональна полной абсорбции. При низких температурах спектры уширены из-за анизотропии g-фактора и сверхтонких взаимодействий. Можно заметить, что форма спектра значительно меняется с ростом температуры, для удобства восприятия спектры были разделены на две группы – ниже и выше 254 К. Ниже 254 К спектры соответствуют спектрам иммобилизованных нитроксильных радикалов, наблюдается только незначительное сужение спектральных линий, которое может быть объяснено к

вращением метильных групп в холине. Выше 254 К появляется примесь вращательных движений самой молекулы темпона.

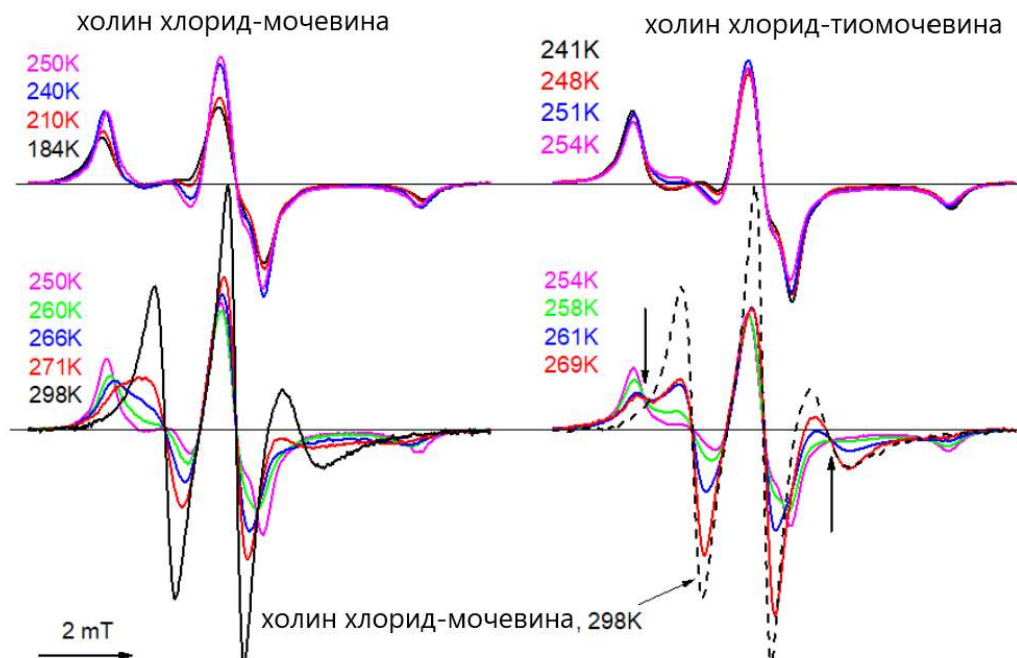


Рисунок 7.1 Спектры стационарного ЭПР при различных температурах для ТЕМПОНА в релайне (слева) и холин хлорид – тиомочевина (справа). Спектры нормированы на их второй интеграл. Пунктирная линия внизу справа – спектр для релайна при 298 К, стрелки указывают на изобестические точки.

Спектры на рис. 7.1 можно объяснить смесью подвижной и неподвижной компонент (моделирование аналогичных спектров проведено для застеклованных ионных жидкостей [128; 129; 131]). Можно заметить, что для смеси холин хлорид – тиомочевина возникают две изобестические точки (рис. 7.1, внизу справа) – спектральные точки, в которых интенсивность не меняется с температурой. Появление таких точек в абсорбционных спектрах означает суперпозицию двух типов спектра с определенной формой линий. Однако для релайна изобестические точки довольно размыты. (Для первых производных линий поглощения, как это имеет место для спектров ЭПР, спектральные точки с неизменной нулевой интенсивностью не могут рассматриваться как изобестические точки – эти точки означают только то, что положения спектральных экстремумов не меняются.)

Для релайна при 298 К неподвижный вклад на рис. 7.1 исчезает. Данная форма линии может быть промоделирована в предположении, что молекула темпона изотропно меняет свою ориентацию с временем корреляции вращения примерно 1 нс [131].

Спады спинового эха  $E_1(2\tau)$ , полученные в спектральном максимуме (определенном из эхо-детектированного спектра при различных температурах) представлены в полулогарифмической шкале на рис. 7.2. Можно увидеть сильную зависимость спадов от температуры: они становятся быстрее с ростом температуры вплоть до 160 К (или 170 К), а затем замедляются (что хорошо видно из данных при 191 К на рис. 7.2, вверху). Данные, полученные для релайна выше 191 К снова демонстрируют ускорение спадов (данные не приведены). Наблюдаемые на рис. 7.2 осцилляции вызваны сверхтонким взаимодействием неспаренного электрона спинового зонда с протонами матрицы.

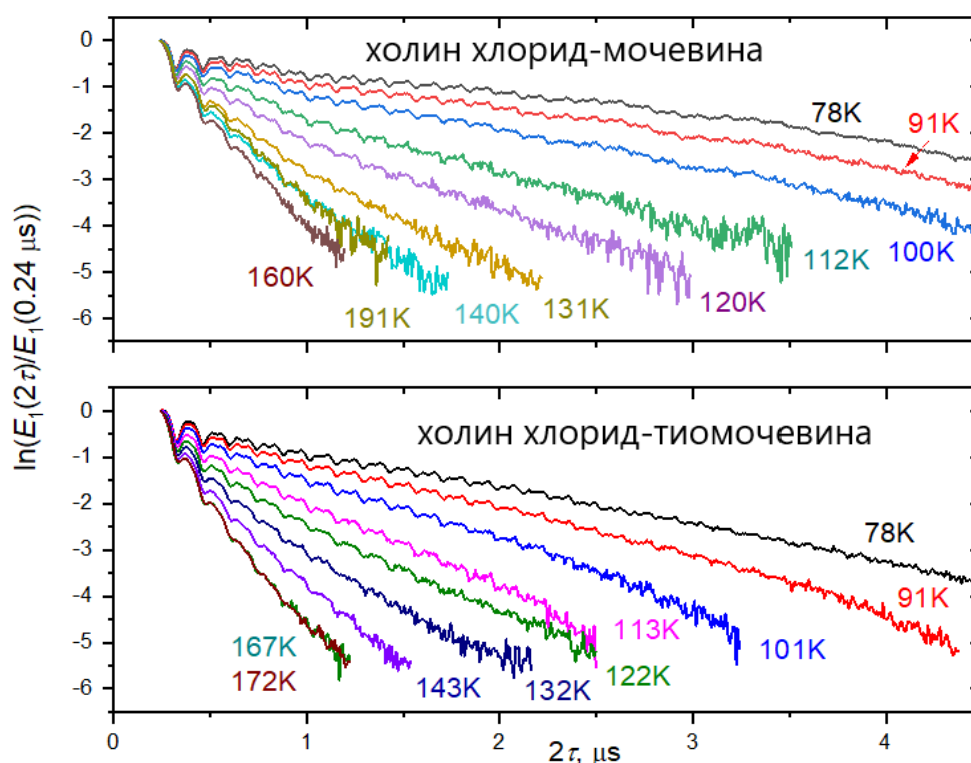


Рис. 7.2 Спады спинового эха при различных температурах для ТЕМПОНА в полулогарифмической шкале для релайна (вверху) и смеси холин хлорид – тиомочевина (внизу).

Широко известно, что спады электронного спинового эха нитроксильных радикалов ускоряются вращением их собственных метильных групп. Однако в таком случае наиболее быстрая релаксация наблюдается при 130 К [178]. Мы здесь предполагаем, что ускорение релаксации при 160-170 К возникает вследствие, молекулярных движений метильных групп, принадлежащих катиону аммония холин хлорида. А последующее ускорение выше 191 К вызвано термически активированными релаксационными процессами в материале.

Эхо-детектированные спектры, полученные при фиксированной задержке  $\tau$  между двумя импульсами, формирующими эхо, для различных температур приведены на рис. 7.3. Для лучшего восприятия спектры нормированы на их максимумы. Форма спектра меняется с температурой: 1) с ростом температуры две боковые компоненты становятся ниже относительно центральной, 2) данный спад наиболее интенсивен в центре высокопольной компоненты, в то же время крайние положения в спектре менее подвержены данным изменениям.

