

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ ИМЕНИ В. В. ВОЕВОДСКОГО
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
МИНОБРНАУКИ РОССИИ

На правах рукописи

КАШНИК АННА СТАНИСЛАВОВНА

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С
МОДЕЛЬНЫМИ ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ ПО ДАННЫМ ДВОЙНОГО
ЭЛЕКТРОН-ЭЛЕКТРОННОГО РЕЗОНАНСА СПИНОВЫХ МЕТОК**

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., профессор Дзюба Сергей Андреевич

Новосибирск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	12
1.1. Биологические и модельные мембраны	12
1.2. Антимикробные пептиды.....	15
1.2.1. Хальципорин А	19
1.3. Нестероидные противовоспалительные препараты	20
1.3.1. Ибупрофен и диклофенак	22
1.4. Холестерин	23
1.4.1. Липидные рафты.....	25
1.5. Метод спиновых меток и зондов.....	29
1.5.1. Стационарный ЭПР	30
1.5.2. Электронное спиновое эхо.....	35
1.5.3. Модуляция огибающей спада сигнала ЭСЭ (ESEEM).....	38
1.5.4. Спектроскопия двойного электрон-электронного резонанса (ДЭЭР).....	41
1.6. Биофизические приложения метода ДЭЭР	44
1.7. Метод усиления парамагнитной релаксации в ЯМР.....	47
1.8. Заключение.....	48
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	49
3. ПЕПТИД-АНТИБИОТИК ХАЛЬЦИПОРИН А: ВЛИЯНИЕ НА МОДЕЛЬНУЮ БИОЛОГИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ ПО ДАННЫМ ДВОЙНОГО ЭЛЕКТРОН- ЭЛЕКТРОННОГО РЕЗОНАНСА.....	54
3.1. Описание задачи	54
3.2. Образцы	54
3.3. Результаты и обсуждение	55
3.3.1. Кластеризация и наноразмерное пространственное распределение спин-меченых стеариновых кислот в модельных мембранах в отсутствие хальципорина.....	55
3.3.2. Кластеризация и наноразмерное пространственное распределение спин-меченых стеариновых кислот в модельных мембранах в присутствии хальципорина.....	62
3.4. Заключение к главе 3	70
4. ЛОКАЛИЗАЦИЯ СПИН-МЕЧЕННЫХ МОЛЕКУЛ ИБУПРОФЕНА И ДИКЛОФЕНАКА В МОДЕЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ РАЗНЫХ ТИПОВ.....	71
4.1. Описание задачи	71
4.2. Образцы	71
4.3. Результаты и обсуждение	73

4.3.1. Взаимодействие спин-меченого ибупрофена с модельными мембранами и его локализация по данным ESEEM.....	73
4.3.2. Локализация ибупрофена в модельных липидных мембранах по данным PRE NMR	76
4.3.3. Взаимодействие спин-меченого диклофенака с модельными мембранами и его локализация по данным ESEEM.....	82
4.4. Заключение к главе 4.....	84
5. НАНОРАЗМЕРНОЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И КЛАСТЕРИЗАЦИЯ СПИН-МЕЧЕННЫХ МОЛЕКУЛ ИБУПРОФЕНА И ДИКЛОФЕНАКА В МОДЕЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ	85
5.1. Описание задачи	85
5.2. Образцы	85
5.3. Результаты и обсуждение	86
5.3.1. Наноразмерное пространственное распределение ибупрофена в липидном бислое.....	86
5.3.2. Наноразмерное пространственное распределение диклофенака в липидном бислое	91
5.4. Заключение к главе 5.....	95
6. НАНОРАЗМЕРНОЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И КЛАСТЕРИЗАЦИЯ СПИН-МЕЧЕННЫХ МОЛЕКУЛ ИБУПРОФЕНА И ДИКЛОФЕНАКА В ПРИСУТСТВИИ ЛИПИДНЫХ РАФТОВ В МОДЕЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ.....	96
6.1. Описание задачи	96
6.2. Образцы	96
6.3. Результаты и обсуждение	97
6.3.1. Наноразмерное пространственное распределение и кластеризация спин-меченого ибупрофена в присутствии липидных рафтов	97
6.3.2. Наноразмерное пространственное распределение и кластеризация спин-меченого диклофенака в присутствии липидных рафтов.....	107
6.4. Заключение к главе 6.....	113
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	114
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	114
БЛАГОДАРНОСТИ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
ПРИЛОЖЕНИЕ	135

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Биологическая мембрана представляет собой полупроницаемый барьер, который отделяет внутреннее содержимое клетки от окружающей среды, а также выполняет множество других функций. Целый ряд жизненно важных процессов в организме протекает в клеточных мембранах с участием в них гостевых молекул разного типа, и причиной многих заболеваний является нарушение мембранных функций. Малые гостевые молекулы лекарств, такие как нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) или антимикробные пептиды (АМП), могут изменять физические свойства мембраны, влияя на ее нормальное функционирование. Молекулярные аспекты взаимодействия лекарственных препаратов с мембраной во многом пока не поняты и требуют всестороннего изучения.

В связи с растущей резистентностью болезнетворных бактерий к существующим антибиотикам необходим поиск новых препаратов, к которым бактериям будет сложнее выработать устойчивость. К числу потенциальных кандидатов в этом поиске относятся антимикробные пептиды. АМП обладают целым рядом преимуществ по сравнению с традиционными антибиотиками, а именно: низкой вероятностью развития резистентности у бактерий, высокой скоростью воздействия на клетки-мишени, широким спектром действия, меньшим количеством побочных эффектов. Среди разнообразия АМП выделяется подкласс мембраноактивных пептидов (МАП). Механизм действия МАП заключается в их неспецифическом связывании с фосфолипидной мембраной и последующем изменении ее структуры. Вызванные МАП изменения в липидной мембране могут приводить к напряжению локальной кривизны мембраны, изменению латеральной подвижности липидов, образованию или разрушению локальных доменов при некоторых критических концентрациях или образованию проводящих каналов или пор. В результате изменяются локальные механические свойства или транспортная функция мембраны, и происходит лизис клеток. К действиям такого типа появление резистентности маловероятно. Также в настоящее время активно обсуждаются альтернативные механизмы действия МАП – например, перераспределение липидов в мембране, которое может происходить в клеточной мембране при концентрациях, гораздо ниже критических. Такие особенности действия МАП в перспективе могут позволить оптимизировать их использование в терапевтических целях.

НПВП (аспирин, ибупрофен, диклофенак и другие) являются эффективными жаропонижающими и обезболивающими лекарственными средствами. Безрецептурный статус этих препаратов основан на многолетних обширных исследованиях эффективности и

безопасности. Механизм действия НПВП заключается в ингибировании фермента циклооксигеназы (ЦОГ). ЦОГ – это мембранный фермент. Множество биологических процессов являются мембранно-опосредованными, поэтому изменения в мембранах, вызванные лекарственными средствами, могут существенно влиять на их биологические функции и быть причиной желудочно-кишечных и сердечно-сосудистых побочных эффектов НПВП. Кроме того, распределение лекарств в клеточных мембранах влияет на их доставку к конкретным мишеням в организме, поэтому изучение взаимодействий лекарств с мембранами может способствовать также и разработке способов доставки лекарств. Таким образом, данные о взаимодействии НПВП с липидными мембранами, полученные на молекулярном уровне, вполне вероятно, окажутся чрезвычайно полезными.

Важнейшим компонентом мембран клеток человека и животных является холестерин, который контролирует текучесть и эластичность мембраны и выполняет ряд других функций. В присутствии холестерина липидные бислои могут разделяться на наноразмерные неупорядоченные и упорядоченные жидкие структуры, последние известны как липидные рафты. Предполагается, что липидные рафты могут выполнять следующие функции: координировать клеточные процессы, влиять на текучесть мембран, выполнять функцию липидных платформ для мембранных белков, рецепторов и сигнальных молекул, регулировать нейротрансмиссию. Однако значимость липидных рафтов для мембраны, их влияние на взаимодействие с другими биомолекулами и даже само их существование все еще остаются открытыми вопросами и широко обсуждаются в литературе.

Степень разработанности темы исследования

Для исследования на молекулярном уровне изменений в структурах липидных мембран, вызванных лекарственными препаратами, использовались различные экспериментальные и вычислительные подходы: рентгеновское рассеяние, рассеяние нейтронов, твердотельный ядерный магнитный резонанс (ЯМР), электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) спиновых меток, включая импульсный ЭПР, метод молекулярной динамики (МД). Например, методом рассеяния нейтронов было показано, что МАП могут индуцировать латеральную сегрегацию липидов без образования пор или разрушения мембраны. Данные МД позволили получить информацию о локализации ибупрофена в гидрофобной внутренней части мембраны. В результате исследований по дифракции рентгеновских лучей обнаружено, что в присутствии 20 мол % холестерина, ибупрофен в концентрации 5 мол % вытесняется из ядра мембраны в область, расположенную ближе к головной группе бислоя. Однако типичные концентрации ибупрофена в мембранах, используемые в большинстве экспериментальных подходов, довольно высоки,

обычно от 2 мол % до 20 мол % от общего количества липидов, тогда как терапевтические дозы значительно ниже.

При этом метод спиновых меток позволяет, во-первых, значительно снизить концентрации исследуемых препаратов, а во-вторых, исследовать на молекулярном уровне определенные позиции в мембране. Так, с использованием импульсного ЭПР было показано, что молекулы спин-меченых стеариновых кислот собираются вокруг МАП аламетицина и трихогина; такой эффект перераспределения липидов может являться возможным механизмом антимикробного действия этих пептидов. Применение же импульсного ЭПР, в варианте двойного электрон-электронного резонанса (ДЭЭР), позволило сделать выводы о конформациях спин-меченых МАП определенного типа в мембране и об их кластеризации. Метод ДЭЭР, однако, пока применялся лишь к небольшому кругу объектов, а к изучению спин-меченых НПВП в мембранах не применялся вовсе.

Цель и задачи

Цель работы – изучение методом ДЭЭР и некоторыми другими методами (другие варианты ЭПР, метод ЯМР) процессов связывания и взаимодействия МАП и НПВП с модельными биологическими мембранами, а также установление влияния липидных рафтов на это взаимодействие.

Задачи

- 1) Исследование наноразмерного пространственного распределения спин-меченых стеариновых кислот в модельных мембранах разного типа с использованием метода двойного электрон-электронного резонанса.
- 2) Получение данных об изменении наноразмерного пространственного распределения спин-меченых стеариновых кислот в присутствии МАП хальципорина методом ДЭЭР, обсуждение возможных молекулярных механизмов действия хальципорина на мембраны бактерий.
- 3) Определение локализации спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельной биологической мембране с помощью метода модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (ESEEM).
- 4) Определение расположения спин-меченых и немеченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельных биологических мембранах с помощью метода усиления парамагнитной релаксации в ядерном магнитном резонансе, сравнение с данными, полученными методом ESEEM.

- 5) Получение данных о взаимном пространственном расположении молекул спин-меченых НПВП модельных биологических мембранах методом ДЭЭР, обсуждение возможных моделей пространственного распределения.
- 6) Изучение влияния липидных рафтов на кластеризацию и локализацию НПВП в модельных мембранах.

Научная новизна работы

В работе впервые использованы спин-меченые НПВП ибупрофен и диклофенак, что позволило применять методы ЭПР, ДЭЭР и ESEEM для изучения их взаимодействия с мембранами на молекулярном уровне, а также снизить концентрацию исследуемых препаратов. Также в данной работе впервые применяется сочетание спектроскопии ESEEM и метода усиления парамагнитной релаксации в спектроскопии ЯМР для определения локализации молекул в мембранах.

Ранее спектроскопия ДЭЭР применялась в основном к дважды спин-меченым биомолекулам для изучения их конформации. В настоящей работе впервые показано, что ДЭЭР может применяться также к (моно) спин-меченым молекулам и выявлять особенности их наноразмерного взаимного пространственного распределения. Данный метод предоставляет уникальную информацию в нанометровом диапазоне расстояний, которую невозможно получить другими методами.

С помощью метода ДЭЭР получены данные о нанокластеризации стеариновых кислот с добавлением и без добавления антимикробного пептида хальципорина и сделаны выводы о его расположении в липидном бислое. Предложен возможный механизм антимикробного действия хальципорина на модельную биологическую мембрану. Новым результатом является также то, что хальципорин может влиять на мембрану при очень низких концентрациях (при соотношении пептида к липидам 1/10 000). В настоящее время в литературе активно обсуждаются возможные механизмы воздействия малых количеств лекарственных веществ на биологические мембраны, однако достоверных данных, полученных в данном направлении, пока еще довольно мало.

Впервые предложена модель взаимного пространственного распределения молекул в модельных мембранах спин-меченой стеариновой кислоты, спин-меченого ибупрофена и спин-меченого диклофенака по типу «шахматной шкатулки» с попеременным чередованием кластеров в двух противоположных листках бислоя со случайным распределением молекул внутри кластеров.

Установлено, что холестерин выталкивает спин-меченый ибупрофен из гидрофобной части бислоя в положения, более близкие к его поверхности.

Получены дополнительные свидетельства в пользу гипотезы существования липидных рафтов, а также данные, свидетельствующие о квазирегулярности их внутреннего строения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученная информация о наноразмерном пространственном распределении и локализации исследуемых препаратов позволит развить имеющиеся представления об их молекулярных механизмах действия и функциональных свойствах, что в будущем может способствовать развитию методов повышения их биосовместимости и снижению побочных эффектов.

Также полученные данные могут быть использованы для дальнейшего изучения антимикробного действия пептидов и внедрения их в клиническую практику в дополнение к обычным антибиотикам, к которым у части бактерий может присутствовать резистентность.

Результаты работы также демонстрируют дополнительные доказательства существования липидных рафтов в клеточных мембранах и позволяют получить информацию об их композиции, структурных свойствах, функциональной значимости, а также выяснить зависимость свойств липидных рафтов от композиции мембраны.

Методология и методы исследования

Биологическая мембрана представляет собой гетерогенную динамическую систему, которая состоит из смеси фосфолипидов, мембранных белков и других небольших молекул, таких как стерины. Из-за внутренней сложности биологических мембран изучение их свойств напрямую является трудоемкой задачей. Поэтому существующая практика состоит в использовании модельных мембранных систем, которые имитируют наиболее важные свойства биологической мембраны. Такой подход используется и в настоящей работе. Модельные мембраны были приготовлены на основе липидов POPC (1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DOPC (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DHPC (1,2-дигептаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин) или DMPC (1,2-димеристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин).

Основным экспериментальным методом в работе является метод ДЭЭР, который дает возможность изучать магнитные диполь-дипольные взаимодействия между спинами в нанометровом диапазоне расстояний. Применялись также обычный стационарный метод ЭПР (CW ЭПР), метод ESEEM, метод усиления парамагнитной релаксации в ЯМР с использованием спиновых меток. Метод ESEEM используется для определения локализации и ориентации в

мембранах спин-меченых биомолекул и имеет разрешение от 4 до 10 Å. Применение этого метода требует замораживания образца. Метод усиления парамагнитной релаксации позволяет при комнатной температуре обнаруживать взаимодействия между неспаренным электроном спиновой метки и протонами, расположенными на расстоянии до 15-20 Å. Причем используемый в работе метод ЯМР высокого разрешения (частота спектрометра 500 МГц) позволяет селективно изучать взаимодействия для разных протонов молекул липидов мембраны. Высокий магнитный момент неспаренного электрона спиновой метки позволил снизить концентрацию исследуемого препарата в мембране до ~ 0,2 мол %, что является рекордно малой величиной для физико-химических методов. Комбинация методов усиления парамагнитной релаксации в ЯМР и ESEEM может дать полную информацию о локализации спиновых меток в мембране.

Положения, выносимые на защиту

1. Данные двойного электрон-электронного резонанса спин-меченых молекул в биологических мембранах позволяют делать выводы о наноразмерной кластеризации этих молекул и получать информацию об их взаимном пространственном распределении в кластерах.
2. Механизм антимикробного действия антимикробного пептида хальципорина на мембрану бактерий может заключаться во влиянии на взаимное пространственное распределение липидов в ней.
3. Методы ESEEM и усиления парамагнитной релаксации в ЯМР могут эффективно использоваться для определения локализации спин-меченых молекул лекарственных препаратов ибупрофена и диклофенака в модельных биологических мембранах.
4. Липидные рафты в биологических мембранах могут захватывать молекулы ибупрофена и диклофенака, что может проявляться в изменении их взаимных пространственных распределений.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов, представленных в диссертационной работе, основывается на использовании современных экспериментальных подходов, согласованности данных, полученных разными методами, их воспроизводимости и соответствии с имеющимися данными других исследований о взаимодействии лекарств с мембранами. Значимость работы признана мировым научным сообществом, что подтверждается публикациями в рецензируемых профильных международных журналах, входящих в списки индексируемых базами данных Web of Science, Scopus и РИНЦ.

Основные результаты работы докладывались на следующих международных и российских конференциях: VI Съезд биофизиков России 2019 (Сочи, Россия), Modern Development of Magnetic Resonance 2019, 2022 (Казань, Россия), Международная научная студенческая конференция 2020, 2021 (Новосибирск, Россия), XVIII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии 2021, 2023 (Владивосток, Россия), Международная научная конференция «СОВРЕМЕННАЯ ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА - НА СТЫКЕ ФИЗИКИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ» 2021 (Черноголовка, Россия), X International Voevodsky Conference Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes 2022 (Новосибирск, Россия), SymBioSE 2023 (Копер, Словения).

Личный вклад автора

Постановка целей, задач, а также планирование экспериментов осуществлялось соискателем совместно с научным руководителем. Автором был проведен анализ существующих исследований, посвященных молекулярным механизмам взаимодействия лекарственных препаратов с модельными мембранами. Приготовление образцов и непосредственно исследовательская часть работы, а также математическая обработка полученных экспериментальных данных проводились лично диссертантом. Часть необходимого программного обеспечения для преобразования данных было реализовано автором самостоятельно. Обсуждение полученных результатов и написание статей осуществлялось соискателем совместно с коллективом соавторов.

Публикации по теме диссертации

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

1) **A. S. Smorygina**, E. A. Golysheva, S. A. Dzuba, Clustering of Stearic Acids in Model Phospholipid Membranes Revealed by Double Electron–Electron Resonance // *Langmuir*. – 2021. – V. 37, No. 47. – P. 13909-13916.

2) D. S. Baranov, **A. S. Smorygina**, S. A. Dzuba, Synthesis of Spin-Labeled Ibuprofen and Its Interaction with Lipid Membranes // *Molecules*. – 2022. – V. 27, No. 13. – P. 4127.

3) **A. S. Kashnik**, D. S. Baranov, S. A. Dzuba, Ibuprofen in a Lipid Bilayer: Nanoscale Spatial Arrangement // *Membranes*. – 2022. – V. 12, No. 11. – P. 1077.

4) **A. S. Kashnik**, V. N. Syryamina, B. Biondi, C. Peggion, F. Formaggio, S. A. Dzuba, DEER/PELDOR Study of the Effect of Extremely Low Concentrations of the Antimicrobial Peptide Chalciporin A on the Membrane Lipid Organization // *Appl. Magn. Reson.* – 2023. – V. 54. – P. 1-14.

5) **A. S. Kashnik**, O. Y. Selyutina, D. S. Baranov, N. E. Polyakov, S. A. Dzuba, Localization of the ibuprofen molecule in model lipid membranes revealed by spin-label-enhanced NMR relaxation // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2023. – V. 1865. – P. 184215.

6) D. S. Baranov, **A. S. Kashnik**, A. N. Atnyukova, S. A. Dzuba, Spin-Labeled Diclofenac: Synthesis and Interaction with Lipid Membranes // *Molecules.* – 2023. – V. 28, No. 16. – P. 5991.

7) **A. S. Kashnik**, D. S. Baranov, S. A. Dzuba, Spatial Arrangement of the Drug Ibuprofen in a Model Membrane in the Presence of Lipid Rafts // *J. Phys. Chem. B* – 2024. – V. 128, No. 15. – P. 3652-3661.

8) **A. S. Kashnik**, A. N. Atnyukova, D. S. Baranov, S. A. Dzuba, DEER Study of Spatial Arrangement of Spin-Labeled Diclofenac in Lipid Bilayers of Different Composition // *Appl. Magn. Reson.* – 2024. – V. 55. – P. 1145-1157.

**Соответствие специальности 1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества**

Диссертационная работа соответствует следующим пунктам паспорта специальности 1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества: п. 1 «Атомно-молекулярная структура химических частиц и веществ», п. 2 «структура и свойства вандерваальсовых молекул, комплексов, ритберговских молекул, кластеров, ассоциатов, пленок, адсорбционных слоев, интеркалятов, межфазных границ, мицелл, дефектов», п. 3 «Молекулярная динамика, межмолекулярные потенциалы и молекулярная организация веществ».

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 143 страницах и включает 83 рисунка и 3 таблицы. Работа состоит из введения, шести глав, основных результатов и выводов, списка сокращений, списка литературы (217 источников) и приложения. Работа выполнялась в рамках планов научно-исследовательской работы ИХКГ СО РАН, а также была поддержана грантами РФФИ № 15-15-00021 и № 21-13-00025.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Биологические и модельные мембраны

Биологическая мембрана является физическим барьером, который отделяет внутреннюю часть клетки от внешней среды. Она выполняет множество важных функций в клеточных процессах, таких как обмен веществ с окружающей средой, транспорт молекул в клетку и из нее, перенос энергии, передача сигналов и т.д. Мембрана в основном состоит из липидов, белков и углеводов и является незаменимым элементом прокариотических и эукариотических клеток [1].

Белки выполняют жизненно важную роль в клетке, поскольку они обеспечивают ее структурную целостность и организацию, а также отвечают за транспорт различных веществ через мембрану. Углеводы могут выполнять роль маркеров из-за структурного разнообразия сахарных цепей. Например, группа крови человека определяется наличием или отсутствием мембранных углеводов у эритроцитов [2].

Структурной основой мембраны являются липиды. Их содержание составляет порядка 50 % от массы мембран большинства клеток млекопитающих, углеводов около 3 %, вся остальная часть приходится на белок и другие компоненты. Все мембранные липиды имеют амфифильную структуру, то есть содержат как гидрофильную (имеющую сродство к воде), так и гидрофобную область (имеющую отрицательное сродство к воде). Благодаря этому мембранные липиды формируют бислои, в которых гидрофильные головки направлены наружу, в сторону водной среды, а гидрофобные хвосты направлены внутрь друг к другу [3]. Толщина липидного бислоя обычно находится в диапазоне 4–6 нм [1]. Схематическое изображение биологической мембраны представлено на Рисунке 1.