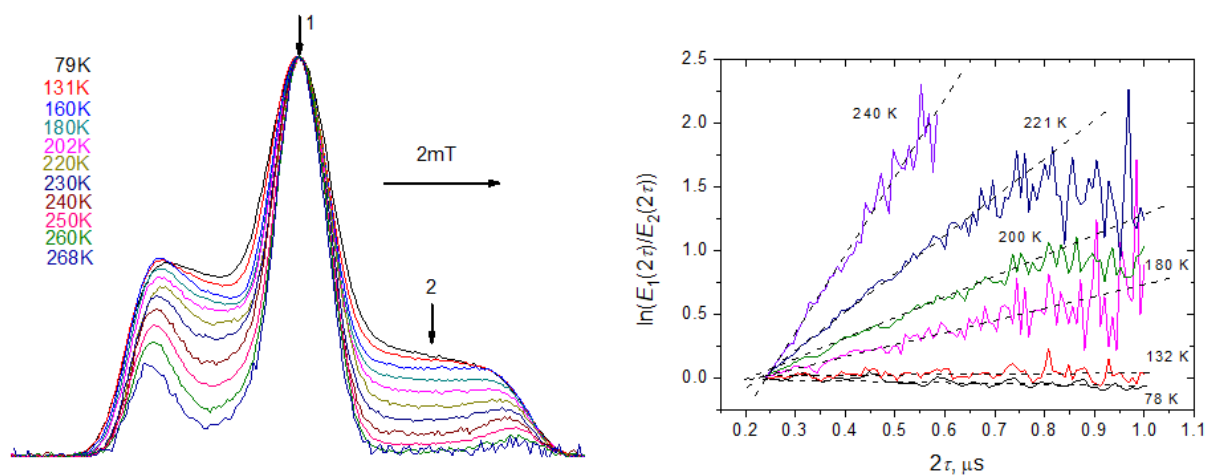


Рисунок 7.3 Слева: эхо-детектированные спектры ЭПР при различных температурах и фиксированной задержке  $\tau=120$  нс. Справа: Репрезентативные отношения спадов в двух спектральных позициях,  $E_1(2\tau)$  и  $E_2(2\tau)$ , в полулогарифмической шкале. Данные сдвинуты в одну точку при  $2\tau=0,24$  мкс, пунктирные линии – линейные аппроксимации. Образец – ТЕМПОН в релайне.

Эти две особенности можно объяснить моделью стохастических либраций – малоамплитудных стохастических ориентационных молекулярных движений. В импульсных экспериментах импульсы возбуждают небольшую долю спектра в



спектральных позициях с различной анизотропией, приводящей к различным скоростям поперечной релаксации. Таким образом, стохастические молекулярные либрации проявляются в экспериментах по двух-импульсному электронному спиновому эху как спады с различными скоростями для различных спектральных позиций: для спектральной позиции с большей анизотропией спад быстрее. Так как обе боковые компоненты более анизотропны, чем центральная можно наблюдать такую температурную зависимость формы линии спектра как на рис. 7.3. Более быстрая релаксация в середине боковых компонент возникает, поскольку крайние точки спектра отвечают за параллельные ориентации внешнего магнитного поля относительно ориентации р-орбитали неспаренного электрона, являясь менее чувствительными к ориентационным движениям.

На спад электронного спинового эха оказывают влияние и другие механизмы, большинство из которых не зависят от положения по полю. Исключением является «мгновенная диффузия», которая зависит от локальной концентрации парамагнитных центров. Следовательно, при обработке данных таким образом, как приведено справа на рис. 7.3, становится возможным исключение всех вкладов за исключением молекулярных стохастических либраций.

На рис. 7.4 приведены температурные зависимости скоростей анизотропной релаксации для темпона в релайне и растворе холин хлорид – тиомочевина, а также литературные данные для спин-меченого бисля DPPC [155].

Скорость анизотропной релаксации найдена из наклона прямых линий, аппроксимирующих отношение спадов  $E_1(2\tau)$  и  $E_2(2\tau)$  в полулогарифмической шкале (как показано справа на рис. 7.3). Спады  $E_1(2\tau)$  и  $E_2(2\tau)$  получены в положениях спектра с наименьшей и наибольшей анизотропией, соответственно, которые указаны слева на рис. 7.3. Данные получены в режиме роста температуры от 78 К. Верхний предел по температуре определялся ускорением спадов, когда сигнал становился слишком слабым. Из рис. 7.4 можно заметить значительное различие в поведении температурных зависимостей скоростей анизотропной релаксации для двух глубоко-эвтектических растворителей (ГЭР): для смеси

холин хлорид – тиомочевина резкий рост скорости анизотропной релаксации наблюдается выше 160 К, в то время как рост температурной зависимости для релайна более растянут по температуре, начинаясь однако уже при 130 К.

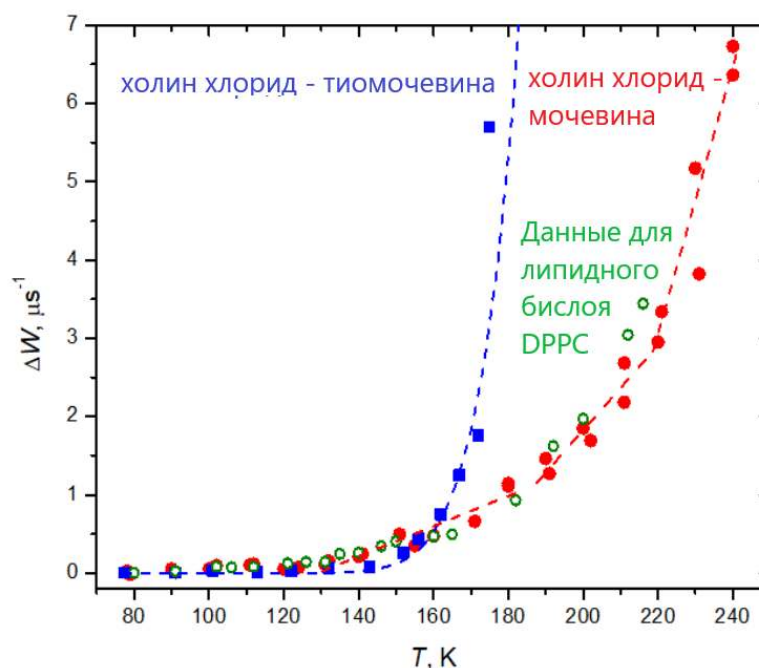


Рисунок 7.4 Значения скорости анизотропной релаксации, полученные из наклонов линейных зависимостей, подобных представленным на рис. 7.3, при различных температурах. Закрашенные круги – релайн, закрашенные квадраты – холин хлорид – тиомочевина, открытые круги – литературные данные для спин-меченого бислоя DPPC [155]. Пунктирные линии приведены для удобства восприятия.

#### 7.4. Обсуждение

На основании стационарных спектров, приведенных на рис. 7.1 можно предположить, что темпон находится в двух различных окружениях – твердом и жидком, с иммобилизованной и подвижной фракциями, соответственно. В стационарном ЭПР термин «иммобилизованная» подразумевает время корреляции движения молекулы целиком  $\tau_R$  больше 100 нс, для подвижной фракции время в данной работе оно приблизительно  $\sim 1$  нс.

Возникновение изобестических точек в температурной серии стационарных спектров смеси холин хлорид – тиомочевина (рис. 7.1, внизу) означает: 1) довольно резкие границы между твердой и жидкой фазой, 2) характеристики

движения подвижной фракции с температурой не меняется (в температурном диапазоне существования двух фаз).

Можно предположить правомерность выражения Стокса-Эйнштейна-Дебая для темпона в жидкой среде:

$$\tau_R = \frac{4\pi a^3 \eta}{3 kT}, \quad (7.1)$$

здесь  $a$  – молекулярный радиус молекулы нитроксильного радикала (в сферической аппроксимации),  $\eta$  – коэффициент вязкости. Ранее измерено, что для релайна при 298 К  $\eta=6,32$  Пуаз [25]. Взяв  $\tau_R=10^{-9}$  с, можно получить, что  $a=1.2$ А, что вполне правдоподобно для молекулы темпона. С другой стороны факт слабой зависимости стационарных спектров от температуры (наличие изобестических точек это подтверждает) говорит о том, что микровязкость в жидких каплях также меняется очень слабо с температурой и находится вблизи 10 Пуаз.

Спектры иммобилизованной фракции позволяют оценить время корреляции  $\tau_R < 10^{-7}$  с, таким образом, микровязкость твердой фазы больше 1000 Пуаз.

Сосуществование твердой и жидкой фаз предполагает гетерогенность микроструктуры. Гетерогенность структуры в ГЭР уже предполагалась в ряде работ [32; 33; 179; 180], выполненных различными методами. Схожее явление было также обнаружено в ионных жидкостях [128–130; 133; 134]. Для ионных жидкостей, распыленных на поверхности слюды, методом атомной силовой спектроскопии также удалось наблюдать сосуществование жидкой и твердой фаз с размером жидких капель 50-300 нм [181]. Возможно, данная оценка правомерна для ГЭР изучаемых в данной работе. Поскольку во время исследования образцы не теряли своей прозрачности, размер гетерогенности не больше 200 нм. Достоинством ЭПР является возможность измерения вязкости в жидких каплях. Отметим, что данные на рисунке 7.4 не свидетельствуют о наличии в исследованных ГЭР структурных аномалий, найденных в ионных жидкостях [128–134], которые характеризовались значительным уменьшением подвижности выше 160 К.

Данные по стохастическим молекулярным либрациям (рис. 7.4) позволяют сделать дополнительные выводы о микроструктуре ГЭР. Исследование стохастических либраций позволяет делать выводы о надмолекулярной упаковке вещества. Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации отражает жесткость/мягкость молекулярной упаковки молекулярной системы: в более мягких системах более слабая температурная зависимость, а также наблюдается более раннее начало роста скорости анизотропной релаксации (наблюдалось для липидных мембран [99; 122; 155]). На рис. 7.4 видно резкое отличие данных: температурная зависимость скорости анизотропной релаксации для релайна в сравнении с зависимостью для смеси холин хлорид – тиомочевина более слабая и начинает расти при более низкой температуре (130 К для релайна и 150К для раствора холин хлорид – тиомочевина). Такая разница предполагает, что надмолекулярная упаковка раствора холин хлорид – тиомочевина более жесткая. Данный вывод согласуется с данными стационарного ЭПР, рассмотренными выше.

Резкий рост скорости анизотропной релаксации для раствора с тиомочевинной при 160 К выглядит как фазовый переход. Однако образец визуально при данной температуре не меняется, таким образом, маловероятно наличие макроскопического перехода. Также можно предположить, что речь идет о переходе исключительно на микроскопическом уровне. Однако данный переход не приводит к формированию жидкой подфазы, так как жидкая фаза наблюдается в стационарных спектрах ЭПР для темпона выше 240 К (рис. 7.1). Природа данного перехода не ясна и требует дальнейших исследований.

Интересно отметить, что температурная зависимость  $\Delta W$  для релайна совпадает с ранее полученной для липидного бислоя, состоящего из молекул DPPC, со встроенной стеариновой кислотой, спин-меченой в пятом положении [155] (которая в свою очередь близка к температурной зависимости для глобулярного белка лизоцима [161]), данные приведены на рис. 4. Такое совпадение температурных зависимостей может указывать на схожую жесткость надмолекулярной упаковки релайна и биологических системах. Такое совпадение

может быть важной задачей при отборе ГЭР для биотехнологических процессов [182; 183], доставки лекарств в живых организмах [184–186], для проблем биосовместимости [187]. Значение такой близости температурных зависимостей требует дальнейших исследований.

### 7.5. Заключение к главе 7

Результаты данной работы показывают, что метод ЭПР позволяет получать информацию о структурном устройстве ГЭР на молекулярном уровне. Данные стационарного ЭПР прямо указывает на сосуществование двух фаз в переохлажденных ГЭР. Время корреляции вращения  $\tau_R$  для жидких капель в обоих ГЭР лежит в наносекундном временном диапазоне и слабо зависит от температуры. Отсюда следует, что микровязкость в этих жидких каплях также слабо зависит от температуры и составляет величину порядка 10 Пуаз.

Стационарный ЭПР также позволяет получить информацию о резком характере границ между двумя фазами в ГЭР, спектры ЭПР при различных температурах, нормированные на двойной интеграл имеют изосбестические точки. Такие точки могут быть четкими или диффузными, показывая, что границы между двумя фазами четкие или диффузные, соответственно. В данной работе первый случай обнаружен для растворителя холин хлорид – тиомочевина, второй для релайна.

Стохастические молекулярные либрации, детектируемые импульсным методом, демонстрируют резкое начало при 160 К для растворителя холин хлорид – тиомочевина и 130 К для релайна, с началом растянутым по температуре в последнем случае. Такое поведение было интерпретировано как свидетельство более жесткой молекулярной упаковки в случае первой смеси, что также подтверждается данными стационарного ЭПР.

Температурная зависимость стохастических молекулярных либраций для растворителя оказалась близкой к ранее наблюдаемым для биологических систем. Это сходство предполагает близость жесткости молекулярной упаковки в

наномасштабе для этих молекулярных систем, что может говорить о пользе таких исследований для определения биосовместимости ГЭР. Однако данное утверждение требует дальнейших исследований.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Сопоставление данных для спин-меченых молекул разного размера в модельных мембранах разного типа показало, что наблюдаемые в импульсном ЭПР малоамплитудные движения слабо зависят от типа молекулы и определяются в основном типом мембраны, то есть движения являются кооперативными и определяются молекулярной упаковкой. Таким образом, для известного ранее из данных по рассеянию нейтронов так называемого динамического перехода в биологических и молекулярных системах выяснено, что за этот переход отвечают кооперативные движения молекул.

Для адсорбированных на поверхности спин-меченых молекул отсутствие в этом случае эффектов кооперативности позволило сделать выводы о преобладании для разных типов молекул либо крутильных (торсионных), либо изгибных типов движений. Причем крутильные движения наблюдаются начиная с 100 К, изгибные – начиная с 130 К.

Данные две температуры начала движений – 100 К и 130 К – наблюдались также и для исследованных в настоящей работе биологических систем: липидных мембран DPPC (130 К), POPC и DOPC (100 К), глобулярного белка лизоцима (130 К) и внутренне разупорядоченного белка казеина (100 К). Можно предполагать, что эти совпадения свидетельствуют об универсальном характере лежащих в основе этих движений закономерностей наноструктуры вещества.

Для модельных мембран двукратно ненасыщенного липида DOPC температурная зависимость движений свидетельствуют об обратимой с температурой переупаковке двух концевых сегментов ацильных «хвостов» липидов в диапазоне температур 130 – 170 К.

Для внутренне разупорядоченного белка казеина температурная зависимость движений оказалась очень близкой к таковой для модельных мембран DOPC, что позволяет утверждать, что в казеине также имеет место коррелированная переупаковка сегментов белковой молекулы.

Для застеклованных глубоко-эвтектических растворителей холин хлорид – тиомочевина и холин хлорид – мочеви́на показано, что в первом случае жесткость молекулярной упаковки заметно выше, чем во втором. Обнаружено сосуществование двух фаз с четкими границами для первого случая и диффузными для второго, оценена микровязкость жидкой фазы, которая оказалась близкой к 10 пуазам.



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ГЭР – глубоко-эвтектические растворители  
ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия  
ИЖ – ионные жидкости  
МД – молекулярная динамика  
ССЭ – стимулированное спиновое эхо  
СТВ – сверхтонкое взаимодействие  
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс  
ЭСЭ – электронное спиновое эхо  
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Sackmann E. Biological Membranes Architecture and Function, in Handbook of Biological Physics / E. Sackmann // Physics. – 1995. – Vol. 1. – P. 1-63.
2. Watson H. Biological membranes / H. Watson // Essays in Biochemistry. – 2015. – Vol. 59. – P. 43-70.
3. Deuteron Nuclear Magnetic Resonance Study of the Dynamic Organization of Phospholipid/Cholesterol Bilayer Membranes: Molecular Properties and Viscoelastic Behavior / K. Weisz, G. Gröbner, C. Mayer [et al.] // Biochemistry. – 1992. – Vol. 31. – № 4. – P. 1100-1112.
4. Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine / H. Hauser, I. Pascher, R. H. Pearson, S. Sundell // BBA - Reviews on Biomembranes. – 1981. – Vol. 650. – № 1. – P. 21-51.
5. Seelig J. Lipid conformation in model membranes and biological membranes / J. Seelig, A. Seelig // Quarterly Reviews of Biophysics. – 1980. – Vol. 13. – № 1. – P. 19-61.
6. Cooke I. R. Tunable generic model for fluid bilayer membranes / I. R. Cooke, K. Kremer, M. Deserno // Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics. – 2005. – Vol. 72. – № 1. – P. 2-5.
7. Seelig A. Effect of a Single Cis Double Bond on the Structure of a Phospholipid Bilayer / A. Seelig, J. Seelig // Biochemistry. – 1977. – Vol. 16. – № 1. – P. 45-50.
8. Current Issues in Plant Cryopreservation / A. Kaczmarczyk, B. Funnekotter, A. Menon [et al.] // Current Frontiers in Cryobiology. – InTech, 2012. – P. 417.
9. Feigenson G. W. Phase boundaries and biological membranes / G. W. Feigenson // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. – 2007. – Vol. 36. – P. 63-77.
10. Toward Chemically Resolved Computer Simulations of Dynamics and Remodeling of Biological Membranes / T. A. Soares, S. Vanni, G. Milano, M. Cascella // Journal of Physical Chemistry Letters. – 2017. – Vol. 8. – № 15. – P. 3586-3594.
11. Blundell T. L. The first resolution revolution in protein structure analysis: X-ray