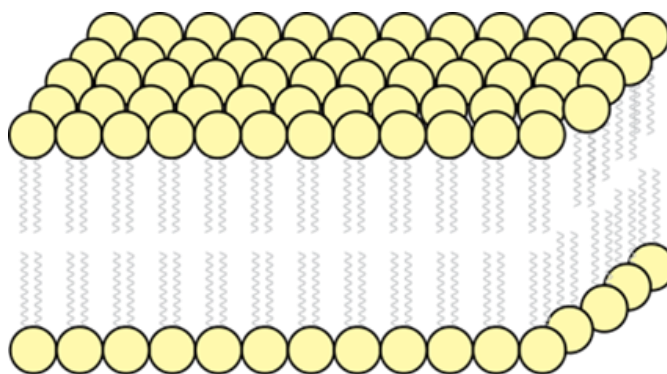


Рисунок 1. Схематическое изображение липидного бислоя. Желтым обозначена гидрофильная головка липида, серым — гидрофобный хвост

Липиды клеточных мембран можно условно разделить на три типа: фосфолипиды, стероиды и гликолипиды [4]. Фосфолипиды являются самыми распространенными липидами в эукариотических мембранах [5]. Они представляют собой сложные эфиры многоатомных

спиртов (глицерина или сфингозина) с высшими жирными кислотами. Также они включают в себя остаток фосфорной кислоты и зачастую азотистое основание [2, 6].

Наиболее распространенными фосфолипидами в клеточных мембранах млекопитающих являются глицерофосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин и фосфатидилсерин). Распределение и транспорт фосфолипидов в мембране имеют решающее значение для поддержания структуры липидного бислоя, а также влияют на текучесть и проницаемость мембраны [5, 7]. Стероиды относятся к липидам животного происхождения. Основным представителем стероидов в мембранах млекопитающих – холестерин, содержание которого может достигать 50 % от общего количества липидов [1]. Холестерин выполняет важную роль в мембранах клеток человека и животных: контролирует подвижность, влияет на проницаемость и текучесть липидного бислоя. Помимо других своих ролей в мембране, холестерин вызывает мембранную гетерогенность, которая широко обсуждается в связи с концепцией липидных рафтов (наноразмерных ансамблей липидов, обогащенных холестерином) [8]. Гликолипиды содержатся во всех тканях, главным образом в наружном липидном монослое плазматических мембран. Они построены из сфингозина или глицерина, остатка жирной кислоты и олигосахарида. Гликолипиды могут выполнять структурные и рецепторные функции и участвовать в построении мембран [9].

Мембранные липиды могут находиться в двух основных фазовых состояниях: гелевом и жидкокристаллическом. Эти состояния различаются плотностью упаковки и подвижностью находящихся в бислое белковых молекул. Фазовые переходы мембранных липидов могут быть вызваны изменением температуры среды. Температура перехода от гелевой к жидкокристаллической фазе называется критической температурой фазового перехода и отличается для разных типов липидов. Фосфолипиды, имеющие хотя бы одну ненасыщенную связь в углеводородной цепи, будут иметь более низкую температуру плавления и более высокую текучесть по сравнению с полностью насыщенными фосфолипидами [10]. Например, для липида 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC) она составляет -5°C , а для липида 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC) 41°C [11]. Гель-фаза отличается более плотной упаковкой, а также максимально вытянутым состоянием углеводородных цепей липидов, подвижность которых ограничена. С ростом температуры цепи становятся более подвижными и укорачиваются [12]. В гелевой фазе толщина мембраны больше, чем в жидкокристаллическом состоянии, за счет вытягивания углеводородных цепей. При переходе из твердого состояния в жидкокристаллическое, объем немного увеличивается, поскольку увеличивается площадь мембраны, приходящаяся на одну молекулу – см. Рисунок 2 [13].

В состав биологической мембраны также входят так называемые свободные жирные кислоты (СЖК), которые выполняют в ней следующие функции: повышают текучесть, служат

источником энергии и структурных компонентов, а также участвуют в ряде биологических процессов. СЖК постоянно образуются и разлагаются, обеспечивая тем самым регуляторную функцию в клетке. Содержание СЖК в мембранах млекопитающих обычно варьируется в пределах 0,3–10 % от общего количества липидов [14-16]. Стеариновые кислоты, изучаемые в настоящей работе, являются примером жирных кислот.

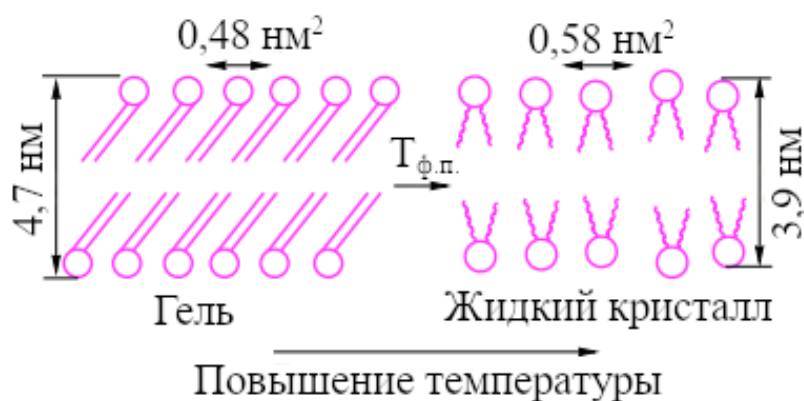


Рисунок 2. Изменение структуры мембраны, состоящей из лецитина, при переходе из геля (твёрдокристаллического состояния) в жидкокристаллическое состояние и обратно [13]

Липиды и белки в мембране организуются и взаимодействуют определенным образом, тем самым определяя ее физико-химические характеристики. Понимание биологических функций клеточных мембран требует детальных знаний об этих процессах. Однако, из-за динамической, гетерогенной и относительно неупорядоченной природы, о структуре и организации мембран известно гораздо меньше, чем о многих других биомолекулярных системах. Для того, чтобы обойти внутреннюю сложность биологических мембран, были разработаны модельные мембраны, которые имитируют наиболее важные их свойства. Существует несколько видов модельных мембранных систем, например, многослойные и однослойные липосомы, мицеллы, бицеллы и т.д.

Липосомы часто применяются в качестве модельных систем для изучения электрических свойств мембран, их проницаемости для различных веществ и для многих других исследований [13]. Эти структуры представляют собой искусственно созданные замкнутые системы, состоящие из одного или нескольких липидных бислоев, разделенных водной прослойкой. В случае низкого содержания воды (40 % воды по массе для фосфатидилхолина) водно-липидная система образует однородную фазу с ламеллярным (слоистым) строением. В этой фазе бислои располагаются параллельно и отделены друг от друга водными прослойками. При дальнейшем увеличении содержания воды система переходит в двухфазные фрагменты – липосомы. При определенных условиях могут быть также получены монослойные липидные пузырьки (или везикулы), в которых только один липидный бислой отделяет внутреннее водное содержимое от окружающей

среды [17]. Структуры, которые могут образовывать липидные бислои в избытке воды, представлены на Рисунке 3.

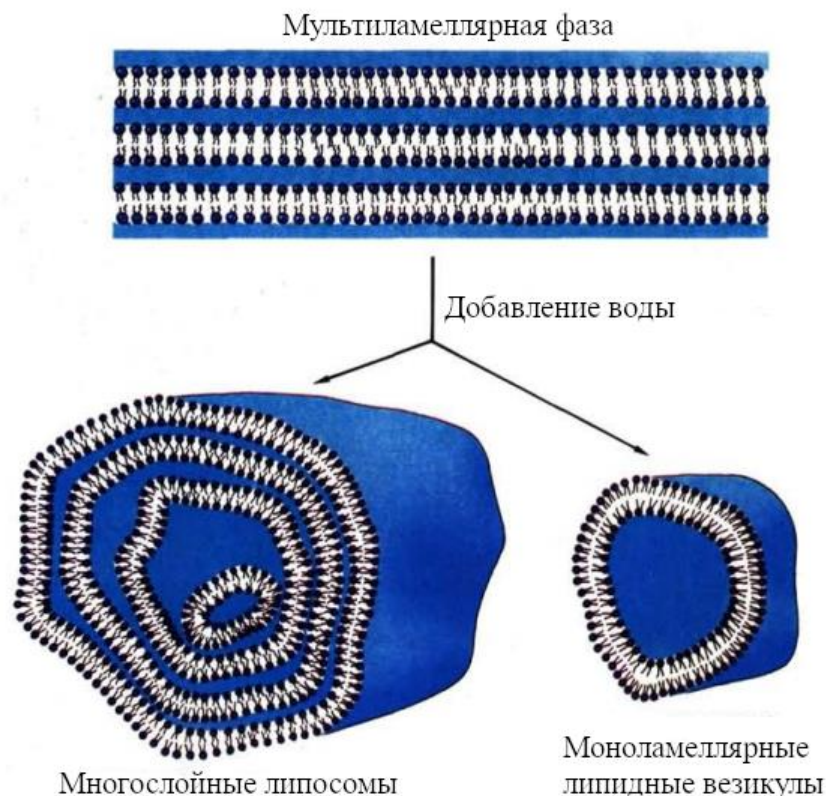


Рисунок 3. Структуры, формируемые липидными бислоями в избытке воды [17]

Для изучения динамики биологических мембран используют флуоресцентный метод и методы радиоспектроскопии (ЯМР и ЭПР). Преимуществом данных методов является возможность получить информацию без нарушения структуры мембраны. Например, с помощью этих методов было выяснено, что при физиологических условиях липидные молекулы находятся в жидком агрегатном состоянии [13].

Информация о молекулярной организации клеточных мембран и об их взаимодействии с внеклеточным и внутриклеточным пространством важна для понимания фармакодинамики и разработки систем доставки некоторых лекарств.

1.2. Антимикробные пептиды

Быстрый рост числа устойчивых к лекарствам инфекций представляет собой серьезную проблему для медицины. Неспособность самых мощных антибиотиков справиться с «супербактериями», или так называемая антибиотическая резистентность, подчеркивает острую необходимость разработки других средств борьбы. Препараты на основе антимикробных пептидов (АМП) являются перспективными кандидатами на замену антибиотикам, так как

являются продуктами длительной эволюции. Они представляют собой олигопептиды с различным количеством (от пяти до ста) аминокислот [18]. Исторически АМП также называли пептидами защиты хозяина, поскольку они являются частью врожденной иммунной системы многих живых организмов (например, млекопитающих, насекомых, земноводных) и обеспечивают защиту от патогенов на начальной стадии инфекции [19]. Эти пептиды обычно имеют широкий спектр целевых организмов: бактерии, грибы, паразиты, вирусы и даже раковые клетки [20, 21]. Природные АМП присутствуют как в клетках прокариот, так и эукариот [22-24]. У животных они преимущественно находятся в тканях и органах, которые могут подвергаться воздействию патогенов, передающихся воздушно-капельным путем (кожа, ротовая полость, дыхательная система) [24]. К настоящему моменту известно более 5000 АМП [25]. Многие антимикробные пептиды вырабатываются определенными клетками постоянно, синтез других должен индуцироваться внешним воздействием [26, 27].

Цель большинства АМП – липосахаридный слой клеточной мембраны [28], в то время как антибиотики ингибируют только четыре классические мишени: биосинтез клеточной стенки бактерий, биосинтез бактериального белка, биосинтез ДНК, ферменты, участвующие в бактериальных обменных процессах [29]. Антимикробные пептиды зачастую обладают амфипатичной структурой и, как правило, высоким положительным зарядом [30]. По сравнению с мембранами эукариотических клеток, бактериальные мембраны имеют высокую долю анионных липидов на поверхности, высокий отрицательный электрический потенциал и не содержат холестерина, что, по-видимому, отвечает за селективность действия АМП против мембран бактерий [28]. Преимуществами АМП является их быстрый терапевтический эффект: они могут подействовать в течение нескольких секунд после контакта с клеточной мембраной [31], широкий спектр действия [18], активность в отношении штаммов, резистентных к традиционным антибиотикам, низкая вероятность развития устойчивости бактерий [32]. Поскольку антимикробные пептиды состоят из аминокислот, их структуру относительно легко модифицировать [33]. Полностью синтетические пептиды можно получить путем химического синтеза [34]. Благодаря этому потенциально можно изменить цель АМП, уменьшить их цитотоксичность и повысить антибактериальную активность [35].

Антимикробные пептиды отличаются по своей вторичной структуре. Существуют: α -спиральная (магаинины и цекропины), β -складчатая (дефензины, тионины), линейная (индолицидин, пирхорицин) и β -шпильчатая и другие [32]. В α -спиральных структурах расстояние между двумя соседними аминокислотами составляет около 0,15 нм, а угол между ними, относительно центра спирали, составляет приблизительно 100 градусов. Образование α -спиралей является результатом действия водородных связей внутри молекулы [32, 36]. β -складчатость отличается наличием двух или нескольких дисульфидных связей внутри молекулы.

Для β -шпилечной формы характерна одна дисульфидная связь [37]. Если дисульфидная связь находится на концах молекулы, то это либо циклическая молекула, либо линейная с одной петлей. Некоторые из описанных выше структур представлены на Рисунке 4. В состав антимикробных пептидов обычно входит до 50 % гидрофобных аминокислот, благодаря чему они обладают амфипатичностью, которую принимают на границе раздела липидных мембран при взаимодействии с клеткой-мишенью: гидрофобные части молекулы ориентируются к липидному бислою, оставляя гидрофильные части в растворе. Такое свойство АМП зачастую отвечает за их активность против бактерий. В водном растворе антимикробные пептиды зачастую не имеют определенной структуры и представляют из себя линейную последовательность аминокислот [32].

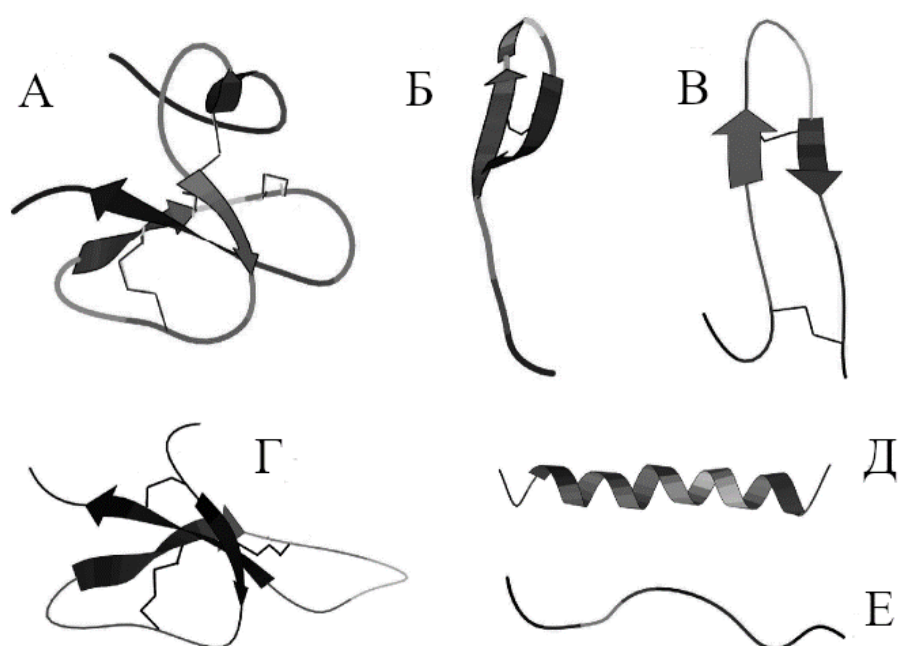


Рисунок 4. Конформации различных антимикробных пептидов: А – β -дефензин-2 (смешанная конформация); Б – танатин (циклическая конформация); В – β -полифемусина (β -шпилечная конформация); Г – дефензина-1 (смешанная конформация); Д – магаинина-2 (α -спираль); Е – индолицидина (линейная конформация) [38]

Антимикробное действие пептидов зачастую определяется их взаимодействием с мембраной бактерий. Она может являться барьером, который необходимо преодолеть, чтобы воздействовать на основные метаболические пути, либо быть основной мишенью действия [30]. Изменение проницаемости мембраны под действием антимикробных пептидов приводит к рассеиванию электрохимического потенциала, асимметрии липидов и потере важных метаболитов и клеточных компонентов. За этим обычно следует уменьшение размеров клетки и ее гибель [39]. При низких соотношениях пептида к липиду (П/Л) молекулы пептидов распределяются в мембране случайным образом, но предпочтительно – параллельно ее

поверхности. При увеличении этого соотношения до порогового значения P/L^* , пептиды самоорганизуются, образуя поры (каналы) – см. Рисунок 5. На внутренней стороне каналов располагается полярная часть пептидной спирали [40]. В процессе формирования пор может происходить наклон пептидной спирали или переход к полностью трансмембранной ориентации. Внутренний размер пор может меняться в зависимости от степени олигомеризации пептида, таким образом позволяя транспортировать небольшие ионы, воду или даже крупные полярные молекулы. Критическое (пороговое) соотношение P/L^* , для модельной биологической мембраны, состоящей из полностью насыщенных фосфолипидов, находится в пределах 1/100 – 1/50 [41].

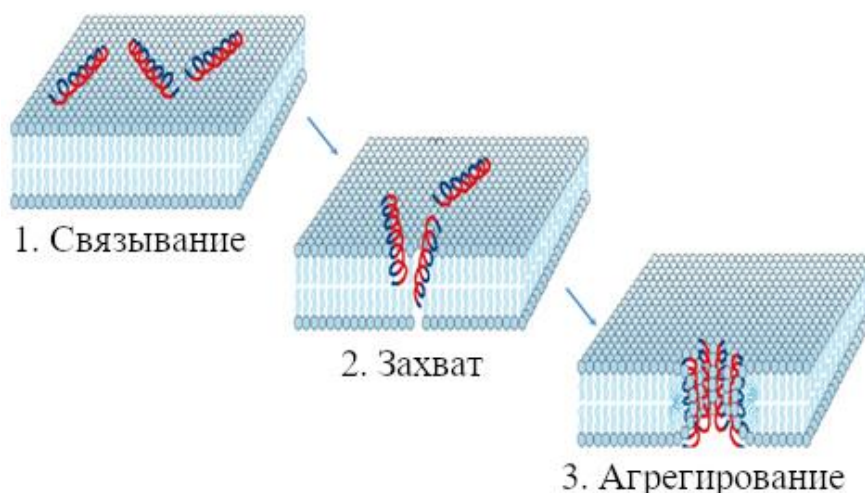


Рисунок 5. Взаимодействие антимикробных препаратов с бактериальной мембраной включает в себя несколько этапов: связывание с мембраной, ее возмущение и разрушение

Помимо порообразующего механизма антимикробного действия, предполагаются и другие механизмы разрушения мембран при концентрациях, гораздо ниже критических. Например, данные малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) показали, что низкая концентрация пептида аламетицина (0,5 мол %) нарушает латеральную неоднородность холестеринсодержащих липидных везикул [42]. Пептид ауреин может вызывать латеральное перераспределение липидов, не образуя пор и не разрушая мембраны [43]. Импульсный ЭПР спин-меченых свободных жирных кислот показал, что эти молекулы собираются вокруг пептидных молекул аламетицина [44] и трихогина [45]. Схематическое изображение альтернативного механизма действия АМП представлено на Рисунке 6.

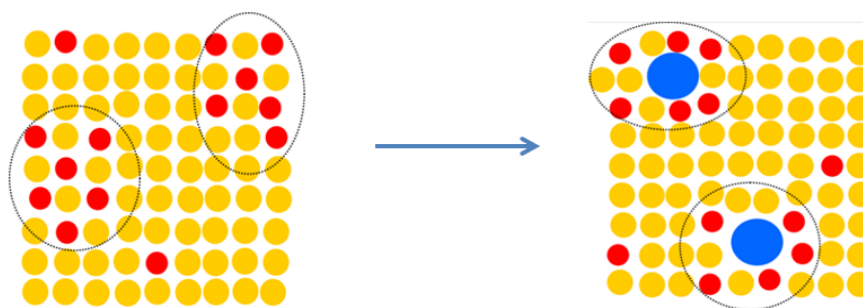


Рисунок 6. Альтернативный механизм действия АМП на мембрану бактерий. Желтым цветом обозначены липиды, формирующие бислои, красным – СЖК, синим – АМП. Пептид нарушает липидный гомеостаз клетки, в частности, перераспределяет жирные кислоты при концентрациях меньше критических

1.2.1. Хальципорин А

Пептабиотики представляют собой отдельное, встречающееся в природе семейство антимикробных пептидов, выделенное из грибов класса *Trichoderma* и *Gliocladium* [46, 47]. Они состоят из 4-21 аминокислотных остатков и содержат большое количество некодирующей α -аминоизомасляной кислоты (Aib). Также их отличает ацилированный N-конец и гидроксикаминокислота на C-конце [48]. Пептабиотики активны в отношении грамположительных бактерий и грибов, а свое антимикробное действие проявляют путем взаимодействия с фосфолипидами мембраны [49].

Антимикробный пептид хальципорин А относится к пептабиотикам и выделен из штамма грибов *Serpodonium chalcipori*. Данный пептид является пептидом средней длины, который содержит 14 аминокислотных остатков и характеризуется относительно низкой долей (20 %) остатка Aib, благодаря чему обладает конформационной гибкостью. Хальципорин хорошо растворим в органических растворителях и плохо растворим в воде. К числу его свойств также относится частичная амфипатичность и α -спиральная конформация. Его представление в спиральной конформации представлено на Рисунке 7. Аминокислотная последовательность хальципорина выглядит следующим образом: Ac-Trp-Val-Aib-Val-Ala-Gln-Ala-Aib-Ser-Leu-Ala-Leu-Aib-Gln-Lol [49].

Антимикробный пептид хальципорин исследовался ранее: известно о его эффективном сродстве к мембране, высокой склонности к проникновению в липидный бислой, активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий [49]. Однако молекулярный механизм его антимикробного действия до сих пор остается открытым вопросом. Поскольку известно, что активность пептабиотиков коррелирует с их способностью вызывать латеральное перераспределение заряженных липидов или липидоподобных молекул [42, 50-52], вплоть до

образования проводящих пор [53], в данной работе изучается влияние антимикробного пептида хальципорина А на наноразмерные кластеры, образованные свободными жирными кислотами.

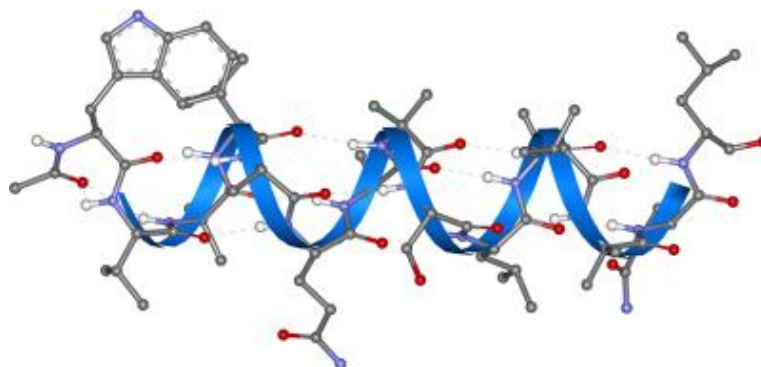


Рисунок 7. Представление хальципорина А в α -спиральной конформации, вид сбоку [49]

1.3. Нестероидные противовоспалительные препараты

Салициловая кислота и ее производные, полученные из природных источников, давно используются в качестве антисептиков, жаропонижающих и противоревматических средств. Форма салициловой кислоты, пригодная для медицинского использования, была синтезирована в 1860 году, а почти 40 лет спустя был разработан аспирин и другие препараты, схожие с ним по терапевтическому действию. Эта группа лекарств была названа «аспириноподобными препаратами» (современное название – нестероидные противовоспалительные препараты [НПВП]) [54]. НПВП обладают противовоспалительными, жаропонижающими и обезболивающими свойствами, также они нашли свое применение при лечении ревматических, травматологических и неврологических заболеваний [55, 56]. В последние годы растет число сообщений об использовании НПВП для профилактики и лечения рака [57]. Несмотря на свою клиническую эффективность, НПВП обладают рядом побочных эффектов, в число которых входит негативное влияние на желудочно-кишечную и сердечно-сосудистую системы [58]. Ибупрофен, напроксен и диклофенак являются наиболее распространенными НПВП [59].

Общепризнанным механизмом действия НПВП является ингибирование активности фермента циклооксигеназы (ЦОГ), который отвечает за выработку простагландинов [60]. Простагландины хорошо известны как медиаторы признаков воспаления – боли, отека, красноты и жара [61]. Существует, по крайней мере, две изоформы ЦОГ. ЦОГ-1 является естественным ферментом, который обнаруживается во многих тканях и защищает желудок и почки от повреждений. ЦОГ-2 в норме отсутствует в большинстве тканей, однако она начинает продуцироваться под влиянием воспалительных процессов [56]. Предполагается, что противовоспалительное действие НПВП обусловлено ингибированием ЦОГ-2, в то время как

нежелательные побочные эффекты, такие как раздражение слизистой оболочки желудка, почечная и сердечно-сосудистая недостаточность, вызваны ингибированием ЦОГ-1 [60, 62, 63]. Хотя граница размыта, выделяют две основные группы НПВП: старые, традиционные, неселективные НПВП, которые ингибируют как ЦОГ-1, так и ЦОГ-2, и новые, селективные ингибиторы ЦОГ-2 [54].

Циклооксигеназа является связанным с мембраной энзимом, поэтому чтобы проявить свою терапевтическую активность, нестероидным противовоспалительным препаратам необходимо сначала пройти через липидный бислой [64]. Основная часть биологической активности НПВП обусловлена механизмами, связанными с ингибированием циклооксигеназы, однако некоторые исследования демонстрируют, что часть биологической активности также может быть связана с взаимодействием НПВП с фосфолипидами клеточной мембраны по ЦОГ-независимому пути [65-68]. Первая физическая встреча молекул лекарств с клетками происходит с их липидными бислоями – фундаментальной основой биологических мембран. Взаимодействие НПВП с клеточными мембранами зависит от различных факторов, включая состав и физическое состояние мембраны, концентрацию препарата, заряда мембраны и препарата и т. д. Это взаимодействие может быть причиной изменений биомеханических свойств фосфолипидного бислоя (эластичность, сжимаемость, микровязкость), структурных свойств (толщина и упаковка липидов) и термодинамических свойств (температура фазового перехода) [69]. Например, было показано, что молекулярный механизм, лежащий в основе местного раздражения желудка нестероидными противовоспалительными препаратами, может включать изменения поверхностно-активных свойств желудочных фосфолипидов (изменение организации, текучести и проницаемости, разрушение мембраны). Эти изменения, в свою очередь, часто связаны с побочными эффектами лекарств [70]. Эксперименты по дифракции рентгеновских лучей на бислоях, состоящих из основных фосфолипидов, присутствующих во внешней и внутренней мембране эритроцитов, показали, что диклофенак встраивается в мембрану и нарушает ее структуру. Подобное воздействие лекарственного средства способно вызывать нарушение кровоснабжения, дефицит кислорода и повреждение тканей из-за изменения проходимости микроскопических сосудов [71]. Результаты измерений рассеяния нейтронов с высоким энергетическим разрешением продемонстрировали влияние НПВП ибупрофена и индометацина на движение липидов и их фазовое поведение в модельной мембране [72]. Авторы работы [72] пришли к выводу, что несмотря на то, что многие НПВП имеют общие черты в механизмах, отвечающих за их биологическую активность, их взаимодействие и влияние на мембраны клеток может зависеть от химической структуры, размера и гидрофобности препарата. Расположение внутри мембраны и влияние лекарственных средств на динамику мембраны также определяется этими факторами.

Для оценки влияния лекарственного препарата на клетку имеет значение его распределение внутри мембраны. Например, было показано, что аспирин взаимодействует с областью головной группы бислоев, что приводит к увеличению текучести липидов [73, 74]. Исследование взаимодействия молекул лекарственных препаратов с липидными бислоями, содержащими холестерин, является очень важным, поскольку он входит в состав многих биологических мембран и оказывает влияние на их функциональные, структурные и динамические свойства [75]. При исследовании взаимодействия аспирина с мембранами, содержащими холестерин, было обнаружено, что данный препарат противодействует конденсирующему эффекту холестерина и повторно растворяет холестериновые бляшки в липидных бислоях при высоких концентрациях холестерина [76, 77]. Кроме того, аспирин ингибирует образование липидных рафтов при физиологических концентрациях холестерина [78]. Также было показано, что в присутствии 20 мол % холестерина, ибупрофен в концентрации 5 мол %, вытесняется из гидрофобного ядра мембраны и сохраняется исключительно в области головной группы бислоев [79]. Результаты данной работы подтверждают, что ибупрофен взаимодействует с липидными мембранами, и это взаимодействие зависит от присутствия холестерина.

Таким образом, исследование взаимодействия лекарств и липидных мембран различного состава имеет важное значение для понимания молекулярного механизма, лежащего в основе их физиологической активности и побочных эффектов.

1.3.1. Ибупрофен и диклофенак

Ибупрофен и диклофенак – это наиболее известные и эффективные нестероидные противовоспалительные препараты, которые часто используются в медицинской практике [80].

Ибупрофен представляет собой 2-(4-изобутилфенил)-пропионовую кислоту – см. Рисунок 8 А. В его составе присутствует полярная головная группа ($-\text{COOH}$) и гидрофобная часть (фенильное кольцо и изобутильный хвост). Ибупрофен является слабой кислотой ($\text{pK}_a \approx 4,6$) и плохо растворяется в воде [81]. Поскольку ибупрофен является амфифильной молекулой и растворяется в липидах, то он может взаимодействовать с биологическими мембранами клеток. Есть доказательства того, что влияние данного препарата на мембраны, вероятно, является его дополнительным механизмом действия и токсичности [64, 69, 82]. Для исследования изменений в структурах липидных мембран, вызванных ибупрофеном, использовались различные экспериментальные и вычислительные методы, такие как молекулярная динамика [75, 83], сочетание компьютерного моделирования и нейтронной дифракции [84], рассеяние рентгеновских лучей [79], рассеяние нейтронов [72, 85], твердотельный ЯМР [86], ЭПР спиновых

меток [87] и другие. Полученные данные показали, что ибупрофен предпочтительно располагается в гидрофобной внутренней части мембраны, а также нарушает предпереход липидного бислоя, уменьшает плотность молекулярной упаковки полярных головок и влияет на другие молекулярные свойства мембраны. Терапевтические концентрации ибупрофена обычно лежат в диапазоне $\sim 10\text{--}50$ мг/л [82]. Однако концентрации ибупрофена, используемые в большинстве экспериментальных подходов, довольно высоки, обычно от 2 мол % до 20 мол % от общего количества липидов [75-82], что значительно больше, чем терапевтические дозы. С этой точки зрения может оказаться полезным использование спин-меченого ибупрофена. Благодаря большому магнитному моменту спина электрона возможно снизить исследуемые концентрации до десятых долей мольного процента.

Диклофенак — нестероидный противовоспалительный препарат класса фенилуксусной кислоты [88] – см. Рисунок 8 Б. Он является слабой кислотой с $pK_a \approx 4$ [89] и имеет низкую растворимость в воде, в связи с чем его продают в виде натриевой соли для улучшения его биодоступности. Диклофенак, в отличие от многих других НПВП, ингибирует фермент ЦОГ-2 более эффективно, чем ЦОГ-1. Подобно другим НПВП, диклофенак имеет желудочно-кишечные, сердечно-сосудистые и почечные побочные эффекты [88]. Известно, что некоторые побочные эффекты диклофенака могут быть связаны с его взаимодействием с биологическими мембранами [90-92].

По причинам, описанным в предыдущем абзаце для ибупрофена, в данной работе будет использоваться спин-меченый аналог диклофенака.

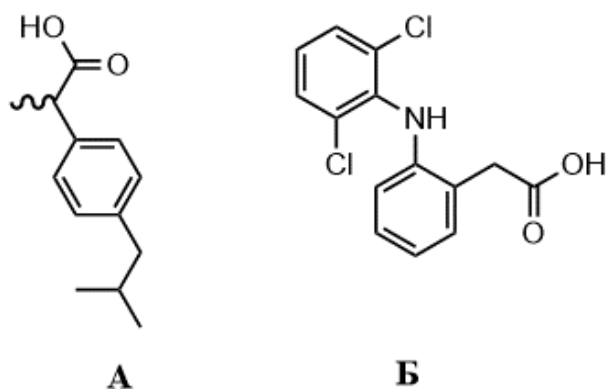


Рисунок 8. А – структурная формула ибупрофена, Б – структурная формула диклофенака

1.4. Холестерин

Стерины контролируют биологические процессы и доменную структуру биологических мембран. Самым известным представителем стерина в плазматических мембранах эукариот является холестерин [93], его содержание составляет около 30 % от общего количества липидов

[94]. В эритроцитах и миелине его концентрация сравнима с концентрацией фосфолипидов [95]. Он представляет собой непредельный одноатомный циклический спирт и состоит из четырех конденсированных углеводородных колец с полярной гидроксильной группой на одном конце и разветвленным алифатическим хвостом на другом конце [96]. Холестерин встраивается в мембрану так, что его –ОН-группа ориентирована в сторону полярных головок фосфолипидов, а алифатическая цепь направлена параллельно углеводородным цепям в центре бислоя [97]. Кольцевая часть холестерина обладает значительной жесткостью, тогда как боковая цепь более подвижна [10]. Его структурная формула представлена на Рисунке 9.

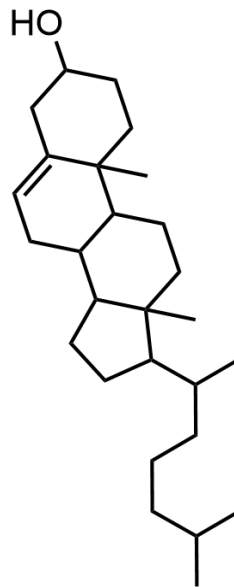


Рисунок 9. Структурная формула холестерина

Холестерин модифицирует физико-химические свойства биологических мембран множеством способов. Он изменяет текучесть, толщину, сжимаемость, проницаемость и внутреннюю кривизну липидных бислоев [96]. Кроме того, холестерин необходим для синтеза витамина D, желчных кислот, а также стероидных гормонов, включая половые и вырабатываемые в коре надпочечников, в организме млекопитающих [98].

Одно из уникальных свойств холестерина, которое выделяет его среди других липидных молекул, – это его конденсирующий (упорядочивающий) эффект. При взаимодействии холестерина с фосфолипидными бислоями происходит увеличение их толщины. Углеводородные цепи становятся менее подвижными и более упорядоченными. Поскольку объем цепи сохраняется при растяжении цепи, увеличение толщины напрямую коррелирует с уменьшением площади, занимаемой молекулой фосфолипида, или эффектом конденсации – см. Рисунок 10 [99].

Известно, что холестерин по-разному взаимодействует с различными мембранными липидами, преимущественно связываясь с насыщенными, высокоплавкими фосфо- и

сфинголипидами и слабо с ненасыщенными липидами. Таким образом он оказывает эффект уплотнения на жидкие липидные мембраны: регулирует жесткость и влияет на текучесть остатков жирных кислот в молекулах фосфолипидов. При определенной температуре присутствие холестерина приводит углеводородные цепи различных молекул фосфолипидов в состояние «промежуточной жидкости». У тех липидов, которые в обычных условиях находятся при температуре выше, чем температура фазового перехода (ненасыщенные фосфолипиды), движение цепи затормаживается, в то время как углеводородные цепи липидов, которые в обычных условиях находятся в состоянии геля, приобретают большую текучесть (насыщенные фосфолипиды). Следовательно, присутствие холестерина в мембране понижает температуру фазового перехода [4, 100, 101].

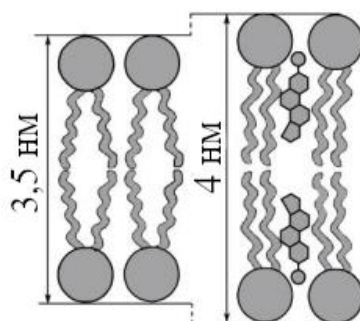


Рисунок 10. Конденсирующий эффект холестерина. Бислоем, состоящим из фосфатидилхолина (слева). При взаимодействии фосфатидилхолина с холестерином происходит вытягивание углеводородных цепей липида, толщина мембраны увеличивается, площадь, приходящаяся на липид, уменьшается (справа) [1]

Природа липид-холестериновых взаимодействий в настоящее время активно исследуется с использованием различных физико-химических методов, поскольку эти взаимодействия играют важную роль в поддержании структуры мембран и гомеостазе холестерина в клетках животных. Новым направлением в данной области является исследование липидных рафтов – латерально сегрегированных мембранных доменов [101].

1.4.1. Липидные рафты

В настоящее время общепринята жидкостно-мозаичная модель строения мембраны. Согласно этой модели, мембрана является сложной, гетерогенной, динамической, высококооперативной системой, состоящей из «моря» жидких липидов, в котором плавают «айсберги» белков [1, 17]. Схематически жидко-мозаичная модель мембраны представлена на Рисунке 11.

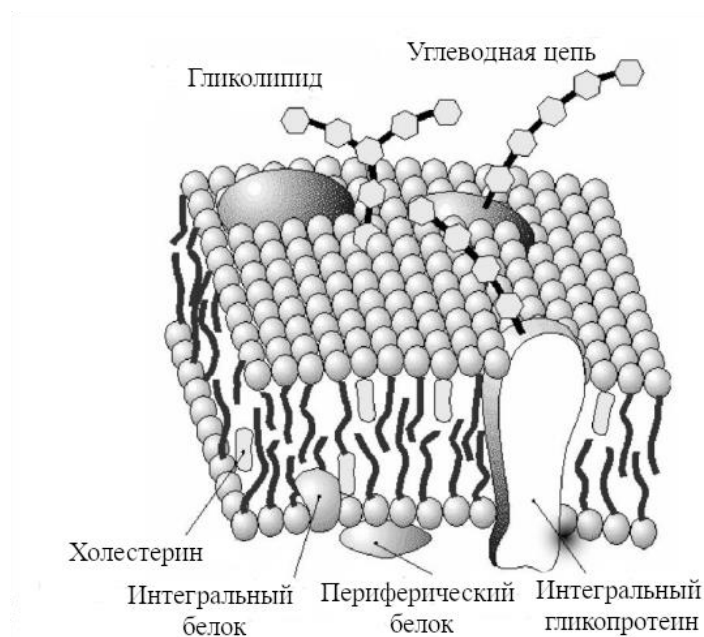


Рисунок 11. Жидко-мозаичная модель мембраны [1]

Несмотря на то, что эта модель была предложена около 40 лет назад, она все еще остается актуальной для описания основных наноструктур различных внутриклеточных и клеточных мембран растительных и животных клеток и низших форм жизни. Однако в последнее время появляется все больше доказательств того, что данная модель требует значительного пересмотра, поскольку она не учитывает функционального значения физической гетерогенности в липидной организации мембран [1, 102]. Динамическая неоднородность распределения липидных молекул определяет латеральную гетерогенность мембраны.

Липидные домены – это ансамбли липидных молекул, возникающие вследствие теплового движения и образующие в результате взаимодействия доменную структуру липидного монослоя [1]. В настоящее время считается, что формирование мембранных липидных наноразмерных доменов является динамичным и обратимым процессом [103-105], который обусловлен следующими причинами: водородными связями, гидрофобными энтропийными и Ван-дер-Ваальсовыми силами [106-108]. Липидные домены имеют определенный размер, а также характеризуются временем жизни липидных молекул в домене. С ними могут быть связаны некоторые белки. Они могут перемещаться в плоскости мембраны как целое. Свойства липидных доменов зависят от их липидного состава [1].

Липидные рафты (плоты) – это небольшие (10-200 нм), высокодинамичные, обогащенные стеролами, сфинголипидами и насыщенными фосфолипидами домены. Они имеют нестабильную и гетерогенную структуру, а также относительно нерастворимы в окружающих липидах [109-111]. Из-за жесткой структуры стерольной группы, в многокомпонентных липидных смесях, холестерин преимущественно взаимодействует с длинными, насыщенными

фосфо- и сфинголипидами, которые сами по себе обладают высокими температурами фазового перехода из геля в жидкий кристалл. Поэтому липидные бислои, состоящие из низкоплавкого и высокоплавкого липида и холестерина, могут образовывать жидконеупорядоченные и жидкоупорядоченные структуры (липидные рафты) [112]. Липидные рафты имеют большую плотность, чем остальная часть мембраны и способны свободно дрейфовать в ней. Толщина рафтов, как правило, больше, чем толщина бислоя в жидкой фазе [1], а уровень холестерина в них обычно вдвое выше по сравнению с плазматической мембраной [113]. Рафты могут составлять до 30 % поверхности клеточной мембраны [114]. Схематическое изображение липидного рафта представлено на Рисунке 12.

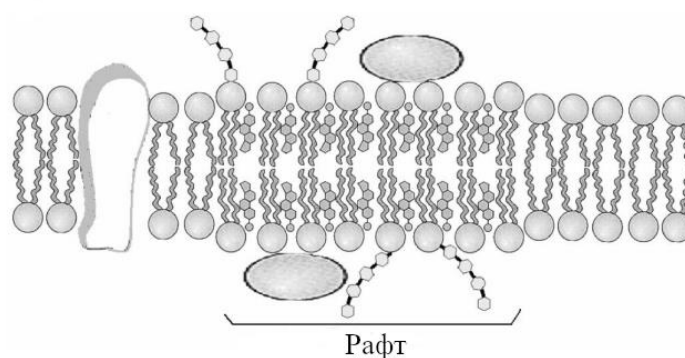


Рисунок 12. Схематическое изображение липидного рафта [1]

Предполагается, что липидные рафты могут выполнять следующие функции: координация клеточных процессов, влияние на текучесть мембраны, выполнение роли липидных платформ для мембранных белков, рецепторов и сигнальных молекул, запуск клеточного отклика [1, 111].

Исследования, проведенные на модельных мембранах, показали, что ключевой движущей силой формирования доменов является линейное (поверхностное) натяжение – см. Рисунок 13 [115]. Линейное натяжение относится к энергии, необходимой для создания границы между плотом и окружающей мембраной. Липидные рафты толще окружающей мембраны, поскольку холестерин преимущественно взаимодействует со сфинголипидами, которые имеют более вытянутые и прямые углеводородные цепи по сравнению с остальными липидами. Это приводит к гидрофобному несоответствию – гидрофобные части рафтов не стыкуются с остальным бислоем на границе раздела двух фаз. Таким образом, система стремится минимизировать энергию, необходимую для поддержания рафтов в виде отдельных фаз [116, 117]. Деформация липидов, присутствие широкого разнообразия видов липидов с различной длиной цепи и степенью насыщения, объединение небольших плотов в более крупные, а также искривление мембраны облегчают компенсацию различий в толщине мембраны [118]. Таким образом,

границу липидного домена можно определить как область, в которой возникает линейное натяжение в результате гидрофобного несоответствия между липидами в рафте и окружающей мембраной. Было обнаружено, что липидный состав и результирующее линейное натяжение являются наиболее значимыми факторами, влияющими на размер и наличие домена [119].

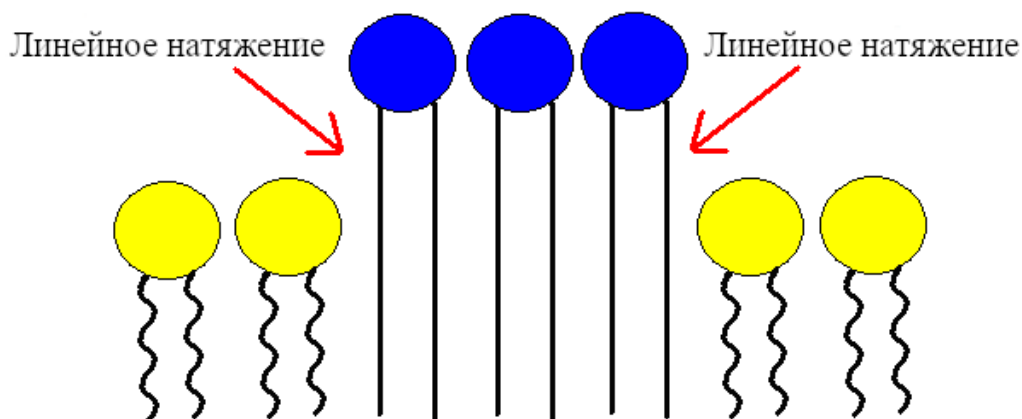


Рисунок 13. Линейное натяжение на границе домена. Вытянутые липиды (синие полярные головки) – сфинголипиды, входящие в состав доменов, укороченные липиды (желтые полярные головки) – окружающий бислой [116]

Концепция липидных рафтов не получила всеобщего признания, поскольку все еще остаются открытыми вопросы об их времени жизни, размерах, функциональной роли и липидно-холестериновом составе. Однако в последние годы наблюдается резкое повышение интереса к данной теме. Гипотеза липидных плотов помогает связать функциональные свойства мембран с латеральной гетерогенностью мембраны, а также может объяснить многие процессы, протекающие в ней. Она подтверждается тем, что липиды в клеточной мембране имеют тенденцию к кластеризации (минимизация свободной энергии системы). Это приводит к латеральной неоднородности плазматической мембраны. Например, в мембране может возникнуть гетерогенность из-за более плотной упаковки холестерина с насыщенными и мононенасыщенными фосфолипидами по сравнению с полиненасыщенными фосфолипидами [1].

Даже спустя более двух десятилетий с момента появления гипотезы липидного рафта, понимание того, как формируются липидные рафты, и как они способствуют передаче сигналов клетками, до сих пор отсутствует. Причина этого заключается в том, что они имеют высокодинамичную структуру и максимальный размер не более 200 нм, что существенно ограничивает число методов для их изучения. Чтобы более детально выяснить роль липидных рафтов, необходимы дополнительные представления о наномасштабной латеральной сегрегации в мембранах [120].

1.5. Метод спиновых меток и зондов

Метод спиновых меток и зондов стал активно использоваться, начиная с 1970-х годов и нашел свое применение в исследованиях структурно-динамических свойств макромолекул и биомембран [121]. Принцип этого подхода заключается в том, что в изучаемую систему вводят стабильный радикал (спиновая метка или зонд), и его спектр ЭПР будет зависеть от среды, в которой он находится [122]. Спиновые метки представляют собой стабильные радикалы, которые ковалентно связаны с макромолекулами. Спиновые зонды – это стабильные парамагнитные молекулы, которые вводятся в исследуемую систему в качестве малых примесей [123]. Существует большое количество спиновых меток и зондов, но зачастую их объединяет наличие одинакового парамагнитного фрагмента – химически стабильного нитроксильного радикала ($>N-O\bullet$) [124]. Стабильность нитроксильных радикалов обусловлена пространственным экранированием группы $N-O\bullet$, содержащей неспаренный электрон, четырьмя метильными группами [122]. Простой пример нитроксильного радикала приведен на Рисунке 14.