- diffraction of polypeptide conformations and globular protein folds in 1950s and 1960s / T. L. Blundell // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 167. – P. 32-40.
12. Wüthrich K. The way to NMR structures of proteins / K. Wüthrich // *Nature Structural Biology*. – 2001. – Vol. 8. – № 11. – P. 923-925.
  13. Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution / C. C. F. BLAKE, D. F. KOENIG, G. A. MAIR [et al.] // *Nature*. – 1965. – Vol. 206. – № 4986. – P. 757-761.
  14. Arai M. Unified understanding of folding and binding mechanisms of globular and intrinsically disordered proteins / M. Arai // *Biophysical Reviews*. – 2018. – Vol. 10. – № 2. – P. 163-181.
  15. Wright P. E. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation / P. E. Wright, H. J. Dyson // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 18-29.
  16. Uversky V. N. Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins / V. N. Uversky // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. – 2013. – Vol. 1834. – № 5. – P. 932-951.
  17. Oldfield C. J. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions / C. J. Oldfield, A. K. Dunker // *Annual Review of Biochemistry*. – 2014. – Vol. 83. – P. 553-584.
  18. Intrinsically disordered proteins and structured proteins with intrinsically disordered regions have different functional roles in the cell / A. Deiana, S. Forcelloni, A. Porrello, A. Giansanti // *PLoS ONE*. – 2019. – Vol. 14. – № 8. – P. 1-16.
  19. Drake J. A. Physical Chemistry of the Protein Backbone: Enabling the Mechanisms of Intrinsic Protein Disorder / J. A. Drake, J. A. Drake, B. M. Pettitt // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2020. – Vol. 124. – № 22. – P. 4379-4390.
  20. Hosoya Y. Intrinsically Disordered Proteins as Regulators of Transient Biological Processes and as Untapped Drug Targets / Y. Hosoya, J. Ohkanda // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 8. – P. 2118.
  21. Uversky V. N. Supramolecular Fuzziness of Intracellular Liquid Droplets:

- Liquid–Liquid Phase Transitions, Membrane-Less Organelles, and Intrinsic Disorder / V. N. Uversky // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 18. – P. 3265.
22. Dyson H. J. NMR illuminates intrinsic disorder / H. J. Dyson, P. E. Wright // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2021. – Vol. 70. – P. 44-52.
23. A Switch between Two Intrinsically Disordered Conformational Ensembles Modulates the Active Site of a Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor / G. Sicoli, T. Kress, H. Vezin [et al.] // *Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2020. – Vol. 11. – № 21. – P. 8944-8951.
24. Structural and Aggregation Features of a Human  $\kappa$ -Casein Fragment with Antitumor and Cell-Penetrating Properties / O. A. Chinak, A. V. Shernyukov, S. S. Ovcherenko [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 16. – P. 2919.
25. Smith E. L. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications / E. L. Smith, A. P. Abbott, K. S. Ryder // *Chemical Reviews*. – 2014. – Vol. 114. – № 21. – P. 11060-11082.
26. Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century / A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso [et al.] // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. – 2014. – Vol. 2. – № 5. – P. 1063-1071.
27. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications / B. B. Hansen, S. Spittle, B. Chen [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2021. – Vol. 121. – № 3. – P. 1232-1285.
28. Preparation of novel, moisture-stable, lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains / A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies [et al.] // *Chemical Communications*. – 2001. – Vol. 1. – № 19. – P. 2010-2011.
29. Hayes R. Structure and Nanostructure in Ionic Liquids / R. Hayes, G. G. Warr, R. Atkin // *Chemical Reviews*. – 2015. – Vol. 115. – № 13. – P. 6357-6426.
30. Weingärtner H. Understanding ionic liquids at the molecular level: Facts, problems, and controversies / H. Weingärtner // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2008. – Vol. 47. – № 4. – P. 654-670.
31. Egorova K. S. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine / K. S. Egorova, E. G. Gordeev, V. P. Ananikov //

Chemical Reviews. – 2017. – Vol. 117. – № 10. – P. 7132-7189.

32. Kaur S. Microstructure of Deep Eutectic Solvents: Current Understanding and Challenges / S. Kaur, M. Kumari, H. K. Kashyap // Journal of Physical Chemistry B. – 2020. – Vol. 124. – № 47. – P. 10601-10616.

33. Rajbangshi J. Heterogeneous Orientational Relaxations and Translation-Rotation Decoupling in (Choline Chloride + Urea) Deep Eutectic Solvents: Investigation through Molecular Dynamics Simulations and Dielectric Relaxation Measurements / J. Rajbangshi, K. Mukherjee, R. Biswas // Journal of Physical Chemistry B. – 2021. – Vol. 125. – № 22. – P. 5920-5936.

34. Kaur S. Nanoscale Spatial Heterogeneity in Deep Eutectic Solvents / S. Kaur, A. Gupta, H. K. Kashyap // Journal of Physical Chemistry B. – 2016. – Vol. 120. – № 27. – P. 6712-6720.

35. Translational and reorientational dynamics in deep eutectic solvents / D. Reuter, P. Münzner, C. Gainaru [et al.] // The Journal of Chemical Physics. – 2021. – Vol. 154. – № 15. – P. 154501.

36. Glass transition dynamics and conductivity scaling in ionic deep eutectic solvents: The case of (acetamide + lithium nitrate/sodium thiocyanate) melts / S. N. Tripathy, Z. Wojnarowska, J. Knapik [et al.] // The Journal of Chemical Physics. – 2015. – Vol. 142. – № 18. – P. 184504.

37. Solvation and transport of lithium ions in deep eutectic solvents / H. Srinivasan, V. K. Sharma, R. Mukhopadhyay, S. Mitra // The Journal of Chemical Physics. – 2020. – Vol. 153. – № 10. – P. 104505.

38. Benedetto A. Elastic scattering spectroscopy (ESS): An instrument-concept for dynamics of complex (Bio-) systems from elastic neutron scattering / A. Benedetto, G. J. Kearley // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – № September. – P. 1-9.

39. Thermal behaviour of hydrated lysozyme in the presence of sucrose and trehalose by EINS / S. Magazù, F. Migliardo, A. Benedetto [et al.] // Journal of Non-Crystalline Solids. – 2011. – Vol. 357. – № 2. – P. 664-670.

40. Magazù S. Puzzle of protein dynamical transition / S. Magazù, F. Migliardo, A. Benedetto // Journal of Physical Chemistry B. – 2011. – Vol. 115. – № 24. – P. 7736-

7743.

41. Dynamic Neutron Scattering by Biological Systems / J. C. Smith, P. Tan, L. Petridis, L. Hong // *Annual Review of Biophysics*. – 2018. – Vol. 47. – № March. – P. 335-354.
42. Protein dynamics studied by neutron scattering / F. Gabel, D. Bicout, U. Lehnert [et al.] // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 2002. – Vol. 35. – № 4. – P. 327-367.
43. Paciaroni A. Effect of the environment on the protein dynamical transition: A neutron scattering study / A. Paciaroni, S. Cinelli, G. Onori // *Biophysical Journal*. – 2002. – Vol. 83. – № 2. – P. 1157-1164.
44. Dynamical transition of myoglobin in a crystal: Comparative studies of X-ray crystallography and Mössbauer spectroscopy / S. H. Chong, Y. Joti, A. Kidera [et al.] // *European Biophysics Journal*. – 2001. – Vol. 30. – № 5. – P. 319-329.
45. Semenov V. G. Analytical potential of Mössbauer spectroscopy / V. G. Semenov, L. N. Moskvina, A. A. Efimov // *Russian Chemical Reviews*. – 2006. – Vol. 75. – № 4. – P. 317-327.
46. Doster W. Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering / W. Doster, S. Cusack, W. Petry // *Nature*. – 1989. – Vol. 337. – № 6209. – P. 754-756.
47. Мейерович А. Э. Дебая–Уоллера фактор / Мейерович А. Э. // *Физическая энциклопедия*. – Советская энциклопедия, 1988. – С. 574.
48. Doster W. The dynamical transition of proteins, concepts and misconceptions / W. Doster // *European Biophysics Journal*. – 2008. – Vol. 37. – № 5. – P. 591-602.
49. Dynamical Coupling of Intrinsically Disordered Proteins and Their Hydration Water: Comparison with Folded Soluble and Membrane Proteins / F.-X. Gallat, A. Laganowsky, K. Wood [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2012. – Vol. 103. – № 1. – P. 129-136.
50. Dynamics of well-folded and natively disordered proteins in solution: A time-of-flight neutron scattering study / A. M. Gaspar, M. S. Appavou, S. Busch [et al.] // *European Biophysics Journal*. – 2008. – Vol. 37. – № 5. – P. 573-582.
51. Dynamics of Biological Macromolecules: Not a Simple Slaving by Hydration

- Water / S. Khodadadi, J. H. Roh, A. Kisliuk [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2010. – Vol. 98. – № 7. – P. 1321-1326.
52. Nienhaus G. U. Structural fluctuations in glass-forming liquids: Mössbauer spectroscopy on iron in glycerol / G. U. Nienhaus, H. Frauenfelder, F. Parak // *Physical Review B*. – 1991. – Vol. 43. – № 4. – P. 3345-3350.
53. Fast dynamics of glass-forming glycerol / J. Wuttke, W. Petry, G. Coddens, F. Fujara // *Physical Review E*. – 1995. – Vol. 52. – № 4. – P. 4026-4034.
54. Dynamic anomaly in the glass transition region of orthoterphenyl - A neutron scattering study / W. Petry, E. Bartsch, F. Fujara [et al.] // *Zeitschrift für Physik B Condensed Matter*. – 1991. – Vol. 83. – № 2. – P. 175-184.
55. Vibrational states of glassy and crystalline orthoterphenyl / A. Tölle, H. Zimmermann, F. Fujara [et al.] // *European Physical Journal B*. – 2000. – Vol. 16. – № 1. – P. 73-80.
56. Tölle A. Neutron scattering studies of the model glass former ortho-terphenyl / A. Tölle // *Reports on Progress in Physics*. – 2001. – Vol. 64. – № 11. – P. 1473-1532.
57. Plazanet M. Anharmonicity in a fragile glass-former probed by inelastic neutron scattering / M. Plazanet, H. Schober // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2008. – Vol. 10. – № 37. – P. 5723-5729.
58. Tarek M. Role of Protein-Water Hydrogen Bond Dynamics in the Protein Dynamical Transition / M. Tarek, D. J. Tobias // *Physical Review Letters*. – 2002. – Vol. 88. – № 13. – P. 4.
59. Schiró G. Anharmonic onsets in polypeptides revealed by neutron scattering: Experimental evidences and quantitative description of energy resolution dependence / G. Schiró // *Biophysical Chemistry*. – 2013. – Vols. 180-181. – P. 29-36.
60. Doster W. The protein-solvent glass transition / W. Doster // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. – 2010. – Vol. 1804. – № 1. – P. 3-14.
61. Magazù S. Mean Square Displacements from Elastic Incoherent Neutron Scattering Evaluated by Spectrometers Working with Different Energy Resolution on Dry and Hydrated (H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O) Lysozyme / S. Magazù, F. Migliardo, A. Benedetto // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – Vol. 114. – № 28. –

P. 9268-9274.

62. Dhindsa G. K. Temperature-dependent dynamics of dry and hydrated  $\beta$ -casein studied by quasielastic neutron scattering / G. K. Dhindsa, M. Tyagi, X. Q. Chu // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Vol. 118. – № 37. – P. 10821-10829.
63. Dynamics of tRNA at different levels of hydration / J. H. Roh, R. M. Briber, A. Damjanovic [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2009. – Vol. 96. – № 7. – P. 2755-2762.
64. Fitter J. The temperature dependence of internal molecular motions in hydrated and dry  $\alpha$ -amylase: The role of hydration water in the dynamical transition of proteins / J. Fitter // *Biophysical Journal*. – 1999. – Vol. 76. – № 2. – P. 1034-1042.
65. Coincidence of dynamical transitions in a soluble protein and its hydration water: Direct measurements by neutron scattering and MD simulations / K. Wood, A. Frölich, A. Paciaroni [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – № 14. – P. 4586-4587.
66. Tobias D. J. Hydration dynamics of purple membranes / D. J. Tobias, N. Sengupta, M. Tarek // *Faraday Discuss.* – 2009. – Vol. 141. – P. 99-116.
67. Observation of fragile-to-strong dynamic crossover in protein hydration water / S. H. Chen, L. Liu, E. Fratini [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103. – № 24. – P. 9012-9016.
68. The origin of the dynamic transition in proteins / S. Khodadadi, S. Pawlus, J. H. Roh [et al.] // *The Journal of Chemical Physics*. – 2008. – Vol. 128. – № 19. – P. 195106.
69. Becker T. Energy resolution and dynamical heterogeneity effects on elastic incoherent neutron scattering from molecular systems / T. Becker, J. C. Smith // *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*. – 2003. – Vol. 67. – № 2. – P. 8.
70. Neutron frequency windows and the protein dynamical transition / T. Becker, J. A. Hayward, J. L. Finney [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2004. – Vol. 87. – № 3. – P. 1436-1444.
71. Surovtsev N. V. Conformational changes of lipids in bilayers at the dynamical transition near 200 K seen by raman scattering / N. V. Surovtsev, S. A. Dzuba // *Journal*



- of Physical Chemistry B. – 2009. – Vol. 113. – № 47. – P. 15558-15562.
72. Surovtsev N. V. Raman study of low-frequency modes in three glycine polymorphs / N. V. Surovtsev, V. K. Malinovsky, E. V. Boldyreva // The Journal of Chemical Physics. – 2011. – Vol. 134. – № 4. – P. 045102.
73. Surovtsev N. V. Flexibility of phospholipids with saturated and unsaturated chains studied by Raman scattering: The effect of cholesterol on dynamical and phase transitions / N. V. Surovtsev, S. A. Dzuba // The Journal of Chemical Physics. – 2014. – Vol. 140. – № 23. – P. 235103.
74. Dzuba S. A. Probing the energy landscape of bacterial photosynthetic reaction centers at cryogenic temperatures by ESEEM of spin-polarised D+Q-A radical pairs / S. A. Dzuba, P. Gast, A. J. Hoff // Chemical Physics Letters. – 1997. – Vol. 268. – № 3-4. – P. 273-279.
75. Borovykh I. Y. “Glass transition” near 200 K in the bacterial photosynthetic reaction center protein detected by studying the distances in the transient P+Qa- radical pair / I. Y. Borovykh, P. Gast, S. A. Dzuba // Journal of Physical Chemistry B. – 2005. – Vol. 109. – № 15. – P. 7535-7539.
76. Influence of hydration on the dynamics of lysozyme / J. H. Roh, J. E. Curtis, S. Azzam [et al.] // Biophysical Journal. – 2006. – Vol. 91. – № 7. – P. 2573-2588.
77. Parak F. G. Proteins in action: The physics of structural fluctuations and conformational changes / F. G. Parak // Current Opinion in Structural Biology. – 2003. – Vol. 13. – № 5. – P. 552-557.
78. From shell to cell: neutron scattering studies of biological water dynamics and coupling to activity / A. Frölich, F. Gabel, M. Jasnin [et al.] // Faraday Discuss. – 2009. – Vol. 141. – P. 117-130.
79. Ligand binding and conformational motions in myoglobin / A. Ostermann, R. Waschipky, F. G. Parak, G. U. Nienhaus // Nature. – 2000. – Vol. 404. – № 6774. – P. 205-208.
80. Dzuba S. A. ESEEM study of spin-spin interactions in spin-polarised P+QA-pairs in the photosynthetic purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* R26 / S. A. Dzuba, P. Gast, A. J. Hoff // Chemical Physics Letters. – 1995. – Vol. 236. – № 6. –

P. 595-602.

81. Theory and practice of electron transfer within protein-protein complexes: Application to the multidomain binding of cytochrome c by cytochrome c peroxidase / J. M. Nocek, J. S. Zhou, S. De Forest [et al.] // *Chemical Reviews*. – 1996. – Vol. 96. – № 7. – P. 2459-2489.
82. High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle / K. Edman, P. Nollert, A. Royant [et al.] // *Nature*. – 1999. – Vol. 401. – № 6755. – P. 822-826.
83. Dynamics of different functional parts of bacteriorhodopsin: H-2H labeling and neutron scattering / V. Réat, H. Patzelt, M. Ferrand [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – Vol. 95. – № 9. – P. 4970-4975.
84. Lusceac S. A. 2H and 13C NMR studies on the temperature-dependent water and protein dynamics in hydrated elastin, myoglobin and collagen / S. A. Lusceac, M. R. Vogel, C. R. Herbers // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2010. – Vol. 1804. – № 1. – P. 41-48.
85. Similarities and Differences among Protein Dynamics Studied by Variable Temperature Nuclear Magnetic Resonance Relaxation / B. Busi, J. R. Yarava, A. Bertarello [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2021. – Vol. 125. – № 9. – P. 2212-2221.
86. Dynamical heterogeneity in  $\alpha$ - and  $\beta$ -relaxations of glass forming liquids as seen by deuterium NMR / R. Böhmer, G. Hinze, T. Jörg [et al.] // *Journal of Physics: Condensed Matter*. – 2000. – Vol. 12. – № 8A. – P. A383-A390.
87. Vogel M. On the Nature of Slow  $\beta$ -Process in Simple Glass Formers: A 2H NMR Study / M. Vogel, E. Rössler // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2000. – Vol. 104. – № 18. – P. 4285-4287.
88. Herbers C. R. 2 H NMR studies of glycerol dynamics in protein matrices / C. R. Herbers, D. Sauer, M. Vogel // *The Journal of Chemical Physics*. – 2012. – Vol. 136. – № 12. – P. 124511.
89. Kämpf K. Vanishing amplitude of backbone dynamics causes a true protein