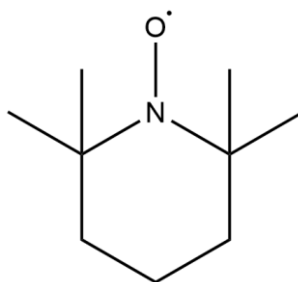


Рисунок 14. Пример нитроксильного радикала – ТЕМПО (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил)

С помощью разработанных теоретических методов можно соотнести параметры спектра ЭПР радикала с параметрами, характеризующими свойства системы. Это позволяет получить данные о характере и скорости движения молекул, изменениях в конформации макромолекул и т.д. [122] Метод спиновых меток и зондов может дать информацию о физических свойствах мембраны, таких как текучесть, полярность, проницаемость для полярных и неполярных молекул, транспорт кислорода и оксида азота, липидный обмен и т.д. [125]. В этих целях обычно применяют жирорастворимые спиновые метки. Их преимуществом является то, что они сравнительно легко встраиваются в мембрану, поэтому могут служить в качестве чувствительных индикаторов. Например, часто используются спин-меченые стеариновые кислоты, которые имеют полярную головку (COO^-) и гидрофильный хвост. При использовании стеариновых кислот, содержащих спиновую метку в различных положениях ацильной цепи, можно исследовать строение липидного бислоя на разной глубине [124, 125]. Нитроксильные спиновые метки, как правило, довольно малы и химически инертны,

и поэтому можно предположить, что они вносят лишь незначительное искажение в исследуемую молекулярную систему.

С недавних пор активно развивается применение метода спиновых меток и зондов в импульсном ЭПР, в частности, в методе двойного электрон-электронного резонанса, методе модуляции спада сигнала электронного спинового эха и т.д. [121]

1.5.1. Стационарный ЭПР

Спин — это собственный момент частицы, не связанный с ее перемещением в пространстве как целого. Это векторная величина. Спином обладает свободный электрон, а также многие ядра. Спин электрона равен $1/2$. Частица со спином обладает магнитным моментом μ_e . Магнитный момент связан со спиновым моментом электрона следующим образом:

$$\vec{\mu}_e = -\gamma\hbar\mathbf{S} = -g\beta\mathbf{S}, \quad (1)$$

где γ – гиромагнитное отношение свободного электрона, g – фактор электрона, β – магнетон Бора, \mathbf{S} – спиновый момент свободного электрона. Значение g -фактора свободного электрона равно 2,0023. Если электрон находится в молекулярной системе, то значение g -фактора будет отличаться от g -фактора для свободного электрона и будет зависеть от спин-орбитального взаимодействия и распределения электронной плотности в молекуле. Спин может иметь следующие проекции:

$$S_z = m_s\hbar, \quad (2)$$

где $m_s = -s, \dots, s$. Таким образом, спин электрона имеет две проекции: $+1/2$ и $-1/2$.

ЭПР-спектроскопия основана на взаимодействии парамагнитной частицы с постоянным магнитным полем, в результате которого у частицы появляется переменный магнитный момент, вращающийся с частотой ν_0 , перпендикулярной направлению поля B_0 . Взаимодействие спинов с внешним постоянным однородным магнитным полем называется зеемановским взаимодействием спинов и описывается следующим гамильтонианом:

$$\hat{H} = g\beta\mathbf{B}\mathbf{S} = -\vec{\mu}_e\vec{B}_0, \quad (3)$$

Введем пространственную систему координат. Пусть магнитное поле направлено вдоль оси z этой системы. Тогда гамильтониан взаимодействия спина электрона с магнитным полем будет выглядеть следующим образом:

$$\hat{H} = g\beta BS_z, \quad (4)$$

Вследствие вырождения по проекции спина энергия свободного электрона не зависит от его положения в пространстве, если внешнее магнитное поле выключено. Но при его включении будет происходить расщепление уровня энергии электрона на два подуровня, которые соответствуют двум противоположным ориентациям спина электрона – по направлению

магнитного поля (проекция спина $+1/2$) и против направления поля (проекция спина $-1/2$). Графически расщепление уровней энергии спина электрона во внешнем магнитном поле можно представлено на Рисунке 15.

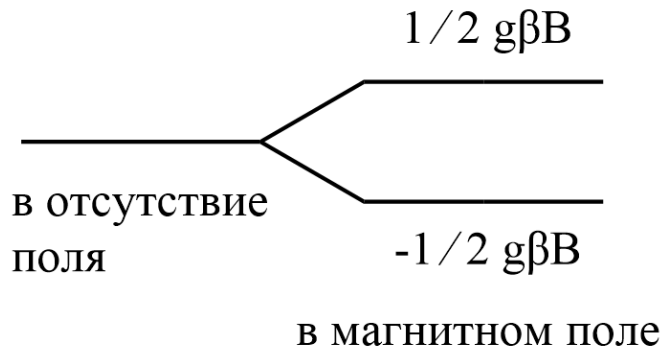


Рисунок 15. Схема расщепления уровней спина электрона $1/2$ в магнитном поле

Гамильтониан (4) имеет также две собственные волновые функции – $|\alpha\rangle$ и $|\beta\rangle$. Функция $|\alpha\rangle$ соответствует проекции спина $1/2$, функция $|\beta\rangle$ проекции $-1/2$. Населенности уровней для макроскопического ансамбля спинов можно обозначить как N_α и N_β . В условиях теплового равновесия электроны распределяются по уровням согласно закону Больцмана:

$$\frac{N_\alpha^0}{N_\beta^0} = \exp\left(-\frac{g\beta B_0}{kT}\right). \quad (5)$$

При воздействии переменного магнитного поля B_1 , которое вращается с частотой ν_1 , могут происходить переходы электронов с одного уровня на другой, если выполняется следующее условие:

$$h\nu = g\beta B_0. \quad (6)$$

Взаимодействие переменного магнитного поля с магнитным моментом тем больше, чем частота ν_1 ближе к ν_0 . При равенстве частот наступает резонанс, сопровождающийся поглощением энергии переменного магнитного поля B_1 в исходную систему. Поглощение энергии наблюдается в том случае, если между уровнями существует разность заселённости. Заселенность нижних энергетических уровней больше, чем верхних, и поэтому при облучении электромагнитным СВЧ-излучением будут преобладать переходы с нижнего на верхний уровень с поглощением энергии излучения [126, 127].

В молекуле спиновой метки неспаренный электрон находится вблизи ядра азота, обладающего собственным магнитным моментом, поэтому между спинами электрона и ядра существует сверхтонкое взаимодействие (СТВ). На неспаренный электрон, помимо внешнего магнитного поля, начинает действовать магнитное поле, создаваемое магнитным моментом ядра азота. Ядро азота имеет спин $I = 1$. По законам квантовой механики магнитный момент ядра азота может иметь три ориентации: по направлению, перпендикулярно и против внешнего магнитного

поля ($I_z = +1, 0, -1$). Следовательно, каждый уровень энергии неспаренного электрона расщепится на три подуровня за счет его взаимодействия с ядром азота. Гамильтониан дипольного взаимодействия между спинами электрона и ядра выглядит следующим образом:

$$\hat{H} = \beta \mathbf{B}_0 \mathbf{g} \mathbf{S} + \mathbf{S} \mathbf{A} \mathbf{I}, \quad (7)$$

где \mathbf{B}_0 – постоянное внешнее магнитное поле, направленное вдоль оси z лабораторной системы координат, \mathbf{g} – \mathbf{g} -тензор электрона, \mathbf{S} – оператор спина электрона, \mathbf{I} – оператор спина ядра азота, \mathbf{A} – тензор сверхтонкого взаимодействия электрона со спином ядра азота. Согласно квантомеханическим правилам отбора, при воздействии микроволнового излучения, могут происходить переходы, удовлетворяющие следующим условиям: $\Delta S_z = \pm 1$ (ориентация спина электрона изменяется) и $\Delta I_z = 0$ (ориентация ядерного спина сохраняется). Из этого следует, что вследствие СТВ в спектре ЭПР нитроксильного радикала появятся три линии, которые будут соответствовать трем возможным ориентациям магнитного момента ядра азота ($I_z: -1, 0, +1$) [124, 127, 128]. Схема уровней и переходы для спинов электрона и связанного с ним ядра азота представлены на Рисунке 16.

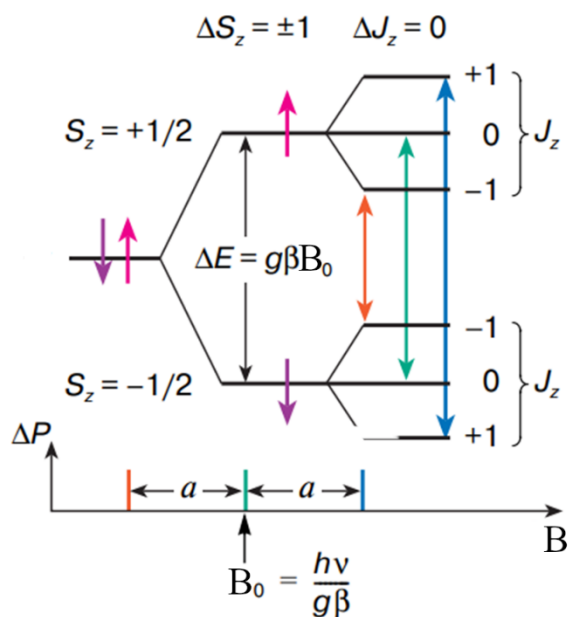


Рисунок 16. Схема энергетических уровней неспаренного электрона в молекуле спиновой метки [124]

Главным членом гамильтониана является зеемановское взаимодействие, а слагаемое со сверхтонким взаимодействием учитывается в первом порядке теории возмущений. Для нитроксильных радикалов в X-диапазоне (длина волны около 3 см, частота примерно 10 ГГц) ядерное зеемановское взаимодействие намного меньше анизотропного СТВ, поэтому оно здесь не учитывается. Гамильтониан (7) в лабораторной системе отсчета, где ось z направлена вдоль

направления магнитного поля, с применением первого порядка теории возмущений, записывается в следующем виде:

$$\hat{H} = \beta B g_{zz} S_z + S_z (A_{zx} I_x + A_{zy} I_y + A_{zz} I_z). \quad (8)$$

Компоненты тензора СТВ в лабораторной системе координат имеют вид:

$$\begin{aligned} A_{zx} &= (A_{xx} \cos^2 \varphi + A_{yy} \sin^2 \varphi - A_{zz}) \sin \theta \cos \theta, \\ A_{zy} &= (-A_{xx} + A_{yy}) \sin \theta \sin \varphi \cos \varphi, \\ A_{zz} &= A_{xx} \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + A_{yy} \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + A_{zz} \cos^2 \theta, \end{aligned} \quad (9)$$

где углы θ и φ определяют ориентацию магнитного поля в молекулярной системе координат, а A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} – главные значения A -тензора. В молекулярной системе координат g и A – тензоры имеют диагональный вид. Ось X молекулярной системы отсчета направлена вдоль связи N–O• нитроксильного радикала, ось Z вдоль p -орбитали, содержащей неспаренный электрон, а ось Y ортогональна двум другим осям. Условие электронного парамагнитного резонанса запишется в виде:

$$g(\theta, \varphi) \beta B + a(\theta, \varphi) M = \hbar \omega, \quad (10)$$

где

$$g(\theta, \varphi) = g_{xx} \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + g_{yy} \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + g_{zz} \cos^2 \theta, \quad (11)$$

$$a(\theta, \varphi) = \sqrt{A_{xx}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + A_{yy}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + A_{zz}^2 \cos^2 \theta}, \quad (12)$$

M – проекция ядерного спина на свою ось квантования, ω – частота переменного магнитного поля, g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} – главные значения g -тензора.

Положение резонансных линий по полю будет определяться выражением:

$$B_m(\theta, \varphi) = \frac{g_e}{g_{zz}(\theta, \varphi) \gamma} - m \frac{a(\theta, \varphi)}{\gamma}, \quad (13)$$

где ω – рабочая частота спектрометра, m – проекция ядерного спина на вектор a (θ, φ) = (A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}) для ядра азота. После усреднения по всем возможным ориентациям нитроксильного радикала в твердом теле, форма линии спектра определяется следующим выражением:

$$F(B) = \frac{1}{4\pi \sum_m \iint \sin \theta d\theta d\varphi f(B - B_m(\theta, \varphi))}, \quad (14)$$

где $f(B)$ определяет форму линии из-за неразрешенного СТВ с протонами окружения. В стационарном ЭПР сканируется магнитное поле B при постоянной частоте СВЧ-излучения. В ЭПР-спектрометрах обычно измеряется первая производная формы линии поглощения по полю по техническим причинам [121, 127]. Пример спектра нитроксильного радикала и первой производной по полю представлен на Рисунке 17.

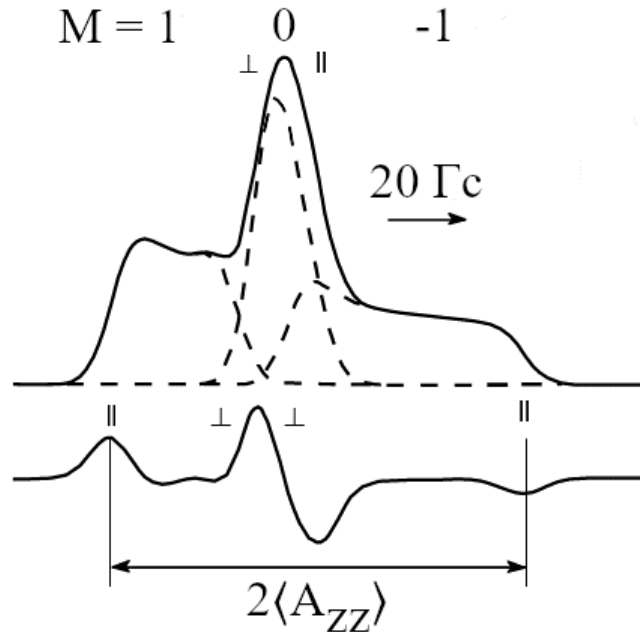


Рисунок 17. Форма спектра ЭПР нитроксильного радикала в твердом теле. Внизу – первая производная формы линии поглощения по полю. Пунктиром показаны отдельные компоненты СТВ. Расщепление между крайними компонентами спектра в виде производной примерно соответствует главному значению $2A_{ZZ}$ тензора СТВ [121]

Вид спектра ЭПР зависит от многих факторов: от ориентации радикала, молекулярной подвижности спиновых меток, полярности среды, окружающей нитроксильный радикал, и т.д. [122] В случае быстрого изотропного вращения, когда молекулы нитроксильных радикалов находятся в разбавленном растворе, а частота вращения $\gg 10^9$ рад \cdot с $^{-1}$, анизотропное (зависящее от ориентации) взаимодействие между неспаренным электроном и ядром азота полностью усредняется. Это приводит к тому, что быстро движущиеся молекулы метки будут неразличимы, а спектр ЭПР будет состоять из триплета – трех равноудаленных друг от друга на расстояние a сравнительно узких линий. В таком случае величина СТВ a определяется только изотропным или не зависящим от ориентации взаимодействием сферически симметричной s-орбитали неспаренного электрона с ядром азота. При медленном вращении метки (частота $< 10^9$ рад \cdot с $^{-1}$) такого усреднения не происходит, и анизотропные взаимодействия, приводящие к уширению линий, изменению амплитуд компонент спектра, а затем к сдвигу крайних компонент, будут проявляться в спектре ЭПР. Подобные изменения спектров ЭПР будут иметь место для нитроксильного радикала в гомогенном растворе, однако спектр ЭПР изменится, если изменится характер вращения спиновой метки. Например, если нитроксильный радикал является частью жирной кислоты, находящейся в мембране, то будет преобладать вращение вокруг одной из осей метки. Таким образом, обычно в биологических системах реализуется режим медленного

движения [121, 122, 124]. Примеры спектров ЭПР для нитроксильного радикала при быстром и медленном движении представлены на Рисунке 18.

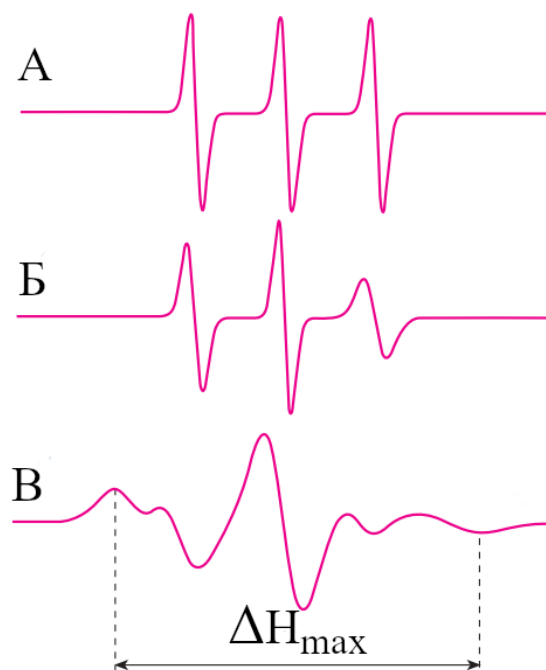


Рисунок 18. Форма ЭПР спектра нитроксильного радикала: А – при быстром вращении, Б – при медленном вращении, В – заторможенный спектр в биологической мембране [124]

Стационарный метод ЭПР часто применяется в исследованиях структуры и динамики биологических систем, однако он имеет существенные ограничения при исследовании слабых магнитных дипольных взаимодействий [129].

1.5.2. Электронное спиновое эхо

Электронное спиновое эхо (ЭСЭ) — один из импульсных вариантов метода ЭПР, основанный на отклике спиновой системы на воздействие двумя или несколькими импульсами. На образец, содержащий магнитные частицы и находящийся в постоянном магнитном поле \mathbf{B}_0 , направленном вдоль оси z , подается серия коротких мощных импульсов переменного электромагнитного поля $\mathbf{B}_1(t)$, лежащего в плоскости, перпендикулярной к \mathbf{B}_0 . \mathbf{B}_1 осциллирует с резонансной частотой ω . Если корректно подобрать амплитуду и длительность импульсов, то в результате их действия на образец на приемнике появится сигнал эмиссии в виде дополнительного импульса [130, 131]. Эксперименты по ЭПР обычно проводятся с резонатором, использующим линейно поляризованные микроволны, которые можно рассматривать как магнитные поля, осциллирующие на микроволновой частоте. Микроволновый резонатор

предназначен для создания микроволнового магнитного поля \mathbf{B}_1 , в большинстве случаев $|\mathbf{B}_1| \ll |\mathbf{B}_0|$ [132].

В наиболее простом варианте метода ЭСЭ на образец, помещенный в резонатор спектрометра, воздействуют 90-градусным импульсом, за которым через время τ следует еще один, 180-градусный импульс. Такую последовательность можно условно записать как $\pi/2 - \tau - \pi - \tau$ – эхо. Если подобрать напряженность постоянного магнитного поля таким образом, чтобы выполнялось условие электронного парамагнитного резонанса, то в момент времени $t = 2\tau$ приемник регистрирует сигнал ЭСЭ [121]. Механизм появления сигнала ЭСЭ можно описать следующим образом. Если поместить неспаренный электрон в постоянное внешнее магнитное поле, то его магнитный момент начинает прецессировать вокруг магнитного поля с Ларморовской частотой:

$$\omega_L = -\gamma B_0. \quad (15)$$

Постоянное магнитное поле направлено оси z , и вектор намагниченности имеет только M_z -компоненту. При включении переменного магнитного поля и перехода во вращающуюся систему координат, появляется эффективное магнитное поле, которое имеет следующие компоненты: $\mathbf{B}_{eff} = (B_1, 0, B_0 - \frac{\omega}{\gamma})$. Переменное магнитное поле приложенных импульсов направлено вдоль оси \tilde{X} , вращающейся вокруг \mathbf{B}_0 , системы координат. \mathbf{B}_{eff} с частотой ω прецессирует вокруг направления постоянного поля \mathbf{B}_0 . Под действием переменного магнитного поля появляется намагниченность в плоскости, перпендикулярной направлению постоянного магнитного поля. Вектор намагниченности совершает ларморовскую прецессию вокруг \mathbf{B}_{eff} с частотой:

$$\Omega = \sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \omega_1^2}, \quad (16)$$

где $\omega_0 = \gamma B_0$, $\omega_1 = \gamma B_1$. При резонансе, когда $\omega = \omega_0$, вектор намагниченности поворачивается на угол:

$$\theta = \omega_1 t_p, \quad (17)$$

где t_p – время длительности СВЧ-импульса. Первый 90-градусный импульс поворачивает намагниченность в плоскость $\tilde{x} \tilde{y}$ вращающейся системы координат, и она становится параллельной оси \tilde{y} . После действия 90-градусного импульса создается сигнал свободной индукции (ССИ), который можно наблюдать радиотехническими устройствами. ССИ быстро затухает из-за дефазировки спинов в условиях обусловленного естественными причинами неоднородного уширения линий. Из-за наличия разброса частот ω_0 единый пучок намагниченностей начинает расплываться в плоскости $\tilde{x} \tilde{y}$. Изохроматы — это подансамбли спинов, на которые разделена вся спиновая система. Изохроматы имеют приблизительно одинаковую резонансную частоту ω_0 . Для каждого изохромата разница $\Delta\omega = \omega_0 - \omega$ своя [127]. За время τ вектор намагниченности спинов каждого подансамбля приобретет фазу $\phi = \Delta\omega\tau$. Через

некоторое время векторы намагниченностей более или менее равномерно расплывутся по всей плоскости $\tilde{x} \tilde{y}$, и сигнал свободной индукции перестанет наблюдаться. ССИ не наблюдается в твердом теле в ЭПР из-за дефазировки спинов по причине «звона» резонатора после воздействия импульса («мертвое время» прибора) [133]. Эта дефазировка может быть обратима под действием второго импульса. Если спустя время τ после окончания действия 90° импульса подать 180° импульс вдоль оси \tilde{x} , то «веер» векторов спиновых изохромат повернется вокруг оси \tilde{x} на 180 градусов. Направление векторов спиновых изохромат и направление их вращения поменяется на обратное, при этом вектор намагниченности в плоскости $\tilde{x} \tilde{y}$ приобретет дополнительную фазу $180^\circ - \varphi$. В то же время векторы намагниченности продолжают свое движение с угловой скоростью $\Delta\omega$ и за время τ наберут фазу φ . Следовательно, в момент времени 2τ вектор намагниченности каждого подансамбля будет иметь фазу $\varphi + (180^\circ - \varphi) + \varphi$. По этой причине через интервал времени τ после окончания действия 180 -градусного импульса отдельные спиновые изохроматы вновь соберутся вместе, но уже вдоль оси $-\tilde{y}$. Этот сигнал и называется сигналом эха. Сигнал эха спадает с увеличением τ за счет поперечной релаксации спинов, часто спад происходит экспоненциально с характерным временем, называемым T_2 (время поперечной релаксации). Далее получившийся вектор M , направленный по оси $-y$, под действием неоднородного поля V_0 опять начнет рассыпаться в «веер» спиновых изохромат [127, 130]. Схематически формирование сигнала спинового эха показано на Рисунке 19.

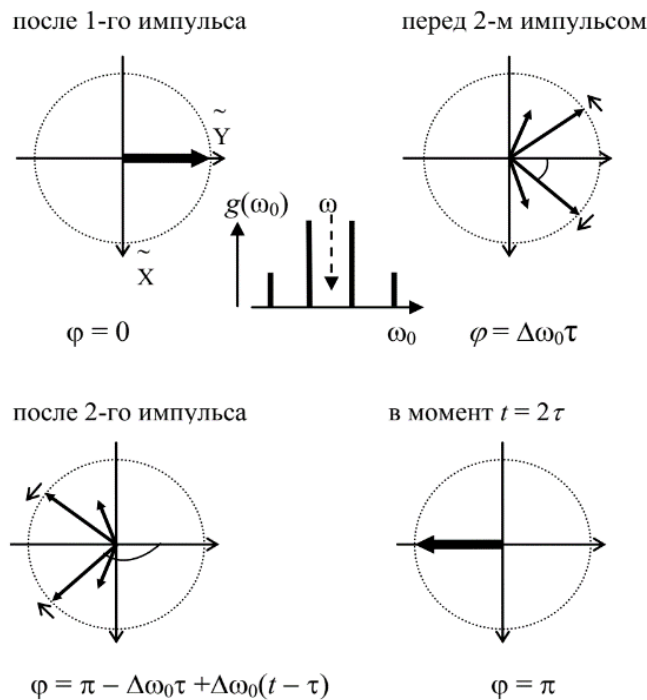


Рисунок 19. Формирование сигнала спинового эха. Схематически показано движение четырех изохромат для условного спектра в центре рисунка [127]

В трехимпульсном методе формирования эха на спиновую систему подаются три 90° импульса с интервалами τ между первым и вторым и T между вторым и третьим. Схематически данная последовательность выглядит следующим образом: $\pi/2 - \tau - \pi/2 - T - \pi/2 - \tau - \text{эхо}$. В разные моменты времени возникает четыре разных сигнала эха. Три из них возникают по тому же механизму, что и двухимпульсное эхо (его еще называют первичным эхо). Четвертый сигнал возникает в момент времени τ после третьего импульса (и в момент $2\tau + T$ после первого). Этот сигнал называется стимулированным эхо. Стимулированное эхо можно рассматривать как сигнал двухимпульсного эха с «разорванным» пополам вторым 180° импульсом; две 90° «половинки» отстоят друг от друга на интервал T . После действия первого импульса появляется поперечная прецессирующая намагниченность, после второго – проекция намагниченности вдоль направления магнитного поля (продольная намагниченность). Продольная намагниченность сохраняется в отсутствие релаксации в течение времени T , и только она принимает участие в формировании стимулированного эха. Третий 90° -градусный импульс делает эту продольную намагниченность наблюдаемой, формируя из нее сигнал эха через время τ после своего воздействия. Из-за процессов продольной релаксации спинов сигнал эха с увеличением T уменьшается с характерным временем, называемым T_1 . В эксперименте по стимулированному эхо сканируется интервал T при фиксированном τ [121, 133].

1.5.3. Модуляция огибающей спада сигнала ЭСЭ (ESEEM)

При взаимодействии спина неспаренного электрона со спинами близлежащих ядер в твердом теле могут возникать разрешенные и запрещенные спиновые переходы, которые имеют общие уровни. Как уже отмечалось выше, разрешенные переходы – это переходы без переворота ядерного спина ($\Delta I_z = 0$), запрещенные – переходы, в которых ориентация ядерного спина изменяется. При воздействии СВЧ-импульсов на резонансной частоте ЭПР происходит одновременная переориентация электронного и ядерного спинов, то есть возбуждаются оба типа переходов. Из-за интерференции резонансных частот этих переходов амплитуда сигнала ЭСЭ при увеличении временной раздвижки между СВЧ-импульсами осциллирует с частотами магнитных взаимодействий электрона и ядер. Эти осцилляции (биения) называются электронно-ядерной модуляцией или эффектом ESEEM [133, 134]. Они вызваны анизотропным диполь-дипольным взаимодействием спинов электронов со спинами ядер окружения. Интенсивность сигнала ESEEM определяется количеством ядер, находящихся в непосредственной близости от спиновой метки – на расстояниях менее 1 нм. Также она зависит от магнитного момента ядра и величины магнитного поля спектрометра. В биологических мембранах ядрами окружения являются протоны, в модельных мембранных системах протоны можно заменить на ядра

дейтерия. Такая замена позволяет существенно увеличить амплитуду осцилляций для обычно используемых магнитных полей спектрометров ЭПР X-диапазона (частота СВЧ порядка 9 ГГц, резонансное поле около 0,34 Т). Еще одним преимуществом использования дейтерия является то, что таким образом можно отделить вклад от других молекул (например, воды) или участков молекул (например, алкильного остатка холестерина). Применяя Фурье преобразование, можно идентифицировать ближайшие ядра и их пространственное расположение относительно неспаренного электрона спиновых меток. В частотном спектре Фурье-преобразования содержатся пики, положение которых определяется электрон-ядерными взаимодействиями. Например, ядра дейтерия в соседних с меткой молекулах (не связанных с ней химической или водородной связью) в магнитном поле спектрометра X-диапазона ЭПР дают хорошо разрешенный дублет на частоте 2,2 МГц, для протонов частота ларморовской прецессии равна 14,5 МГц. Дублетное расщепление дейтерия обусловлено квадрупольным взаимодействием ядер в молекуле [121, 133, 135]. Недостатком метода ESEEM является то, что сигналы ЭСЭ из-за быстрой спиновой релаксации удается наблюдать только при пониженных температурах. Однако в тех случаях, когда можно считать, что взаимное расположение молекул при замораживании не меняется, полученная информация может быть полезной и для определения структуры при физиологических температурах [136]. ^2H ESEEM D_2O -гидратированных мембран позволяет определить расположение спиновой метки относительно поверхности мембраны [137]. Пример сигнала ESEEM и его Фурье-преобразования представлен на Рисунке 20.

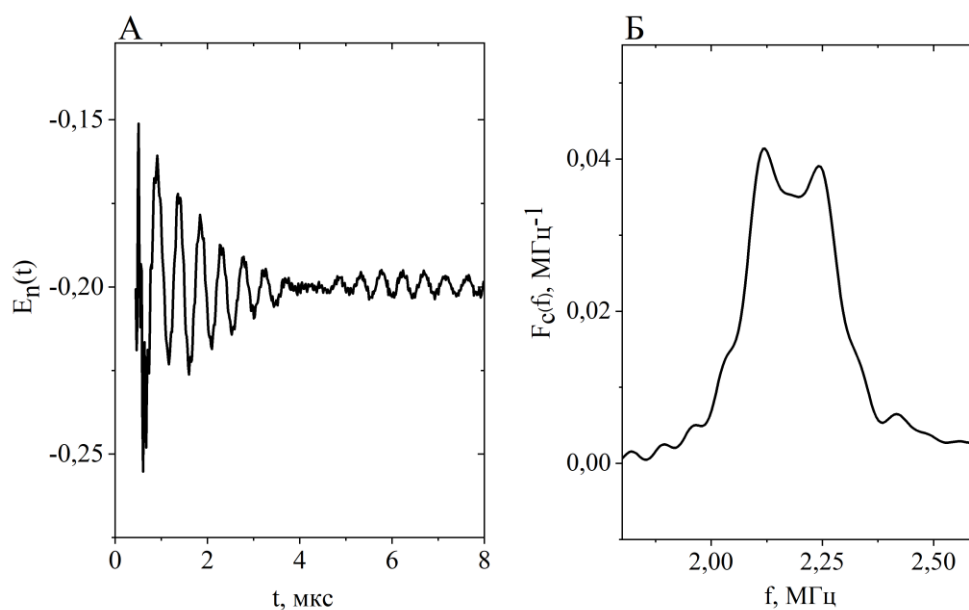


Рисунок 20. А – осцилляции сигнала ESEEM, Б – результат Фурье-преобразования для спиновой метки в матрице, содержащей D_2O

Стандартные одномерные эксперименты ESEEM состоят из двух- и трехимпульсной последовательности. Они основаны на двух видах эха: двухимпульсное (или первичное), трехимпульсное (или стимулированное) [138]. Спад сигнала за счет релаксационных процессов в стимулированном эхо значительно медленнее, чем в первичном, так как в твердом теле время T_1 может значительно превышать время T_2 . Это позволяет использовать значительно большие временные задержки в трехимпульсном эксперименте и улучшить точность Фурье-спектров в частотной области. Также в модуляции стимулированного эха отсутствуют комбинационные частоты (суммы и разности различных резонансных частот), что упрощает интерпретацию и сужает линии в частотной области при наличии взаимодействия со многими ядрами [127].

В трехимпульсном эксперименте применяются два импульса, разделенных временем τ , с последующим третьим импульсом после времени T , стимулированное эхо наблюдается в момент времени τ после третьего импульса. Графически эта импульсная последовательность представлена на Рисунке 21.

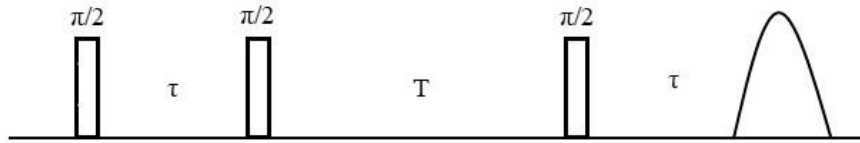


Рисунок 21. Трехимпульсная последовательность стимулированного эха

Амплитуда эха для трехимпульсной последовательности выглядит следующим образом:

$$E_{mod}(\tau, T) = 1 - \frac{k}{4} \{ [(1 - \cos(\omega_\alpha \tau)) [1 - \cos(\omega_\beta T)] + [1 - \cos(\omega_\beta \tau)] [1 - \cos(\omega_\alpha T)] \}, \quad (18)$$

где $\omega_{\alpha(\beta)} = 2\pi\sqrt{\{[m_s A_1 - \nu_1 l_1]^2 + [m_s A_2 - \nu_1 l_2]^2 + [m_s A_3 - \nu_1 l_3]^2\}}$. m_s – это проекция спина, которая может равняться либо $1/2$, либо $-1/2$. Направляющие косинусы $(l_1, l_2, l_3) = (\sin\theta \cos\phi, \sin\theta \sin\phi, \cos\theta)$ определяют ориентацию лабораторного магнитного поля \mathbf{B} в системе главных осей g -тензора, $\mathbf{B} = B(l_1, l_2, l_3)$. Матрица тензора СТВ \mathbf{A} в системе главных осей имеет вид $\mathbf{A} = (A_1, A_2, A_3)$. Ее конкретная форма зависит от системы координат. Для систем, где анизотропия g -фактора превышает анизотропию сверхтонких взаимодействий, удобной системой координат является система главных осей g -тензора. В приближении точечного диполя дипольная компонента – это $|T| = \frac{g_n \beta_n \beta}{hr^3}$, где $r = |\mathbf{r}|$ – эффективное расстояние между электроном и ядром, а сверхтонкий тензор может быть выражен в виде: $A_i = \frac{T}{g_{eff}} \times$

$\{g_i l_i (g_i (3n_i^2 - 1) + \frac{A_{iso}}{T}) + 3g_j^2 l_j n_i n_j + 3g_k^2 l_k n_i n_k\}$, где $i, j, k = 1, 2, 3$ ($i \neq j \neq k$) и $n_{i, j, k}$ – направляющие косинусы электрон-ядерного вектора r . Значение $g_{eff} = \sqrt{(g_1 l_1)^2 + (g_2 l_2)^2 + (g_3 l_3)^2}$. k – глубина модуляции, определяется анизотропным СТВ с ближайшим ядром, значение глубины модуляции зависит от расстояния между неспаренным электроном и ядром $k \sim \frac{1}{r^6}$ [138, 139].

Для того, чтобы получить нормализованный сигнал, который не зависит от спиновой релаксации и коэффициента усиления прибора, проводят следующее преобразование:

$$V_n(T) = \frac{V(T)}{\langle V(T) \rangle} - 1, \quad (19)$$

где $V(T)$ – экспериментально измеренный сигнал ESEEM, $\langle V(T) \rangle$ – функция, зависящая от релаксационных процессов, но не зависящая от модуляционных эффектов. Для того чтобы нормализованный сигнал стремился к нулю при $T \rightarrow \infty$, в преобразовании отнимают единицу [133].

Одной из важнейших характеристик взаимодействия лекарственного средства с мембраной является локализация лекарственного средства в мембране – адсорбируется ли оно на полярной поверхности или находится глубоко внутри гидрофобной части мембраны. Спектроскопия ESEEM позволяет получать информацию о расположении спин-меченых гостевых молекул в биологических мембранах.

1.5.4. Спектроскопия двойного электрон-электронного резонанса (ДЭЭР)

Метод импульсного двойного электрон-электронного резонанса (Double Electron-Electron Resonance – DEER или PELDOR, ниже используется сокращение ДЭЭР) был разработан Миловым А. Д. в 1981 году [140, 141]. Метод ДЭЭР применяется для изучения магнитных диполь-дипольных взаимодействий спинов в нанометровом диапазоне расстояний между ними (от 1,5 до 8 нм) и используется для спин-меченых молекул, бирадикалов, радикальных пар и кластеров из небольшого числа парамагнитных частиц. Поскольку дипольные взаимодействия усредняются молекулярным движением, применение метода ДЭЭР возможно только для твердых тел (замороженных биосистем) [127, 129].

Первоначально метод ДЭЭР был разработан как трехимпульсная техника, в которой первичный сигнал ЭСЭ формируется двумя импульсами, со сканирующим третьим импульсом накачки [140, 141]. Позже, в ряде работ был отмечен эффект мертвого времени при использовании данной схемы измерения [142-144]. Он заключался в искажении сигнала при прохождении импульса накачки через второй эхо-формирующий импульс. Чтобы устранить этот эффект, трехимпульсная схема измерений была усовершенствована: с помощью добавления

дополнительного эхо-формирующего импульса, генерировался рефокусированный сигнал ЭСЭ. В этой четырехимпульсной схеме измерения перекрытия импульсов не происходит [145, 146]. Стоит отметить, что эффект мертвого времени не наблюдался в исследованиях Милова А. Д., что может быть объяснено особенностью экспериментальной установки, которая включала бимодальный резонатор [140, 141, 147, 148].

На сегодняшний день большинство исследований было выполнено с использованием четырехимпульсной техники [149, 150]. Однако указанный эффект (мертвого времени) имеет не физическую природу (связанную, например, со «звоном» резонатора, как в случае наблюдения двухимпульсного эха), а чисто техническую – он возникает из-за электрической «наводки» одних блоков прибора на другие, поэтому данный эффект можно устранить с помощью технических способов. В работе [151] Милов А. Д. и его коллеги предложили метод выполнения трехимпульсных измерений без мертвого времени, который может быть реализован и на коммерческом импульсном ЭПР-спектрометре с обычным резонатором. Коррекцию можно выполнить, сравнив исходный временной спад ДЭЭР с экспериментом по «холостому» возбуждению. Эксперимент по «холостому» возбуждению выполняется вне спектра ЭПР. Неискаженный сигнал ДЭЭР получается путем деления исходного экспериментального спада на спад времени для «холостого» эксперимента. Трехимпульсный эксперимент обладает некоторыми преимуществами по сравнению с четырехимпульсным: более сильный сигнал и, следовательно, более высокая чувствительность, более высокая эффективность возбуждения накачки, меньшая вероятность возникновения артефактов из-за меньшего количества дипольных путей, поэтому в данной работе мы используем трехимпульсную схему измерения [151, 152].

Схема проведения трехимпульсного эксперимента следующая. В спиновой системе выделяется пара спинов А и В, которые имеют разную резонансную частоту. На одной резонансной частоте (частоте наблюдения ν_A) на спины А действует стандартная двухимпульсная последовательность $\pi/2 - \tau - \pi - \tau$ – эхо. На другой резонансной частоте (ν_B) на спины В действует π – импульс накачки, который подается в момент времени $t = T$ между первым и вторым импульсами на частоте регистрации ν_A . В результате действия такой последовательности спины В изменяют свою z-проекцию, следовательно, изменяется и локальное магнитное поле на спинах А. Величина изменения магнитного поля определяется диполь-дипольным взаимодействием спинов А и В. Изменение локального магнитного поля на спинах А влечет за собой дополнительную расфазировку при прецессии вектора намагниченности после действия первого $\pi/2$ – импульса. В результате этого изменяется амплитуда сигнала ЭСЭ $V(\tau)$. Эффект зависит от времени задержки t импульса накачки [129]. Импульсная последовательность данного подхода показана на Рисунке 22.

Магнитное диполь-дипольное взаимодействие спинов А и В определяется дипольной частотой:

$$\omega_{dd} = \frac{D}{r^3} (1 - 3\cos^2\theta), \quad (20)$$

где D – константа диполь-дипольного взаимодействия, r – расстояние между спинами, θ – угол между направлением внешнего магнитного поля и вектором, соединяющим спины.

Выражение для сигнала ЭСЭ выглядит следующим образом:

$$e_a(t) = 1 - p_B + p_B \cos \frac{g^2 \beta^2}{\hbar r_{AB}^3} (1 - 3\cos^2\theta)t, \quad (21)$$

где $p_B < 1$ – безразмерный параметр, вероятность переворота спинов под действием π -импульса, t – временная задержка импульса накачки. Для учета всех спинов в выборке, уравнение (21) перемножается для всех пар спинов:

$$V(t) = \prod_{j>i} \left[1 - p_B + p_B \cos \frac{g^2 \beta^2}{\hbar r_{ij}^3} (1 - 3\cos^2\theta_{ij})t \right]. \quad (22)$$

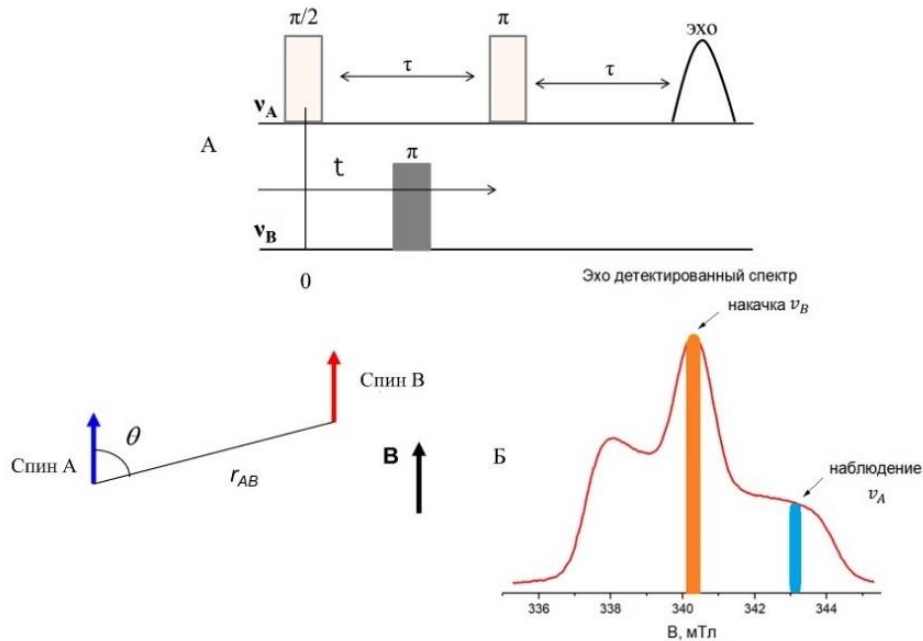


Рисунок 22. А – трехимпульсная последовательность метода ДЭЭР, Б – положение импульсов регистрации и накачки, действующих на спины А и В в спектре ЭПР

Для выполнения дальнейших расчетов необходимо все i спинов без ограничения общности поместить в начало координат. Если спины распределены в образце случайным равномерным образом, то вероятность расположения данного спина в позиции r пропорциональна небольшому элементарному элементу пространства dr . Таким образом, выражение (22) можно преобразовать в:

$$V(T) = \exp \left(-\rho_{loc} p_B \int dr \left[1 - \cos \frac{g^2 \mu_B^2}{\hbar r^3} (1 - 3\cos^2\theta)t \right] \right), \quad (23)$$

где ρ_{loc} – локальная концентрация спинов. В случае хаотичного трехмерного (3D) пространственного распределения вероятность расположения данного спина в позиции \mathbf{r} в небольшом элементарном элементе пространства $d\mathbf{r}$ равна отношению $d\mathbf{r}/V$, где V – макроскопический объем. Тогда уравнение (23) можно записать как:

$$V_{3D}(t) = \left[1 - p_B + \frac{dr}{V} p_B \cos \frac{g^2 \beta e^2}{\hbar r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta) t \right]^N, \quad (24)$$

где N — общее количество спинов, $N = CV$, где C — концентрация спинов в см^{-3} . N и V можно считать стремящимися к бесконечности, поскольку эти величины макроскопически велики. При этом их соотношение будет постоянным: $N/V = C$. Из этого следует:

$$V_{3D}(t) \xrightarrow{N, V \rightarrow \infty} \exp \left(-C p_B \int dr \left[1 - \cos \frac{g^2 \beta^2}{\hbar r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta) t \right] \right), \quad (25)$$

В результате интегрирования получается следующее выражение:

$$V_{3D}(t) = \exp \left(-\frac{8\pi^2}{9\sqrt{3}} C p_B t \right). \quad (26)$$

Предполагается, что в липидных бислоях пространственное распределение спиновых меток будет ближе к двумерному пространственному распределению (2D). Для двумерного случая объем V заменяется на промежуточный параметр площади поверхности S , затем выполняются те же расчеты, что и в трехмерном случае [153]:

$$V_{2D}(t) = \exp \left(-3,21 \sigma p_b \left(\frac{g^2 \beta^2 t}{\hbar} \right)^{2/3} \right). \quad (27)$$

В случае неоднородного спинового распределения этот результат также можно применить, однако концентрации C в уравнении (26) и σ в уравнении (27) должны быть заменены на локальные концентрации C_{local} и σ_{local} соответственно [147, 154-157].

Еще один тип пространственного распределения – это равномерное случайное распределение с областью недоступности, появляющейся вокруг каждой спиновой метки. Для двумерного пространства уравнение 23 в этом случае записывается как:

$$V(T) = \exp \left(-\sigma'_{loc} p_B 2\pi \int \sin \theta d\theta \int_R^\infty \left[1 - \cos \frac{g^2 \mu_B^2}{\hbar r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta) t \right] r dr \right), \quad (28)$$

где R – радиус недоступности. Для $R^3 \gg g^2 \mu_B^2 T / \hbar$, уравнение 28 трансформируется в:

$$V(T) = \exp \left(-\frac{\sigma'_{loc}}{R^4} p_B \frac{\pi g^2 \mu_B^4}{5 \hbar^2} t^2 \right). \quad (29)$$

1.6. Биофизические приложения метода ДЭЭР

Благодаря разработке способов направленного введения спиновых меток, появилось множество применений импульсной ЭПР-спектроскопии в биохимии и биофизике. Для того, чтобы иметь возможность применять метод ДЭЭР, биомакромолекула должна иметь по крайней мере один неспаренный электрон или, другими словами, она должна иметь один или несколько

парамагнитных центров. Это могут быть, например, ионы металлов (например, Cu^{2+} или Mn^{2+}), кластеры металлов (например, FeS), органические кофакторы (например, семихиноны или радикалы флавина) или радикалы аминокислот (например, радикалы тирозила), образующиеся во время каталитических циклов. В случаях, когда биомолекула диамагнитна и не имеет такого центра, могут быть введены парамагнитные метки, несущие неспаренные электроны [158]. В основном, в качестве спиновых меток выступают нитроксильные радикалы. Для таких молекул можно определять дипольную частоту, а значит и расстояния между спинами, делать выводы об их конформации и, в случае агрегации (кластеризации), судить о размерах агрегатов (кластеров). Как правило, для исследований методом ДЭЭР используются молекулы с двумя спиновыми метками. Однако недавно было показано, что ДЭЭР может применяться к (моно) спин-меченым биомолекулам для определения их наноразмерного пространственного распределения и кластеризации.