- dynamical transition: 2H NMR studies on perdeuterated C-phycoerythrin / K. Kämpf, B. Kremmling, M. Vogel // *Physical Review E*. – 2014. – Vol. 89. – № 3. – P. 032710.
90. Molecular dynamics simulation of bovine pancreatic ribonuclease A-CpA and transition state-like complexes / E. Formoso, J. M. Matxain, X. Lopez, D. M. York // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – Vol. 114. – № 21. – P. 7371-7382.
91. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations / B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson [et al.] // *Journal of Computational Chemistry*. – 1983. – Vol. 4. – № 2. – P. 187-217.
92. Krishnan M. Methyl Group Dynamics and the Onset of Anharmonicity in Myoglobin / M. Krishnan, V. Kurkal-Siebert, J. C. Smith // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – Vol. 112. – № 17. – P. 5522-5533.
93. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules / W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 1995. – Vol. 117. – № 19. – P. 5179-5197.
94. Bizzarri A. R. Molecular dynamics of water at the protein-solvent interface / A. R. Bizzarri, S. Cannistraro // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2002. – Vol. 106. – № 26. – P. 6617-6633.
95. Temperature-dependent dynamical transitions of different classes of amino acid residue in a globular protein / Y. Miao, Z. Yi, D. C. Glass [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – Vol. 134. – № 48. – P. 19576-19579.
96. Tournier A. L. Translational hydration water dynamics drives the protein glass transition / A. L. Tournier, J. Xu, J. C. Smith // *Biophysical Journal*. – 2003. – Vol. 85. – № 3. – P. 1871-1875.
97. Role of water and ions on the dynamical transition of RNA / H. Zhang, S. Khodadadi, S. L. Fiedler, J. E. Curtis // *Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2013. – Vol. 4. – № 19. – P. 3325-3329.
98. Dynamical transition and heterogeneous hydration dynamics in rna / J. Yoon, J. C. Lin, C. Hyeon, D. Thirumalai // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Vol. 118. – № 28. – P. 7910-7919.
99. Low-temperature dynamical and structural properties of saturated and

- monounsaturated phospholipid bilayers revealed by raman and spin-label EPR spectroscopy / N. V. Surovtsev, N. V. Ivanisenko, K. Y. Kirillov, S. A. Dzuba // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2012. – Vol. 116. – № 28. – P. 8139-8144.
100. Dmitriev A. A. Temperature-Dependent Hydrocarbon Chain Disorder in Phosphatidylcholine Bilayers Studied by Raman Spectroscopy / A. A. Dmitriev, N. V. Surovtsev // *The Journal of Physical Chemistry B.* – 2015. – Vol. 119. – № 51. – P. 15613-15622.
101. Dzuba S. A. Librational motion of guest spin probe molecules in glassy media / S. A. Dzuba // *Physics Letters A.* – 1996. – Vol. 213. – № 1-2. – P. 77-84.
102. Dzuba S. A. Probing Small-Angle Molecular Motions with EPR Spectroscopy: Dynamical Transition and Molecular Packing in Disordered Solids / S. A. Dzuba // *Magnetochemistry.* – 2022. – Vol. 8. – № 2. – P. 19.
103. Dzuba S. A. Libration motion of guest spin probe molecules in organic glasses: CW EPR and electron spin echo study / S. A. Dzuba // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2000. – Vol. 56. – № 2. – P. 227-234.
104. Librational dynamics of nitroxide molecules in a molecular glass studied by echo-detected EPR / E. P. Kirilina, S. A. Dzuba, A. G. Maryasov, Y. D. Tsvetkov // *Applied Magnetic Resonance.* – 2001. – Vol. 21. – № 2. – P. 203-221.
105. Dzuba S. A. CW EPR, echo-detected EPR, and field-step ELDOR study of molecular motions of nitroxides in o-terphenyl glass: Dynamical transition, dynamical heterogeneity and  $\beta$ -relaxation / S. A. Dzuba, E. S. Salnikov, L. V. Kulik // *Applied Magnetic Resonance.* – 2006. – Vol. 30. – № 3-4. – P. 637-650.
106. Van S. P. Rapid anisotropic motion of spin labels. models for motion averaging of the ESR parameters / S. P. Van, G. B. Birrell, O. H. Griffith // *Journal of Magnetic Resonance (1969).* – 1974. – Vol. 15. – № 3. – P. 444-459.
107. Dzuba S. A. On the possible manifestation of harmonic-anharmonic dynamical transition in glassy media in electron paramagnetic resonance of nitroxide spin probes / S. A. Dzuba, E. P. Kirilina, E. S. Salnikov // *The Journal of Chemical Physics.* – 2006. – Vol. 125. – № 5. – P. 054502.
108. Vorobiev A. K. Rotational mobility of guest molecules studied by method of

- oriented spin probe / A. K. Vorobiev, V. S. Gurman, T. A. Klimenko // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2000. – Vol. 2. – № 3. – P. 379-385.
109. Vorob'ev A. K. Models of slow rotational mobility of paramagnetic probes in glassy media / A. K. Vorob'ev, V. S. Gurman, T. A. Klimenko // *Russian Chemical Bulletin*. – 2000. – Vol. 49. – № 6. – P. 1059-1067.
110. Chernova D. A. Molecular mobility of nitroxide spin probes in glassy polymers. Quasi-libration model / D. A. Chernova, A. K. Vorobiev // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 2009. – Vol. 47. – № 1. – P. 107-120.
111. Temperature dependence of amplitudes of libration motion of guest spin-probe molecules in organic glasses / S. V. Paschenko, Y. V. Toropov, S. A. Dzuba [et al.] // *Journal of Chemical Physics*. – 1999. – Vol. 110. – № 16. – P. 8150-8154.
112. Bhat S. N. Vitrification and glass transition of water: Insights from spin probe ESR / S. N. Bhat, A. Sharma, S. V. Bhat // *Physical Review Letters*. – 2005. – Vol. 95. – № 23. – P. 1-4.
113. Aloï E. Influence of hydration on segmental chain librations and dynamical transition in lipid bilayers / E. Aloï, R. Bartucci // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. – 2022. – Vol. 1864. – № 1. – P. 183805.
114. Steinhoff H. J. A simple method for determination of rotational correlation times and separation of rotational and polarity effects from EPR spectra of spin-labeled biomolecules in a wide correlation time range / H. J. Steinhoff // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 1988. – Vol. 17. – № 4. – P. 237-247.
115. Isaev N. P. Fast stochastic librations and slow rotations of spin labeled stearic acids in a model phospholipid bilayer at cryogenic temperatures / N. P. Isaev, S. A. Dzuba // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – Vol. 112. – № 42. – P. 13285-13291.
116. Konov K. B. Low-Temperature Molecular Motions in Phospholipid Bilayers in Presence of Glycerol as Studied by Spin-Echo EPR of Spin Labels / K. B. Konov, N. P. Isaev, S. A. Dzuba // *Applied Magnetic Resonance*. – 2014. – Vol. 45. – № 10. – P. 1117-1126.
117. Kirilina E. P. Orientational motion of nitroxides in molecular glasses:

Dependence on the chemical structure, on the molecular size of the probe, and on the type of the matrix / E. P. Kirilina, I. A. Grigoriev, S. A. Dzuba // *Journal of Chemical Physics*. – 2004. – Vol. 121. – № 24. – P. 12465-12471.

118. Librational motion of spin-labeled lipids in high-cholesterol containing membranes from echo-detected EPR spectra / D. A. Erilov, R. Bartucci, R. Guzzi [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2004. – Vol. 87. – № 6. – P. 3873-3881.

119. Electron spin-echo studies of spin-labelled lipid membranes and free fatty acids interacting with human serum albumin / F. De Simone, R. Guzzi, L. Sportelli [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. – 2007. – Vol. 1768. – № 6. – P. 1541-1549.

120. Konov K. B. Low-temperature molecular motions in lipid bilayers in the presence of sugars: Insights into cryoprotective mechanisms / K. B. Konov, N. P. Isaev, S. A. Dzuba // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Vol. 118. – № 43. – P. 12478-12485.