Обычно эксперимент ДЭЭР проводится при температуре 50-80 К. Вопрос о том, сильно ли изменяется конформация биомолекулы при заморозке, все еще остается предметом дискуссий и может зависеть от исследуемой среды. Таким образом, целесообразно проверять согласованность между данными ЭПР, полученными при криогенных температурах, и данными, полученными другими методами при температуре окружающей среды, когда это возможно [150, 157, 159].

Изучение структурно-функциональных связей белков и их комплексов в физиологических условиях является важной задачей для понимания биомолекулярных механизмов, лежащих в основе многих болезней. Метод ДЭЭР широко применяется для исследования конформации белков, ДНК и РНК в конкретных биохимических системах. За последние 10 лет ДЭЭР стал мощным биофизическим методом, который был применен к большому разнообразию нуклеиновых кислот, а также белков и белковых комплексов в растворе или внутри мембран. В качестве спиновых меток использовались небольшие нитроксильные радикалы, парамагнитные ионы металлов, радикалы аминокислот или внутренние кластеры и радикалы кофакторов. ДЭЭР обладает уникальной способностью решать и отвечать на вопросы структуры и динамики, которые не могут быть решены другими методами [160]. Методы на основе флуоресценции, такие как FRET (ферстеровский резонансный перенос энергии), очень эффективны в этом отношении, поскольку их можно применять на уровне отдельных молекул и обеспечивать динамику в реальном времени в нескольких временных масштабах. Однако FRET не хватает точности, когда дело доходит до количественной оценки расстояний или изменений расстояний. Как и FRET, метод ДЭЭР не имеет ограничений по молекулярной массе, но обычно требует микромолярных концентраций [161].

Сегодня с помощью метода ДЭЭР изучен широкий спектр биомолекул. Например, в работе [162] метод ДЭЭР был применен к набору киназы рецептора хемотаксиса *Thermotoga maritima*, чтобы определить строение комплекса белков CheA–CheW. Предсказанная структура, построенная на основе из 40 расстояний, хорошо совпадает с кристаллической структурой этого комплекса, опубликованной в той же статье. На основе структуры и биохимических данных были сделаны предположения относительно функционального механизма этого комплекса. В исследовании [163] использовался комбинированный подход моделирования и метода ДЭЭР для определения структурного расположения физиологически значимого гомодимера Na^+/H^+ антипортера NhaA *Escherichia coli*. К. Кей и др. [164] использовали флавиновый кофактор, связанный с каждой из двух субъединиц гомодимера человеческого активатора регенерации печени. Они восстановили оба флавина до нейтральной радикальной формы и получили хорошо разрешенные временные сигналы ДЭЭР. Полученные расстояния хорошо коррелируют с данными рентгеновского структурного анализа. В области нуклеиновых кислот ДЭЭР использовался для отслеживания преобразования двух комплементарных шпилечных РНК в дуплексную РНК [165].

Как уже упоминалось выше, недостатками низкотемпературных измерений в биомолекулах являются общая неопределенность в совпадении структур природного и замороженного состояний и часто встречающаяся необходимость использования криопротекторов, которые могут влиять на распределение расстояний и конформационные равновесия. Для преодоления этих недостатков и достижения условий, близких к физиологическим, в течение последних нескольких лет ведется интенсивный поиск новых спиновых меток с оптимизированными релаксационными свойствами. Триарилметильные радикалы (ТАМ) представляют собой относительно новый класс спиновых меток, обладающих длинным, порядка микросекунд, временем релаксации в жидкостях при комнатной температуре. Длинная релаксация делает ТАМ перспективной альтернативой нитроксильным радикалам. В частности, радикалы ТАМ успешно применялись для измерения расстояний при криогенной температуре [166]. В работе [167] было показано, что метод ДЭЭР может применяться не только для нитроксильных спиновых меток, но и для триарилметильных радикалов, при этом можно проводить эксперимент при комнатной температуре. В данном исследовании было продемонстрировано измерение расстояний при температуре, близкой к физиологической, в модельном дуплексе ДНК. Кроме того, полученные данные сравнивались с результатами экспериментов при 80 К. Распределения расстояний, соответствующие этим данным, хорошо согласуются с распределением, полученным при измерении при физиологической температуре.

В работе [168] была показана возможность использования ортогонального спинового мечения для выполнения экспериментов ДЭЭР. Молекула ДНК находится под постоянным

воздействием эндогенных и экзогенных повреждающих факторов. Апуриновые/апиримидиновые сайты (AP-сайты) являются одними из наиболее распространенных повреждений ДНК. Метод ДЭЭР был применен для исследования конформационных изменений в ДНК, содержащей AP-сайт, и в комплексе этой ДНК с AP-эндонуклеазой 1 (APE1). Для этого спиновые метки на основе триарилметила прикрепляли к 5 концам олигонуклеотидного дуплекса, а нитроксильные спиновые метки вводили в APE1. Таким образом, была создана система, позволяющая отслеживать конформационные изменения основного субстрата APE1. Использование разных (ортогональных) спиновых меток в ферменте и в субстрате ДНК имеет важное преимущество, позволяя детально исследовать локальные повреждения и конформационные изменения как в самой AP-ДНК, так и в ее комплексе с APE1.

1.7. Метод усиления парамагнитной релаксации в ЯМР

Усиление парамагнитной релаксации в ЯМР (Paramagnetic Relaxation Enhancement – PRE) – это метод, в основе которого лежит увеличение скорости релаксации T_1 и T_2 в присутствии растворенных парамагнитных веществ. Эффект PRE вызывают магнитные диполь-дипольные взаимодействия между спином неспаренного электрона и ядром. В качестве ядер могут выступать, например, ядра протонов ^1H . Неспаренный электронный спин имеет магнитный момент, который примерно в тысячу раз больше ядерных магнитных моментов. Так как PRE зависит от квадратов электронных и ядерных магнитных моментов, присутствие неспаренного электрона вызывает заметное увеличение скорости релаксации [169]. Метод PRE предоставляет информацию о взаимодействии протонов и неспаренного электрона на расстоянии до 15–35 Å [170]. Время релаксации может быть использовано для определения возможности включения молекул в липидный бислой [171, 172].

Скорость продольной релаксации PRE для протонов, связанных с неспаренным электроном магнитными диполь-дипольными взаимодействиями, определяется уравнением Соломона-Блумбергена [173]:

$$\Gamma_1 = \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r^6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I \tau_c)^2}, \quad (30)$$

где γ_I – гиромагнитное отношение протона, μ_0 – магнитная постоянная, μ_B – магнетон Бора, ω_I – ларморовская частота протона, r – расстояние между электроном и протоном. Время корреляции τ_c определяется выражением $\tau_c^{-1} = \tau_{rot}^{-1} + \tau_S^{-1}$, где τ_{rot} – время корреляции вращения пары протон/спиновая метка, а τ_S – эффективное время релаксации электрона. Если расстояние r в паре относительно велико, то вкладом τ_{rot}^{-1} можно пренебречь: в этом случае время корреляции вращения становится большим. Для оценки эффекта вращения проводят

эксперимент сравнения с добавлением немеченых веществ. В таком случае экспериментально измеренное время спин-решеточной релаксации T_1 определяется соотношением:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{10}} + \Gamma_1, \quad (31)$$

где T_{10} – времена релаксации в отсутствие спиновых меток. Метод усиления парамагнитной релаксации в ЯМР очень чувствителен к расстоянию r , поэтому эффект PRE может служить источником информации о расположении неспаренного электрона относительно протонов. При изменении расстояния r в исследуемой системе, скорость парамагнитной релаксации будет отражать вероятность контакта [173-175].

1.8. Заключение

Изучение взаимодействия лекарственных препаратов с биологической мембраной является одной из актуальных тем современных исследований. В частности, особое внимание привлекают нестероидные противовоспалительные препараты и антимикробные пептиды. Считается, что терапевтическое действие, а также некоторые побочные эффекты АМП и НПВП могут быть обусловлены их взаимодействием с мембранами клеток. Однако, молекулярные механизмы этого взаимодействия во многом пока не поняты и требуют всестороннего изучения. Для исследования влияния лекарственных средств на структурную организацию мембраны необходима информация на молекулярном уровне и в нанометровом диапазоне расстояний. Существует ограниченное число методов, которые могут дать такую информацию. Одним из них является ЭПР-спектроскопия спиновых меток, важнейшим вариантом которой является спектроскопия ДЭЭР. Данная работа посвящена исследованию механизмов действия НПВП спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака, а также АМП хальципорина в модельных биологических мембранах. Полученные результаты будут представлены и подробно обсуждены в последующих разделах настоящей диссертационной работы.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модельные биологические мембраны были приготовлены из фосфолипидов DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DOPC (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), POPC (1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DHPC (1,2-дигептаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин) или DMPC (1,2-димеристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин). Все липиды коммерчески доступны, и были приобретены у Avanti Polar Lipids, Бирмингем, Алабама, США. Их структурные формулы приведены на Рисунке 23. Холестерин также был приобретен у Avanti Polar Lipids. Его структурная формула представлена на Рисунке 24 А.

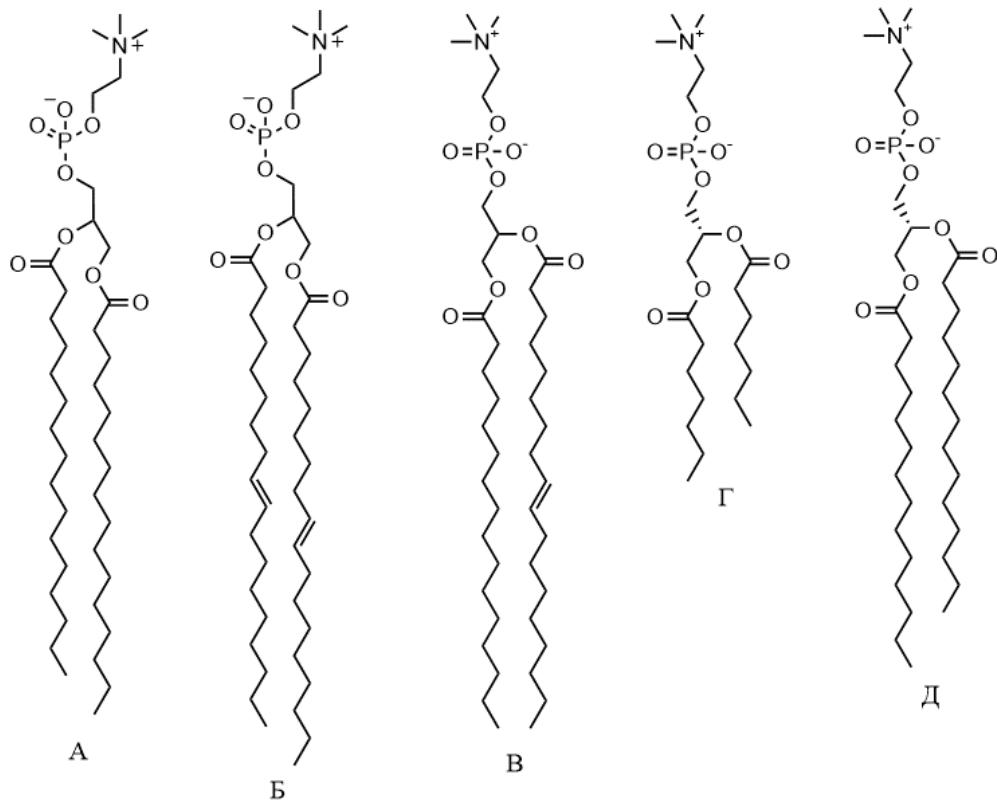


Рисунок 23. А – DPPC, Б – DOPC, В – POPC, Г – DHPC, Д – DMPC

Немеченые ибупрофен и диклофенак использовались в коммерчески доступной форме и были приобретены у Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США. Их структурные формулы приведены на Рисунках 24 Б и 24 В, соответственно. Спин-меченые аналоги ибупрофена и диклофенака были синтезированы Барановым Д. С. Синтезированные молекулы сохранили два важнейших свойства исходного соединения – полярную карбоксильную группу –COOH и гидрофобный хвост [176, 177]. Структурные формулы спин-меченых аналогов ибупрофена и диклофенака представлены на Рисунке 25.

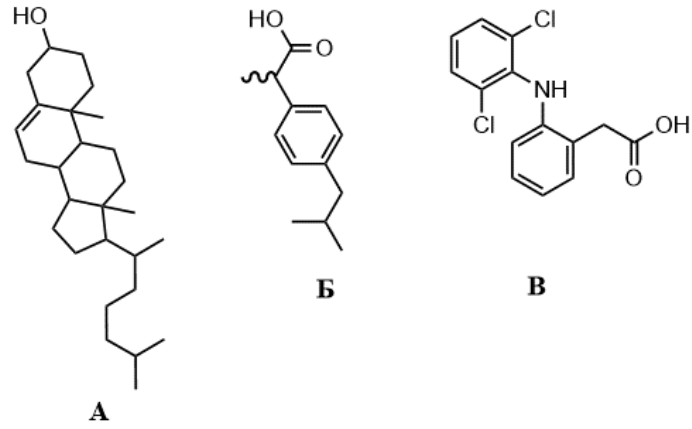


Рисунок 24. А – холестерин, Б – ибупрофен, В – диклофенак

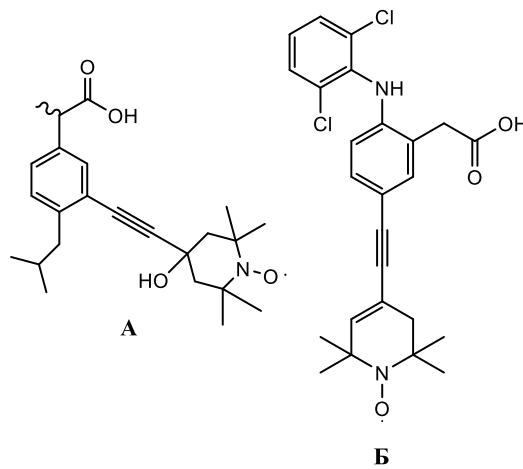


Рисунок 25. А – спин-меченый ибупрофен, Б – спин-меченый диклофенак

Стеариновые кислоты, меченые нитроксильной меткой DOXYL в пятом (5-DSA) и шестнадцатом (16-DSA) положениях, использовались в коммерчески доступной форме. Данные вещества были приобретены у Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США. Их структурные формулы приведены на Рисунке 26.

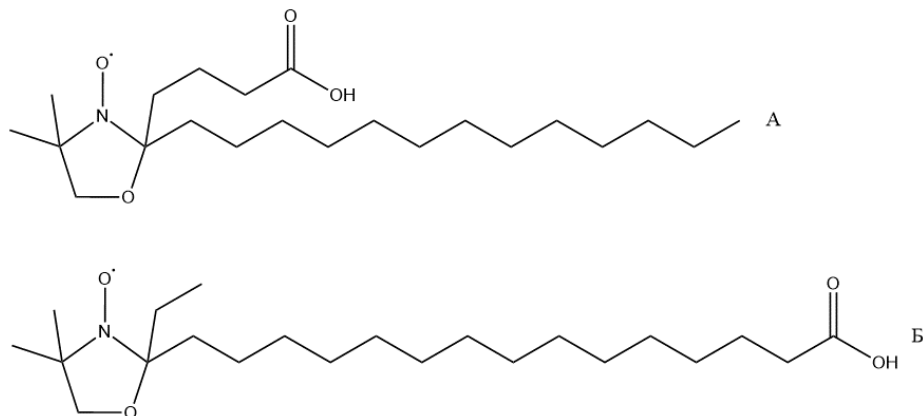


Рисунок 26. А – 5-DSA, Б – 16-DSA

Пептид-антибиотик хальципорин А и его спин-меченый аналог были получены в рамках имеющегося научного сотрудничества от группы профессора Ф. Формаджио из Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova (Падуя, Италия). Пептид-антибиотик хальципорин состоит из следующей аминокислотной последовательности: Ac-Trp-Val-Aib-Val-Ala⁵-Gln-Ala-Aib-Ser-Leu-Ala-Leu-Aib-Gln-Lol. Спиновая метка в хальципорине находится в 13-м положении. Исходная последовательность хальципорина содержит на этом месте аминокислоту Aib с неполярным заместителем. Метка ТОАС (1-оксил-4-амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-карбоновая кислота) является аналогичной ей по размерам и свойствам [49] – Рисунок 27. Графическое представление хальципорина А в α -спиральной конформации представлено на Рисунке 28.

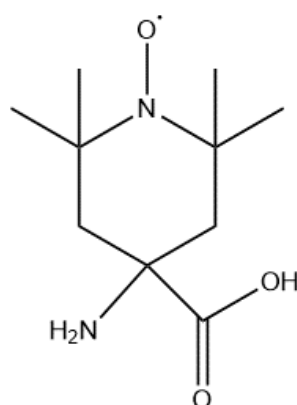


Рисунок 27. Спиновая метка ТОАК

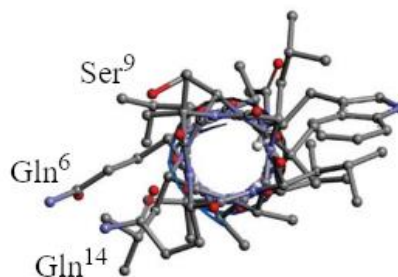


Рисунок 28. Представление хальципорина А в α -спиральной конформации (вид сверху) [49]

Все растворители использовались в коммерчески доступной форме, без дополнительной очистки.

Спектры стационарного ЭПР при охлаждении (200 К) и спектры импульсного ЭПР (80К) получены с использованием спектрометра Bruker Elexsys E-580 X-диапазона. В случае стационарного ЭПР при охлаждении применялся диэлектрический резонатор Bruker ER 4118 X-MD-5, в случае импульсного ЭПР – резонатор с разъемным кольцом Bruker ER 4118 X-MS-3. В обоих случаях резонаторы были помещены в криостат Oxford Instruments CF 935. Температуру внутри криостата регулировали потоком жидкого азота. Температуру контролировали с

помощью терморегулятора Bruker ER4131VT с точностью $\pm 0,5$ К. Спектры СВ ЭПР при комнатной температуре получены на спектрометре SPINSCAN X (Adani, Минск, Беларусь).

Чтобы избавиться от эффектов перемодуляции и насыщения в экспериментах СВ ЭПР были выбраны следующие параметры: амплитуда модуляции – 0,01 мТл, выходная СВЧ-мощность – 200 мВт, величина уменьшения мощности составляла 25 дБ.

В эксперименте ДЭЭР использовалась трехимпульсная схема измерения $(\pi/2)_{\nu_A} - t - \pi_{\nu_B} - (t-\tau) - \pi_{\nu_A} - \tau - \text{эхо}_{\nu_A}$. Длительность первого импульса составляла 16 нс, второго – 32 нс. Импульс накачки, подаваемый на частоте ν_B , имел длительность 36 нс. Амплитуда импульса накачки регулировалась с помощью эксперимента по нутации, чтобы обеспечить угол поворота π . Временная задержка τ варьировалась для каждой исследуемой системы. Задержка импульса накачки t сканировалась с шагом 4 нс. Для анализа временной траектории ДЭЭР начальное время t (т. е. когда t принимается за ноль) определяли с помощью эксперимента ДЭЭР для калибровочного образца [178]. Детектирование осуществлялось на частоте, соответствующей сильнополевому плечу спектра ЭПР. Частота ν_B в приложенном магнитном поле спектрометра В соответствовала возбуждению максимума эхо-детектируемого спектра ЭПР. Таким образом, разница частоты накачки и частоты наблюдения ($\nu_B - \nu_A$) в эксперименте ДЭЭР составляла 85 МГц, в некоторых измерениях она была изменена до 70 МГц – см. Рисунок 29. Магнитное поле В было фиксировано.

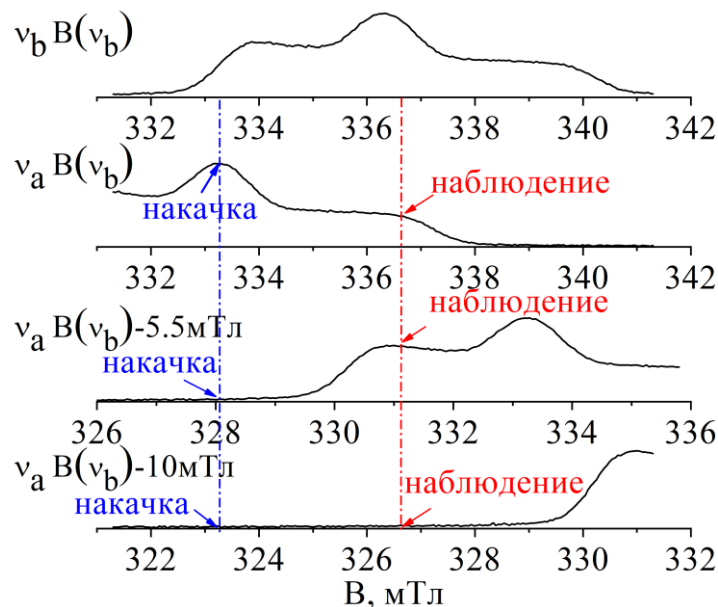


Рисунок 29. Положение частот накачки и наблюдения в эхо-детектируемом спектре при изменении поля

В экспериментах по ориентационной селективности разница $\nu_B - \nu_A$ менялась от 40 до 85 МГц. Искажение сигнала ДЭЭР при прохождении импульса накачки через детектирующие импульсы устранялось с помощью эксперимента по «холостому» возбуждению.

Для получения спектров ESEEM была использована стандартная трехимпульсная последовательность стимулированного спинового эха: $(\pi/2) - \tau - (\pi/2) - t - (\pi/2) - \tau - \text{эхо}$. Возбуждение было на максимуме эхо-детектируемого спектра ЭПР. Длительность импульсов составляла 16 нс, временная задержка $\tau - 204$ нс. Временная задержка t сканировалась от 300 нс до 8,5 или 10 мкс. Шаг по времени составлял 12 или 16 нс.

Измерения ЯМР ^1H в жидком состоянии были выполнены на ЯМР-спектрометре Bruker Avance HD III (Биллерика, США). Частота спектрометра составляла 500 МГц. Эксперименты проводились при комнатной температуре. Времена релаксации T_1 были получены с использованием стандартной последовательности импульсов инверсии-восстановления (180° , τ , 90°). Длительность 90° импульса составляла 10,9 мкс, 180° импульса – 21,8 мкс. Для проверки воспроизводимости все эксперименты повторялись 3-4 раза, для расчета времен релаксации использовался усредненный результат.