121. Lipid Librations at the Interface with the Na,K-ATPase / R. Guzzi, R. Bartucci, M. Esmann, D. Marsh // *Biophysical Journal*. – 2015. – Vol. 108. – № 12. – P. 2825-2832.

122. Low-temperature dynamics of chain-labeled lipids in ester- And ether-linked phosphatidylcholine membranes / E. Aloï, M. Oranges, R. Guzzi, R. Bartucci // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2017. – Vol. 121. – № 39. – P. 9239-9246.

123. Aloï E. Unsaturated lipid bilayers at cryogenic temperature: Librational dynamics of chain-labeled lipids from pulsed and CW-EPR / E. Aloï, R. Guzzi, R. Bartucci // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2019. – Vol. 21. – № 34. – P. 18699-18705.

124. Aloï E. Unsaturated lipid bilayers at cryogenic temperature: Librational dynamics of chain-labeled lipids from pulsed and CW-EPR / E. Aloï, R. Guzzi, R. Bartucci // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2019. – Vol. 21. – № 34. – P. 18699-18705.

125. Backbone dynamics of alamethicin bound to lipid membranes: Spin-echo electron paramagnetic resonance of TOAC-spin labels / R. Bartucci, R. Guzzi, M. De Zotti [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2008. – Vol. 94. – № 7. – P. 2698-2705.

126. Borovykh I. V. The dynamical transition in proteins of bacterial photosynthetic

reaction centers observed by echo-detected EPR of specific spin labels / I. V. Borovykh, P. Gast, S. A. Dzuba // *Applied Magnetic Resonance*. – 2007. – Vol. 31. – № 1-2. – P. 159-166.

127. Solvent effect on librational dynamics of spin-labelled haemoglobin by ED- and CW-EPR / F. Scarpelli, R. Bartucci, L. Sportelli, R. Guzzi // *European Biophysics Journal*. – 2011. – Vol. 40. – № 3. – P. 273-279.

128. Pulse EPR of Triarylmethyl Probes: A New Approach for the Investigation of Molecular Motions in Soft Matter / A. A. Kuzhelev, O. A. Krumkacheva, M. Y. Ivanov [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2018. – Vol. 122. – № 36. – P. 8624-8630.

129. Microscopic rigidity and heterogeneity of ionic liquids probed by stochastic molecular librations of the dissolved nitroxides / M. Y. Ivanov, O. A. Krumkacheva, S. A. Dzuba, M. V. Fedin // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2017. – Vol. 19. – № 38. – P. 26158-26163.

130. Ivanov M. Y. Nanoscale heterogeneities in ionic liquids: insights from EPR of spin probes / M. Y. Ivanov, M. V. Fedin // *Mendeleev Communications*. – 2018. – Vol. 28. – № 6. – P. 565-573.

131. Structural Anomalies in Ionic Liquids near the Glass Transition Revealed by Pulse EPR / M. Y. Ivanov, S. A. Prikhod'ko, N. Y. Adonin [et al.] // *Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2018. – Vol. 9. – № 16. – P. 4607-4612.

132. Structural Anomalies in Binary Mixtures of Ionic Liquid [Bmim]BF<sub>4</sub> with Water Studied by EPR / M. Y. Ivanov, S. A. Prikhod'ko, N. Y. Adonin, M. V. Fedin // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2019. – Vol. 123. – № 46. – P. 9956-9962.

133. Nanocage formation and structural anomalies in imidazolium ionic liquid glasses governed by alkyl chains of cations / O. D. Bakulina, M. Y. Ivanov, S. A. Prikhod'ko [et al.] // *Nanoscale*. – 2020. – Vol. 12. – № 38. – P. 19982-19991.

134. Nanoconfinement effects on structural anomalies in imidazolium ionic liquids / M. Y. Ivanov, A. S. Poryvaev, D. M. Polyukhov [et al.] // *Nanoscale*. – 2020. – Vol. 12. – № 46. – P. 23480-23487.

135. Electron spin echo envelope modulation of molecular motions of deuterium nuclei / V. N. Syryamina, A. G. Maryasov, M. K. Bowman, S. A. Dzuba // *Journal of*

Magnetic Resonance. – 2015. – Vol. 261. – P. 169-174.

136. Syryamina V. N. Dynamical Transitions at Low Temperatures in the Nearest Hydration Shell of Phospholipid Bilayers / V. N. Syryamina, S. A. Dzuba // Journal of Physical Chemistry B. – 2017. – Vol. 121. – № 5. – P. 1026-1032.

137. Fast stochastic librations and slow small-angle rotations of molecules in glasses observed on nitroxide spin probes by stimulated electron spin echo spectroscopy / N. P. Isaev, L. V. Kulik, I. A. Kirilyuk [et al.] // Journal of Non-Crystalline Solids. – 2010. – Vol. 356. – № 20-22. – P. 1037-1042.

138. Electron spin relaxation due to small-angle motion: Theory for the canonical orientations and application to hierarchic cage dynamics in ionomers / D. Leporini, V. Schädler, U. Wiesner [et al.] // Journal of Chemical Physics. – 2003. – Vol. 119. – № 22. – P. 11829-11846.

139. Echo-Detected Electron Paramagnetic Resonance Spectra of Spin-Labeled Lipids in Membrane Model Systems / D. A. Erilov, R. Bartucci, R. Guzzi [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. – 2004. – Vol. 108. – № 14. – P. 4501-4507.

140. Restricted orientational motion of nitroxides in molecular glasses: Direct estimation of the motional time scale basing on the comparative study of primary and stimulated electron spin echo decays / S. A. Dzuba, E. P. Kirilina, E. S. Salnikov, L. V. Kulik // The Journal of Chemical Physics. – 2005. – Vol. 122. – № 9. – P. 094702.

141. Isaev N. P. Influence of cholesterol on molecular motions in spin-labeled lipid bilayers observed by stimulated ESE / N. P. Isaev, V. N. Syryamina, S. A. Dzuba // Applied Magnetic Resonance. – 2010. – Vol. 37. – № 1. – P. 405-413.

142. Isaev N. P. Small-angle orientational motions of spin-labeled lipids in cholesterol-containing bilayers studied at low temperatures by electron spin echo spectroscopy / N. P. Isaev, V. N. Syryamina, S. A. Dzuba // Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – Vol. 114. – № 29. – P. 9510-9515.

143. Small-amplitude backbone motions of the spin-labeled lipopeptide trichogin GA IV in a lipid membrane as revealed by electron spin echo / V. N. Syryamina, N. P. Isaev, C. Peggion [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – Vol. 114. – № 38. – P. 12277-12283.



144. Determining the occurrence of a 310-helix and an  $\alpha$ -helix in two different segments of a lipopeptaibol antibiotic using TOAC, a nitroxide spin-labeled C( $\alpha$ )-tetrasubstituted  $\alpha$ -aminoacid / V. Monaco, F. Formaggio, M. Crisma [et al.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 1999. – Vol. 7. – № 1. – P. 119-131.
145. Salikhov K. M. The theory of electron spin-echo signal decay resulting from dipole-dipole interactions between paramagnetic centers in solids / K. M. Salikhov, S. A. Dzuba, A. M. Raitsimring // *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. – 1981. – Vol. 42. – № 2. – P. 255-276.
146. Probing local dynamics of the photosynthetic bacterial reaction center with a cysteine specific spin label / O. G. Poluektov, L. M. Utschig, S. Dalosto, M. C. Thurnauer // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2003. – Vol. 107. – № 25. – P. 6239-6244.
147. Hansen F. Y. Molecular dynamics studies of the melting of butane and hexane monolayers adsorbed on the basal-plane surface of graphite / F. Y. Hansen, J. C. Newton, H. Taub // *The Journal of Chemical Physics*. – 1993. – Vol. 98. – № 5. – P. 4128-4141.
148. ESEEM measurements of local water concentration in D<sub>2</sub>O- containing spin-labeled systems / A. D. Milov, R. I. Samoilova, A. A. Shubin [et al.] // *Applied Magnetic Resonance*. – 2008. – Vol. 35. – № 1. – P. 73-94.
149. Khodadadi S. Protein dynamics: from rattling in a cage to structural relaxation / S. Khodadadi, A. P. Sokolov // *Soft Matter*. – 2015. – Vol. 11. – № 25. – P. 4984-4998.
150. Three classes of motion in the dynamic neutron-scattering susceptibility of a globular protein / L. Hong, N. Smolin, B. Lindner [et al.] // *Physical Review Letters*. – 2011. – Vol. 107. – № 14. – P. 2-4.
151. Elastic and conformational softness of a globular protein / L. Hong, D. C. Glass, J. D. Nickels [et al.] // *Physical Review Letters*. – 2013. – Vol. 110. – № 2. – P. 1-5.
152. Benedetto A. Protein dynamics by neutron scattering / A. Benedetto // *Biophysical Chemistry*. – 2013. – Vol. 182. – P. 16-22.
153. Mamontov E. Mean-squared atomic displacements in hydrated lysozyme, native and denatured / E. Mamontov, H. O'Neill, Q. Zhang // *Journal of Biological Physics*. –

2010. – Vol. 36. – № 3. – P. 291-297.