В эксперименте NOESY регистрировались одномерные спектры, с помощью градиентных импульсов производилось селективное возбуждение протонов отдельных функциональных групп молекулы. Время смешивания составляло 0,5 с. Все измерения проводились при комнатной температуре (25°C). Оптимальное время смешивания подбирали по кривой нарастания NOE, время смешивание варьировалось от 0,1 до 1 с. Все эксперименты повторяли 3-4 раза, чтобы проверить воспроизводимость.

3. ПЕПТИД-АНТИБИОТИК ХАЛЬЦИПОРИН А: ВЛИЯНИЕ НА МОДЕЛЬНУЮ БИОЛОГИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ ПО ДАННЫМ ДВОЙНОГО ЭЛЕКТРОН-ЭЛЕКТРОННОГО РЕЗОНАНСА

3.1. Описание задачи

Известно, что мембрано-дестабилизирующее действие антимикробных пептидов может наблюдаться при концентрациях гораздо ниже критических. Одним из возможных механизмов разрушения мембраны является перераспределение липидов. Свободные жирные кислоты являются важнейшими компонентами биологических мембран и принадлежат к классу простых липидов. Среди разнообразных биологических активностей СЖК также есть способность убивать бактерии или подавлять их рост, основной целью действия в этом случае является бактериальная мембрана. Для того чтобы выяснить, может ли антимикробное действие пептида быть связано с перераспределением свободных жирных кислот, сначала необходимо определить их местоположение и пространственное распределение в отсутствие пептида. Выяснение фундаментальных принципов функционирования СЖК требует информации на молекулярном уровне. ЭПР спиновых меток может дать такую информацию. В частности, метод ДЭЭР позволяет получить уникальную информацию о нанокластеризации спин-меченых молекул и об их наноразмерном пространственном распределении.

В настоящей работе исследуется влияние антимикробного пептида хальципорина А на наноразмерное пространственное распределение и кластеризацию спин-меченых в 5 или 16 положении стеариновых кислот в модельных фосфолипидных мембранах с помощью метода ДЭЭР.

3.2. Образцы

Были приготовлены образцы нескольких типов. Первый содержал липид POPC либо эквимолярную смесь липидов DOPC/DPPC с добавлением 5- или 16-DSA. Содержание стеариновых кислот изменялось в диапазоне от 0,25 до 6 мол % по отношению к липиду. Вторым типом образцов, помимо липида и спин-меченой стеариновой кислоты, содержал АМП хальципорин. Содержание хальципорина в мембране варьировалось в диапазоне от 0 до 2 мол % по отношению к липиду. Третий тип образцов состоял из липида и спин-меченого хальципорина, концентрация которого составляла 0,2 мол %; 0,5 мол % или 2 мол % по отношению к липиду. Алгоритм приготовления многослойных липосом состоял в следующем: необходимые вещества растворялись в хлороформе и смешивались в нужном соотношении. Растворитель удаляли

потоком азота, после чего образцы помещались под вакуум на 4 часа для удаления остатков хлороформа. Затем к образцам добавляли 0,01 М натрий-фосфатный буфер PBS (0,137 М NaCl, 0,0027 М KCl, pH 7). Соотношение воды к липиду при этом составляло 10 частей воды на одну часть липида по массе. Далее образцы гидратировались в течение двух часов при комнатной температуре с периодическим перемешиванием. После гидратирования образовывались многослойные липосомы, смешанные с водой. Лишнюю воду удаляли после центрифугирования при 14000 g в течение 4 минут. В конечном итоге отношение липида к воде составляло 1:3 по массе. Готовые многослойные липосомы помещались в стеклянную ампулу диаметром 3 мм.

Для экспериментов ESEEM липосомы были приготовлены по описанному выше алгоритму, но натрий-фосфатный буфер был заменен на тяжелую воду (pH = 6).

3.3. Результаты и обсуждение

3.3.1. Кластеризация и наноразмерное пространственное распределение спин-меченых стеариновых кислот в модельных мембранах в отсутствие хальципорина

Спектры стационарного ЭПР для спин-меченых стеариновых кислот, полученные при 200 К, типичны для иммобилизованных нитроксильных радикалов [179]. На Рисунке 30 представлены спектры для бислоя DOPC/DPPC. При содержании спин-меченых стеариновых кислот $\chi \leq 2$ мол % спектры практически не зависят от концентрации. При $\chi > 2$ мол % спектры заметно уширяются, что можно объяснить непосредственным контактом спиновых меток с расстоянием между ними менее 1 нм. Поскольку большое дипольное уширение вызывает быстрое затухание сигнала ЭСЭ, эксперименты ДЭЭР проводились только для образцов с концентрациями $\chi \leq 2$ мол %.

Спектры CW ЭПР для 5-DSA, полученные при 200 К, показаны на Рисунке П1 в разделе Приложение. Эти спектры также уширяются при $\chi > 2$ мол %, что свидетельствует об олигомеризации спиновых меток при больших концентрациях.

Форма спектра стационарного ЭПР при комнатной температуре указывает на прямое связывание спин-меченой стеариновой кислоты с липидным бислоем. Спектры представлены на Рисунке П2 в Приложении.

На Рисунке 31 показаны некоторые временные спады сигнала ДЭЭР для 16-DSA и 5-DSA в бислое DOPC/DPPC, построенные в зависимости от временной задержки t или $t^{2/3}$ в полулогарифмических координатах. Для нормировки сигнал ДЭЭР $V(t)$ был поделен на амплитуду сигнала ЭСЭ в отсутствие импульса накачки $V(0)$ – см. Рисунок П3. Наблюдается

корреляция между полученными экспериментальными данными и линейной зависимостью от $t^{2/3}$, за исключением случая 2 мол % 5-DSA (Рисунок 31 Г), что обсуждается ниже.

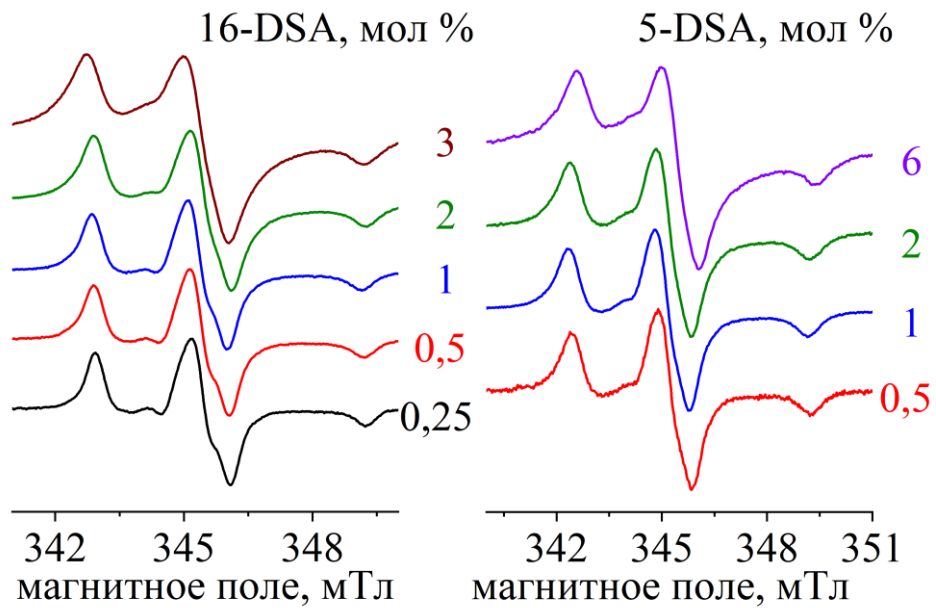


Рисунок 30. Спектры CW ЭПР при 200 К для различных концентраций 16-DSA и 5-DSA в бислое DOPC/DPPC. Спектры нормированы на интенсивность центральной компоненты и сдвинуты по вертикали

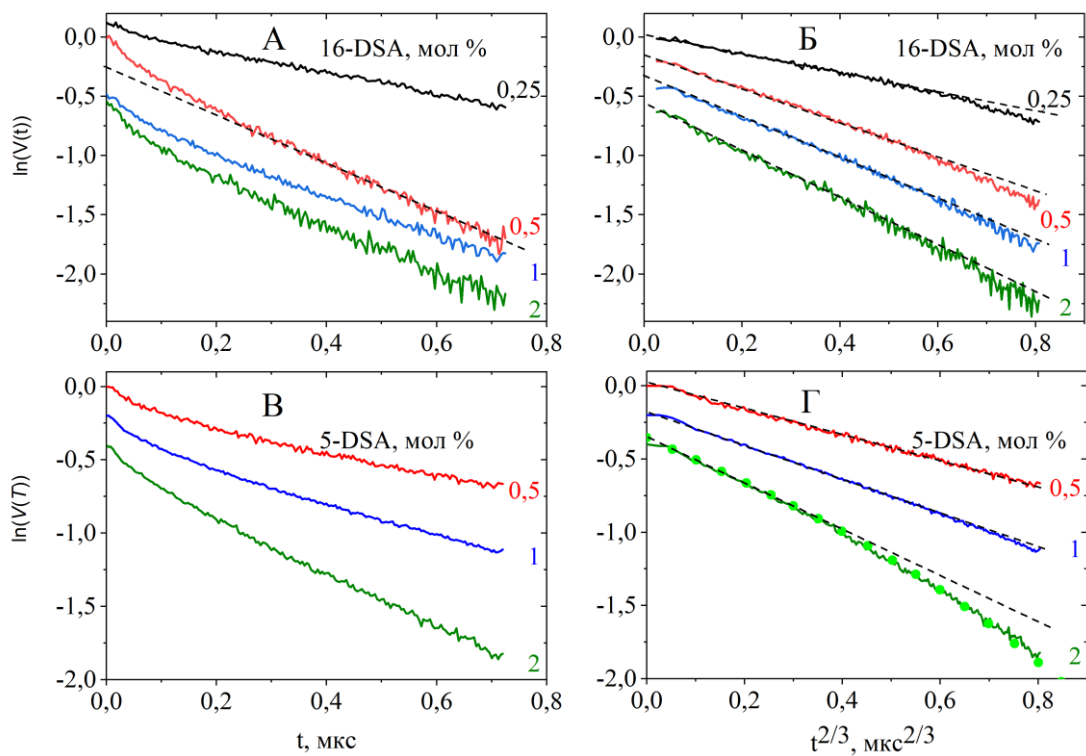


Рисунок 31. Спады сигнала ДЭЭР для 16- (А, Б) и 5-DSA (В, Г) в бислое DOPC/DPPC в полулогарифмических координатах в зависимости от t (А, В) либо $t^{2/3}$ (Б, Г)

Таким образом, экспериментальная временная зависимость $V(t)$ может быть описана теоретической функцией для двумерного пространственного распределения $V_{2D}(t)$, соответствующей уравнению (27). Это означает, что в бислое DOPC/DPPC молекулы спин-меченых стеариновых кислот занимают вертикальное положение, и спиновые метки, принадлежащие разным молекулам, расположены внутри одной плоскости. Такое пространственное распределение спиновых меток является характерным для липидных бислоев.

На Рисунке 32 приведены временные спады сигнала ДЭЭР для 16 и 5-DSA в бислое POPC. Данные построены в зависимости от временной задержки t либо $t^{2/3}$. Здесь наблюдается противоположная бислою DOPC/DPPC ситуация. В первом случае полученные данные имеют линейную зависимость, тогда как во втором нелинейную. Такое различие может означать, что в бислое POPC спиновые метки расположены более диффузно, чем в бислое DOPC/DPPC. Таким образом, они образуют квазитрехмерное распределение.

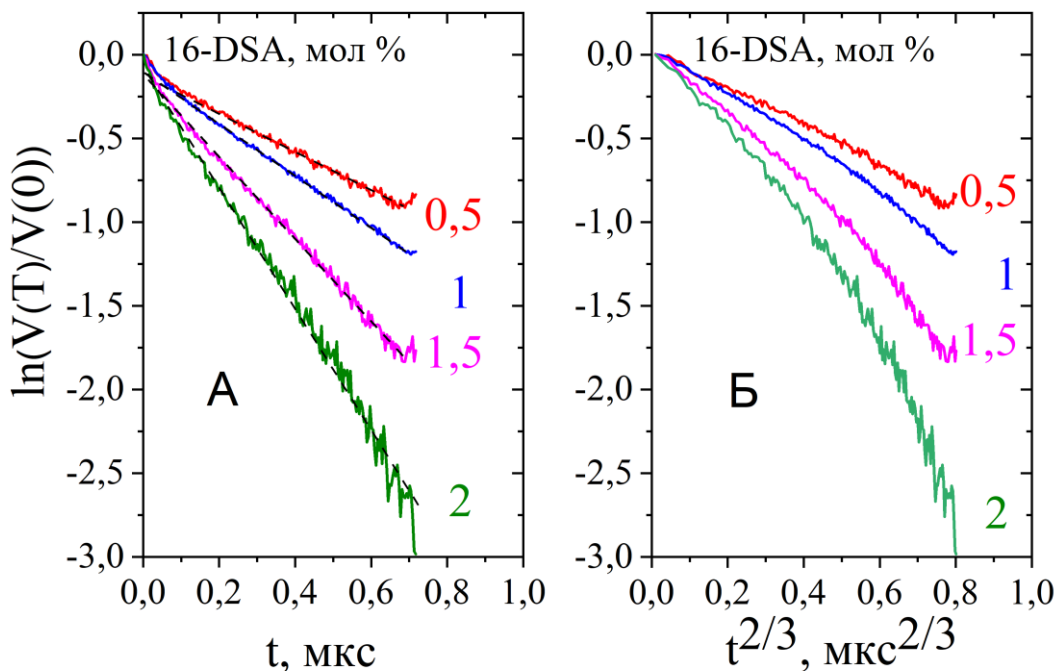


Рисунок 32. Спады сигнала ДЭЭР для 16-DSA в бислое POPC в полулогарифмических координатах в зависимости от: А – t либо Б – $t^{2/3}$, пунктирные линии нанесены для удобства

Итак, из данных ДЭЭР, представленных на Рисунке 31 и 32, можно сделать вывод, что молекулы спин-меченых стеариновых кислот в бислое DOPC/DPPC выстраиваются единообразно вдоль нормали к мембране, образуя для спиновых меток двумерное распределение в плоскости. В то же время в бислое POPC эти молекулы расположены более диффузно, формируя для спиновых меток квазитрехмерное распределение. Это различие можно объяснить более жесткой структурой бислоя DOPC/DPPC: в гелевой фазе молекула DPPC приобретает

вытянутую транс-конформацию [180], то же самое предполагается и для бислоя DOPC, который, хотя и содержит две двойные связи, тем не менее, может располагаться упорядоченно [181]. Между тем, одинарная двойная связь в середине хвоста POPC вызывает нарушение межмолекулярной упаковки молекул стеариновых кислот, что приводит к нарушению их положения вдоль нормали мембраны – см. Рисунок 33.

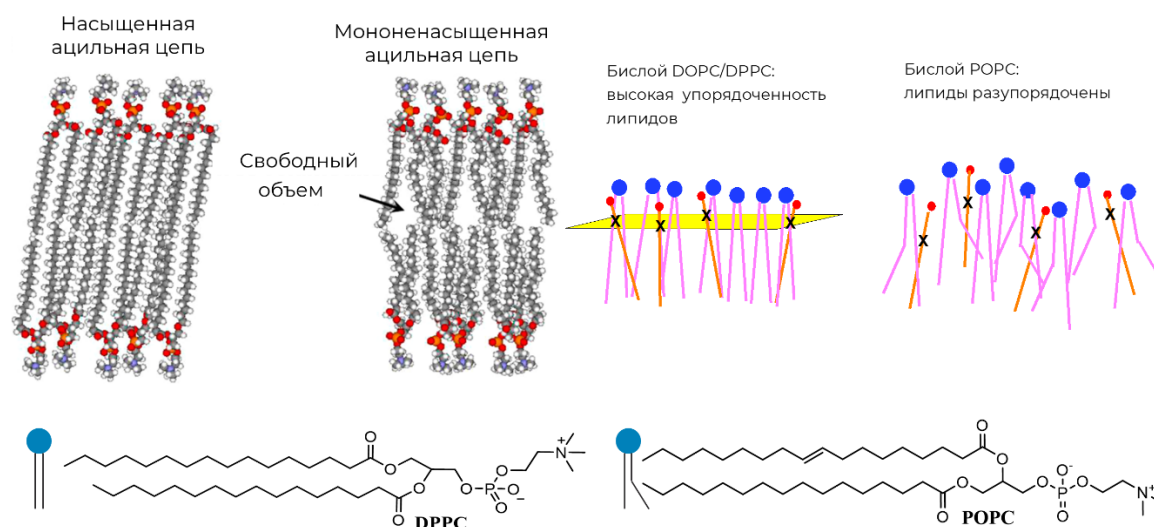


Рисунок 33. Графическое объяснение разницы в наноразмерном пространственном распределении для бислоя DOPC/DPPC и бислоя POPC

Известно, что в экспериментах ДЭЭР при наличии ориентационной корреляции между спиновыми метками могут проявляться эффекты ориентационной селективности, которые заключаются в зависимости затухания сигнала ДЭЭР от разницы частот детектирования и накачки ($\nu_A - \nu_B$) [149, 182, 183]. В данной работе были проведены измерения для 5-DSA в бислое POPC при различных частотных смещениях (разница между частотой детектирования и накачки менялась в диапазоне от 40 до 85 МГц – см. Рисунок П4 в Приложении). Полученные данные не показали заметной зависимости от смещения. Это означает, что ориентационная корреляция между спиновыми метками в данном случае не реализуется.

Из наклонов сигналов ДЭЭР, используя теоретические уравнения (26) и (27), можно получить локальные объемные или поверхностные концентрации, если известны значения p_V . Эти значения можно найти в калибровочном эксперименте ДЭЭР, в котором либо 16- либо 5-DSA растворяются в стеклующейся при замерзании смеси этанола и метанола (95:5 w/w). Полученные данные (см. Рисунок П5 в Приложении) хорошо подчиняются экспоненциальной зависимости, соответствующей трехмерному распределению спинов, которое характерно для молекулярного стекла. Значение p_V оказалось равным 0,049 для 16-DSA и 0,068 для 5-DSA.

Разница в значениях p_B может отражать деградацию спиновых меток при хранении ($p_B \approx 0,2$ для свежеприготовленных образцов при тех же экспериментальных условиях). Предполагается, что это не влияет на свойства молекул.

Найденные локальные поверхностные концентрации σ_{local} для спин-меченых стеариновых кислот 5 и 16-DSA в бислое DOPC/DPPC представлены на Рисунке 34. Данные приведены в зависимости от среднего молярного содержания стеариновых кислот χ в единицах нм^{-2} . Пунктирная линия описывается функцией $\sigma_{random} = 0,01\chi/A_L$, соответствующей случайному пространственному распределению. A_L — площадь, приходящаяся на липид ($\sim 0,60 \text{ нм}^2$) [184]. Из данных на Рисунке 34 следует, что значения полученных локальных поверхностных концентраций значительно превышают значения концентраций, характерных для случайного пространственного распределения. Из этого можно сделать вывод, что молекулы стеариновых кислот кластеризуются в бислое DOPC/DPPC. Кроме того, рассчитанные значения локальных концентраций для 16-DSA, значительно превосходят таковые для 5-DSA.

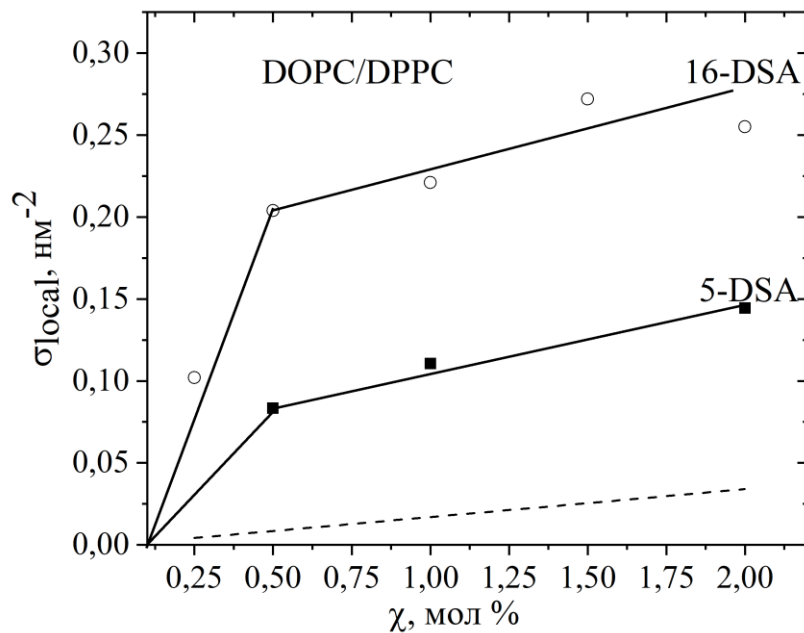


Рисунок 34. Локальные поверхностные концентрации $\sigma_{local}^{5(16)}$ для 5- или 16-DSA как функция их молярного содержания χ в бислое DOPC/DPPC. Для 16-DSA найденные значения обозначены кружками, для 5-DSA квадратами. Данные приведены в единицах нм^{-2} . Сплошные линии проведены для удобства; пунктирная прямая соответствует функции $\sigma_{random} = 0,01\chi/A_L$, ожидаемой для случайного пространственного распределения

Найденные локальные объемные концентрации C_{local} для 16-DSA и 5-DSA в бислое POPC в единицах нм^{-3} приведены на Рисунке 35 в зависимости от среднего молярного содержания спин-

меченых стеариновых кислот χ . Экспериментальная ошибка была оценена из ошибки определения тангенса для временных спадов ДЭЭР, учитывая также ошибку определения r_B .