154. Location and aggregation of the spin-labeled peptide trichogin GA IV in a phospholipid membrane as revealed by pulsed EPR / E. S. Salnikov, D. A. Erilov, A. D. Milov [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2006. – Vol. 91. – № 4. – P. 1532-1540.

155. Low-Temperature Dynamical Transition in Lipid Bilayers Detected by Spin-Label ESE Spectroscopy / E. A. Golysheva, M. De Zotti, C. Toniolo [et al.] // *Applied Magnetic Resonance*. – 2018. – Vol. 49. – № 12. – P. 1369-1383.

156. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types / J. B. Klauda, R. M. Venable, J. A. Freites [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – Vol. 114. – № 23. – P. 7830-7843.

157. Direct Prediction of EPR Spectra from Lipid Bilayers: Understanding Structure and Dynamics in Biological Membranes / A. Catte, G. F. White, M. R. Wilson, V. S. Oganessian // *ChemPhysChem*. – 2018. – Vol. 19. – № 17. – P. 2183-2193.

158. Order parameters and areas in fluid-phase oriented lipid membranes using wide angle x-ray scattering / T. T. Mills, G. E. S. Toombes, S. Tristram-Nagle [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2008. – Vol. 95. – № 2. – P. 669-681.

159. Warschawski D. E. Order parameters of unsaturated phospholipids in membranes and the effect of cholesterol: A  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  solid-state NMR study at natural abundance / D. E. Warschawski, P. F. Devaux // *European Biophysics Journal*. – 2005. – Vol. 34. – № 8. – P. 987-996.

160. Svetlovics J. A. Phase separation and fluctuations in mixtures of a saturated and an unsaturated phospholipid / J. A. Svetlovics, S. A. Wheaton, P. F. Almeida // *Biophysical Journal*. – 2012. – Vol. 102. – № 11. – P. 2526-2535.

161. Golysheva E. A. Dynamical transition in molecular glasses and proteins observed by spin relaxation of nitroxide spin probes and labels / E. A. Golysheva, G. Y. Shevelev, S. A. Dzuba // *The Journal of Chemical Physics*. – 2017. – Vol. 147. – № 6. – P. 064501.

162. Maslennikova N. A. an Intrinsically Disordered Protein , Casein / N. A. Maslennikova, E. A. Golysheva, S. A. Dzuba. – 2021. – P. 1-12.

163. Phase behavior and coassembly of DNA and lysozyme in dilute aqueous

- mixtures: A model investigation of DNA-protein interactions / D. Lundberg, A. M. Carnerup, K. Schulen [et al.] // *Langmuir*. – 2010. – Vol. 26. – № 5. – P. 2986-2988.
164. Wien R. W. Spin-label-induced nuclear relaxation. Distances between bound saccharides, histidine-15, and tryptophan-123 on lysozyme in solution / R. W. Wien, J. D. Morrisett, H. M. McConnell // *Biochemistry*. – 1972. – Vol. 11. – № 20. – P. 3707-3716.
165. Schmidt P. G. Distance Measurements in Spin-Labeled Lysozyme / P. G. Schmidt, I. D. Kuntz // *Biochemistry*. – 1984. – Vol. 23. – № 18. – P. 4261-4266.
166. Fajer P. G. Determination of spin-label orientation within the myosin head. / P. G. Fajer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1994. – Vol. 91. – № 3. – P. 937-941.
167. Tsai A. M. Molecular dynamics of solid-state lysozyme as affected by glycerol and water: A neutron scattering study / A. M. Tsai, D. A. Neumann, L. N. Bell // *Biophysical Journal*. – 2000. – Vol. 79. – № 5. – P. 2728-2732.
168. Protein dynamics by neutron scattering: The protein dynamical transition and the fragile-to-strong dynamical crossover in hydrated lysozyme / S. Magazù, F. Migliardo, A. Benedetto, B. Vertessy // *Chemical Physics*. – 2013. – Vol. 424. – P. 26-31.
169. Does a dry protein undergo a glass transition? / A. V. Frontzek, S. V. Stokov, J. P. Embs, S. G. Lushnikov // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Vol. 118. – № 11. – P. 2796-2802.
170. Johari G. P. The glass-liquid transition of hyperquenched water / G. P. Johari, A. Hallbrucker, E. Mayer // *Nature*. – 1987. – Vol. 330. – № 6148. – P. 552-553.
171. Weik M. Liquid-like water confined in stacks of biological membranes at 200 K and its relation to protein dynamics / M. Weik, U. Lehnert, G. Zaccai // *Biophysical Journal*. – 2005. – Vol. 89. – № 5. – P. 3639-3646.
172. McCartney S. A. Fast scanning calorimetry studies of the glass transition in doped amorphous solid water: Evidence for the existence of a unique vicinal phase / S. A. McCartney, V. Sadtschenko // *The Journal of Chemical Physics*. – 2013. – Vol. 138. – № 8. – P. 084501.
173. Golysheva E. A. Lipid chain mobility and packing in DOPC bilayers at cryogenic

- temperatures / E. A. Golysheva, S. A. Dzuba // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2020. – Vol. 226. – P. 104817.
174. Dynamics and rigidity in an intrinsically disordered protein,  $\beta$ -casein / S. Perticaroli, J. D. Nickels, G. Ehlers [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Vol. 118. – № 26. – P. 7317-7326.
175. Electron spin echo detection of stochastic molecular librations: Non-cooperative motions on solid surface / E. A. Golysheva, R. I. Samoilova, M. De Zotti [et al.] // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2019. – Vol. 309. – P. 106621.
176. Librational fluctuations in protein glasses / D. Marsh, R. Bartucci, R. Guzzi [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. – 2013. – Vol. 1834. – № 8. – P. 1591-1595.
177. ESE-Detected Molecular Motions of Spin-Labeled Molecules on a Solid Inorganic Surface: Motional Models and Onset Temperatures / E. A. Golysheva, R. I. Samoilova, M. De Zotti [et al.] // *Applied Magnetic Resonance*. – 2020. – Vol. 51. – № 9-10. – P. 1019-1029.
178. Superslow rotations of nitroxide radicals studied by pulse EPR spectroscopy / S. A. Dzuba, A. G. Maryasov, K. M. Salikhov, Y. D. Tsvetkov // *Journal of Magnetic Resonance* (1969). – 1984. – Vol. 58. – № 1. – P. 95-117.
179. Microstructural and Dynamical Heterogeneities in Ionic Liquids / Y. L. Wang, B. Li, S. Sarman [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2020. – Vol. 120. – № 13. – P. 5798-5877.
180. Hammond O. S. The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution / O. S. Hammond, D. T. Bowron, K. J. Edler // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2017. – Vol. 56. – № 33. – P. 9782-9785.
181. Coexistence of liquid and solid phases of Bmim-PF<sub>6</sub> ionic liquid on mica surfaces at room temperature / Y. Liu, Y. Zhang, G. Wu, J. Hu // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – Vol. 128. – № 23. – P. 7456-7457.
182. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering— Promises and challenges / Y. P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan [et al.] // *Biotechnology Advances*. – 2017. – Vol. 35. – № 2. – P. 105-134.

183. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review / M. H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, A. Hayyan, N. S. Jayakumar // *Analytica Chimica Acta*. – 2017. – Vol. 979. – P. 1-23.
184. Emerging frontiers of deep eutectic solvents in drug discovery and drug delivery systems / M. H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, G. C. Ngoh [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2019. – Vol. 316. – P. 168-195.
185. Emami S. Deep eutectic solvents for pharmaceutical formulation and drug delivery applications / S. Emami, A. Shayanfar // *Pharmaceutical Development and Technology*. – 2020. – Vol. 25. – № 7. – P. 779-796.
186. Simulation of Deep Eutectic Solvents' Interaction with Membranes of Cancer Cells Using COSMO-RS / Y. P. Mbous, M. Hayyan, W. F. Wong [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2020. – Vol. 124. – № 41. – P. 9086-9094.
187. Wagle D. V. Deep Eutectic Solvents: Sustainable Media for Nanoscale and Functional Materials / D. V. Wagle, H. Zhao, G. A. Baker // *Accounts of Chemical Research*. – 2014. – Vol. 47. – № 8. – P. 2299-2308.