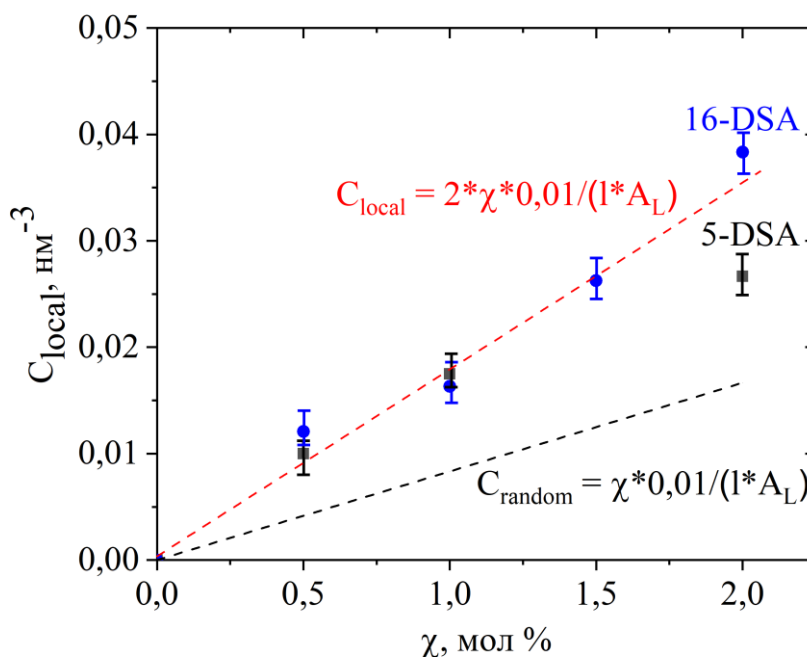


Рисунок 35. Локальные объемные концентрации $C_{local}^{5(16)}$ для 5 или 16-DSA как функция их молярного содержания χ в бислое POPC. Данные приведены в единицах нм⁻³. Для 16-DSA найденные значения обозначены кружками, для 5-DSA – квадратами. Сплошные линии проведены для удобства; черная пунктирная прямая соответствует функции $C_{random} = 0,01 * \chi / (A_L * 1)$, ожидаемой для случайного пространственного распределения, красная пунктирная линия соответствует функции $C_{local} = 2 * 0,01 * \chi / (A_L * 1)$

Данные на Рисунок 35 приведены в единицах нм⁻³. Черная пунктирная линия представляет собой функцию $C_{random} = 0,01 * \chi / (A_L * 1)$, где 1 – это половина расстояния между двумя атомами фосфора в двух противоположных бислоях (~ 2 нм) [185]. Из Рисунок 35 следует, что, во-первых, локальные концентрации C_{local} как для 5-DSA, так и для 16-DSA превышают C_{random} . Это указывает на образование наноразмерных кластеров в бислое POPC. Во-вторых, C_{local} в два раза превышает функцию C_{random} . Также на Рисунок 35 наблюдается превышение локальной объемной концентрации для 16-DSA при $\chi = 2$ мол % над 5-DSA. Кроме того, данные для 5-DSA на Рисунок 31 Г демонстрируют нелинейность затухания сигнала ДЭЭР при концентрации 2 мол %, чего не происходит для 16-DSA. Чтобы объяснить все эти особенности, необходимо принять во внимание, что спиновые метки в молекулах 16-DSA расположены в центре мембраны, в то время как спиновые метки в молекулах 5-DSA расположены ближе к двум поверхностям мембраны в двух разных плоскостях. Было сделано предположение, что молекулы спин-меченых

стеариновых кислот образуют подкластеры, которые чередуются в двух противоположных листках бислоя POPC, с отталкиванием между полярными головками, как это схематично представлено на Рисунке 36. Данная модель была названа моделью «шахматной шкатулки». Чередование приведет к нелинейности спадов ДЭЭР, как это было показано в моделировании для регулярно расположенных спиновых меток [186], а также к превышению локальной концентрации над средней в два раза. Кроме того, отталкивание уменьшит эффективную локальную концентрацию для 5-DSA по сравнению с 16-DSA при большой концентрации спиновых меток. Однако для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования и теоретическое моделирование.

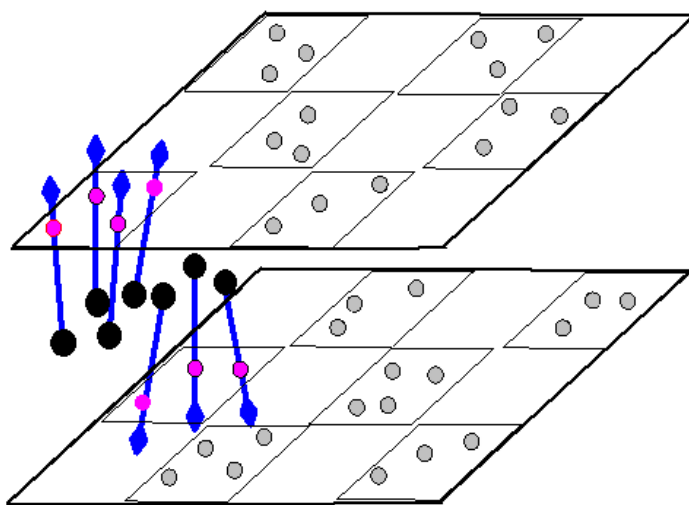


Рисунок 36. Схематическая модель кластеризации «шахматная шкатулка». Черные круги – спиновые метки в 16-DSA, розовые круги – спиновые метки в 5-DSA. Кластеры состоят из подкластеров, чередующихся в двух противоположных листках бислоя POPC. Из-за отталкивания полярных головок локальная поверхностная концентрация для 5-DSA уменьшается по сравнению с 16-DSA

Для бислоя DOPC/DPPC кластеризация, кроме возможного чередования в двух монослоях бислоя, включает в себя еще и сборку молекул в группы с некоторым разделением между ними, за счет чего локальная концентрация значительно увеличивается по сравнению со случайным пространственным распределением спиновых меток.

Также из данных на Рисунке 34 следует, что для 16-DSA значение σ_{local} достигает величины $\sim 0,255 \text{ нм}^2$ для концентрации $\chi \sim 2 \text{ мол } \%$. Соответственно, можно оценить расстояние между спиновыми метками в кластере как $\sigma_{local}^{-1/2}$, оно составит около 2 нм. Если принять среднее расстояние между липидами равным 0,8 нм [183], то можно сделать вывод, что молекулы стеариновых кислот в кластере разделены примерно 2,6 молекулами липидов.

Соответственно, кластеры являются липид-опосредованными. Следует отметить, что электростатическое взаимодействие между полярными головками молекул стеариновой кислоты, вероятно, не является движущей силой кластеризации. Действительно, данные ДЭЭР для молекул 5-DSA, в которых спиновые метки расположены близко к полярным головкам, однозначно свидетельствуют об отталкивании, а не о притяжении. Кроме того, из-за довольно большого расстояния между противоположными листками бислоя в многослойных липосомах (~ 2 нм) [187] электростатическое взаимодействие не должно влиять на кластеризацию. Вероятно, движущие силы возникают из-за градиента поверхностного натяжения, возникающего в бислое в присутствии стеариновых кислот. Наблюдаемое на Рисунке 30 уширение спектров ЭПР при концентрации χ более 2 мол % позволяет сделать вывод, что расстояние между спиновыми метками уменьшается с ~ 2 нм в кластере до ~ 1 нм [188], что означает, что при $\chi \geq 2$ мол % нанокластеры спин-меченых стеариновых кислот, образованные липидами, заменяются олигомерами.

Результаты, обсуждаемые в данном разделе, приведены в работе [189].

3.3.2. Кластеризация и наноразмерное пространственное распределение спин-меченых стеариновых кислот в модельных мембранах в присутствии хальципорина

Спектры CW ЭПР для спин-меченого хальципорина (Chalc-SL) в многослойных липосомах POPC, полученные при комнатной температуре, не отличаются от спектров, приведенных в [49]. Такая форма спектров типична для мембрано-связанных пептидов [179, 190].

На Рисунке 37 представлены спектры стационарного ЭПР при 200 К для спин-меченого хальципорина в бислое POPC. Форма спектров типична для иммобилизованных нитроксильных радикалов. При этом не наблюдается дополнительное уширение линий даже при самой большой из исследованных концентраций Chalc-SL 2 мол %. Данное уширение обычно возникает при агрегации спиновых меток и вызвано их магнитным диполь-дипольным взаимодействием [179]. Оно становится незначительным для спиновых меток, разделенных расстояниями более 1,5 нм [188]. Исходя из этого можно сделать вывод, что молекулы хальципорина не склонны к агрегации.

Спектроскопия ДЭЭР может предоставить информацию о кластеризации спин-меченых молекул: формировании кластеров и их структуре, взаимном пространственном распределении. Для случайного распределения спиновых меток в трехмерном пространстве сигнал ДЭЭР экспоненциально затухает согласно уравнению:

$$V_{3D}(t) = \exp\left(-\frac{8\pi^2}{9\sqrt{3}}Cp_B t\right). \quad (26)$$

Для экспериментальных условий данной работы значение p_B ожидается около 0,2 [191]. В случае неоднородного распределения спиновых меток общая концентрация C заменяется на локальную концентрацию C_{local} . Уравнение (26) также может быть использовано для кластеров спиновых меток, содержащих случайно распределенные спины, число которых (N) достаточно велико, чтобы считать эти кластеры бесконечными. Согласно результатам моделирования [192], это имеет место для N больше ~ 100 .

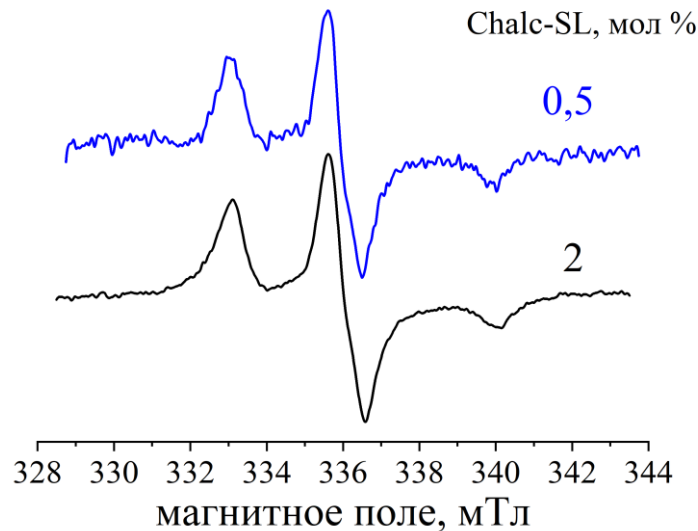


Рисунок 37. Спектры CW ЭПР при 200 К для Chalc-SL для двух концентраций в бислое POPC

Для биологических мембран более подходящим распределением является двумерное пространственное распределение. В этом случае имеет место зависимость вида:

$$V_{2D}(t) = \exp\left(-3,21\sigma p_b \left(\frac{g^2 \beta^2 t}{\hbar}\right)^{2/3}\right). \quad (27)$$

Для случая однородного распределения общая концентрация σ совпадает с локальной концентрацией σ_{local} . Если спиновые метки организованы в олигомеры с межспиновым расстоянием в несколько нанометров, сигнал ДЭЭР будет испытывать быстрый начальный спад, сменяющийся затем асимптотическими зависимостями, задаваемыми уравнениями (26) или (27).

На Рисунке 38 представлен полулогарифмический график временных спадов ДЭЭР, полученных для Chalc-SL в трех различных концентрациях в бислое POPC. Данные приведены в двух вариантах – с абсциссой, принятой за t и за $t^{2/3}$ – для сравнения с уравнениями (26) и (27) соответственно. На Рисунке 38 А сигнал ДЭЭР испытывает быстрый начальный спад (при $t < 0,1$ с), который затем сменяется линейным спадом; на Рисунке 38 Б все временные спады линейны.

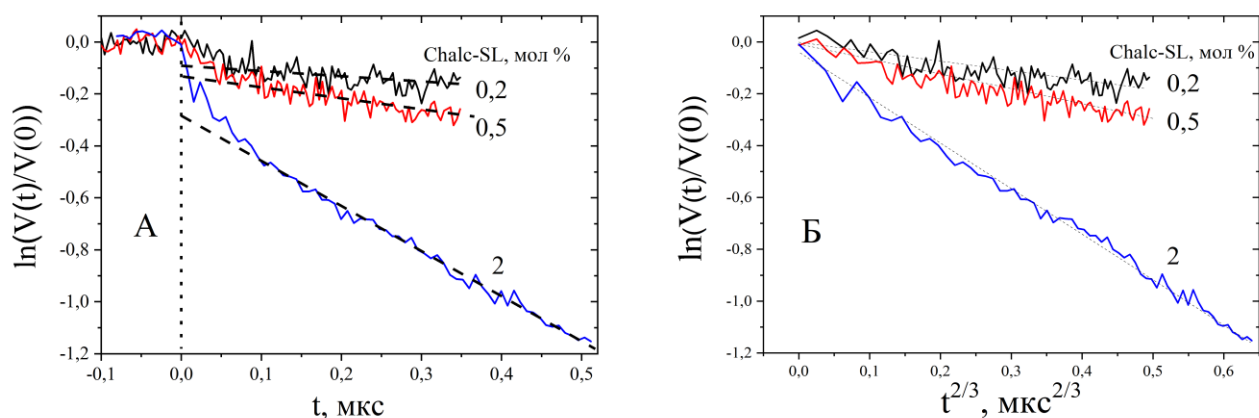


Рисунок 38. Спады сигнала ДЭЭР для Chalc-SL в трех различных концентрациях в бислое POPC. А – данные представлены как функция от t , пунктирные прямые линии показывают линейную аппроксимацию; Б – данные представлены как функция от $t^{2/3}$, пунктирные линии показывают линейную аппроксимацию

Эти два варианта представления данных допускают два альтернативных объяснения. Данные на Рисунке 38 А могут быть интерпретированы как свидетельство того, что молекулы Chalc-SL собираются в олигомеры, о чем свидетельствует быстрый начальный спад ($t < 0,1$ с). Олигомеры в данном случае имеют случайное трехмерное пространственное распределение, это следует из экспоненциального асимптотического спада ($t > 0,1$ с). Данные на Рисунке 38 Б, могут быть интерпретированы в рамках более простой модели, согласно которой молекулы спин-меченого пептида случайным образом распределяются в двумерном пространстве. Путем количественного сравнения с теоретическими уравнениями (26) и (27) можно выбрать более вероятное объяснение. Если принять $p_B = 0,2$ и значение концентрации, при котором все спиновые метки будут распределены случайным образом, $C_{random} = 0,01 * \chi / (A_L * 1)$, где 1 – это половина расстояния между двумя атомами фосфора в двух противоположных листках бислоя (~ 2 нм), а A_L — площадь, приходящаяся на липид, которая ожидается для случайного пространственного распределения ($\sim 0,60$ нм²), то из уравнения (26) следует, что локальная концентрация Chalc-SL C_{local} примерно в три раза меньше чем концентрация C_{random} в мембране для всех трех концентраций пептида. Это снижение может быть связано с частичной потерей спиновых меток при хранении, но в данном исследовании использовались свежеприготовленные образцы, поэтому такую возможность можно исключить. Между тем, при использовании модели двумерного пространственного распределения, σ_{local} близка к концентрации, соответствующей случайному пространственному распределению спиновых меток σ_{random} . Отсюда можно заключить, что спиновые метки, вероятнее всего, случайно распределены в двумерном пространстве, что также означает, что молекулы Chalc-SL не склонны к олигомеризации.

Модуляция огибающей сигнала ЭСЭ (ESEEM) возникает из-за взаимодействия неспаренного электрона спиновой метки с близлежащими ядрами. Частота сигнала ESEEM зависит от типа ядра, то есть если мембрана гидратирована тяжелой водой, то данный эксперимент позволяет выделить сигнал исключительно от воды. Кроме того, амплитуда сигнала ESEEM зависит от количества окружающих ядер. Для бислов, гидратированных D_2O , сигнал 2H -ESEEM дает информацию о локальной концентрации воды на расстояниях в диапазоне 0,1-1 нм от неспаренного электрона спиновой метки, эти данные позволяют сделать вывод о глубине погружения спинового зонда в бислой. Результаты 2H -ESEEM в бислое POPC, гидратированном D_2O , для спин-меченого хальципорина, представлены на Рисунке 39.

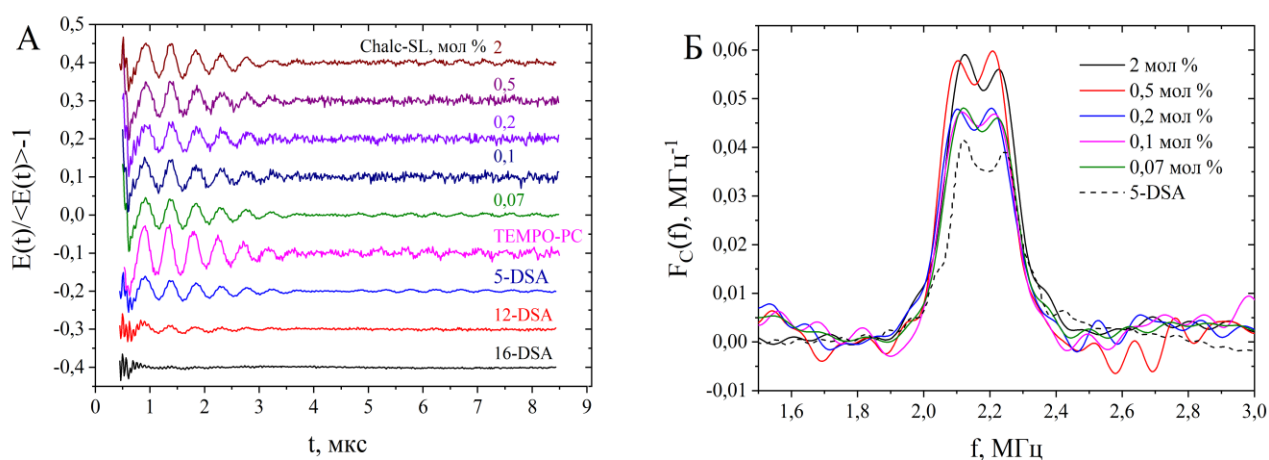


Рисунок 39. А – нормированные амплитуды сигнала ESEEM для Chalc-SL при его различных концентрациях в бислое POPC, гидратированного D_2O . Амплитуды сигнала ESEEM для 5-, 12-, 16-DSA и TEMPO-PC приведены для сравнения. Б – Фурье-преобразования сигнала ESEEM для Chalc-SL при его различных концентрациях в бислое POPC (сплошные линии) и для 5-DSA (пунктирная линия)

Также на Рисунке 39 А представлены справочные данные сигналов ESEEM, полученные в аналогичных условиях, для спин-меченых стеариновых кислот: 5-, 12- и 16-DSA, а также для 2-олеоил-1-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфо(темпо)холина (TEMPO-PC) [193]. В TEMPO-PC спиновая метка находится у полярной головки липида и подвергается воздействию водной оболочки, гидратирующей бислой. Обработка сигнала ESEEM с помощью уравнения (19) позволяет количественно оценить силу электронно-ядерного взаимодействия для удаленных ядер, сравнивая амплитуду модуляции для разных образцов. Из данных на Рисунке 39 следует, что амплитуда модуляции для Chalc-SL меньше, чем для TEMPO-PC, но больше, чем для 12- и 16-DSA, и близка к таковой для 5-DSA. Спиновая метка в TEMPO-PC находится в прямом контакте с водой, гидратирующей бислой, в 12- и 16-DSA она расположена во внутренней части мембраны, а в 5-DSA - между этими двумя крайними положениями. Таким образом, можно

сделать вывод, что спиновая метка Chalc-SL также встроена в мембрану и расположена под полярной головкой липида. Также можно отметить, что амплитуда модуляции примерно одинакова для разных концентраций спин-меченого хальципорина. Для более точного сравнения амплитуд ESEEM используется Фурье-преобразование сигнала ESEEM – Рисунок 39 Б. Эти данные были получены в соответствии с подходом, описанным в [194]. Близость, наблюдаемая во временной области (Рисунок 39 А), здесь приобретает более количественный характер. Для двух самых высоких концентраций, 0,5 и 2 мол %, амплитуда сигнала ESEEM несколько больше, чем для более низких концентраций. Это означает, что в данных случаях спиновая метка расположена несколько ближе к поверхности мембраны. Амплитуды сигнала ESEEM для Chalc-SL немного больше, чем для 5-DSA, что означает, что спиновая метка в Chalc-SL расположена ближе к поверхности мембраны, чем спиновая метка в 5-DSA.

Вторичная структура хальципорина в мембране POPC представляет собой α -спираль [49], полная длина которой составляет $\sim 2,16$ нм. Такой длины недостаточно для охвата гидрофобного ядра мембраны POPC (2,8-3,2 нм) [185]. Согласно данным ESEEM, представленным на Рисунке 39 Chalc-SL расположен немного выше 5-й углеродной позиции (ближе к поверхности мембраны) встроенной спин-меченой стеариновой кислоты. Это означает, что молекулы хальципорина находятся в глубине мембраны. Диаметр α -спирали составляет около 0,5 нм [195], если учесть также боковые группы пептида (Trp, Ala, Val, Gln, Ser, Leu), то внешний диаметр пептида хальципорина можно оценить как ~ 1 нм.

На Рисунке 40 показаны некоторые спады сигнала ДЭЭР для 5-DSA и 16-DSA в бислое POPC в присутствии хальципорина различной концентрации (полный набор данных ДЭЭР представлен на Рисунках П6-П9). Во всех случаях данные на Рисунке 40 подчиняются экспоненциальному поведению, соответствующему уравнению (26). Это может означать, что пространственное распределение стеариновых кислот вдоль нормали к мембране близко к трехмерному.

Из наклонов зависимостей на Рисунках П5-П8 с помощью уравнения (26) были посчитаны локальные объемные концентрации молекул 5(16)-DSA в бислое POPC. Значения p_V для 5-DSA и 16-DSA были найдены ранее [189] в калибровочных экспериментах в стеклюющейся при замерзании смеси этанола/метанола (95:5 w/w) (Рисунок П5); эти значения оказались равными 0,068 для 5-DSA и 0,049 для 16-DSA. На Рисунке 35 представлены значения C_{local} , найденные для 5(16)-DSA в отсутствие хальципорина. На Рисунке 41 представлены значения C_{local} для 5- и 16-DSA, полученные в зависимости от концентрации растворенного хальципорина, для двух концентраций 5(16)-DSA, 1 и 2 мол %.

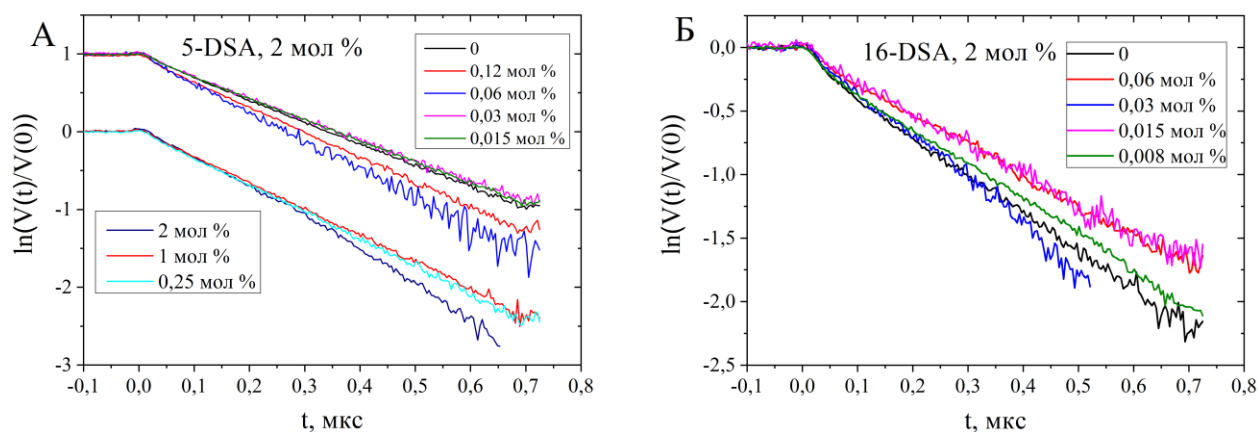


Рисунок 40. Спады сигнала ДЭЭР для А – 2 мол % 5-DSA и Б – 2 мол % 16-DSA при различном содержании хальципорина в бислое POPC

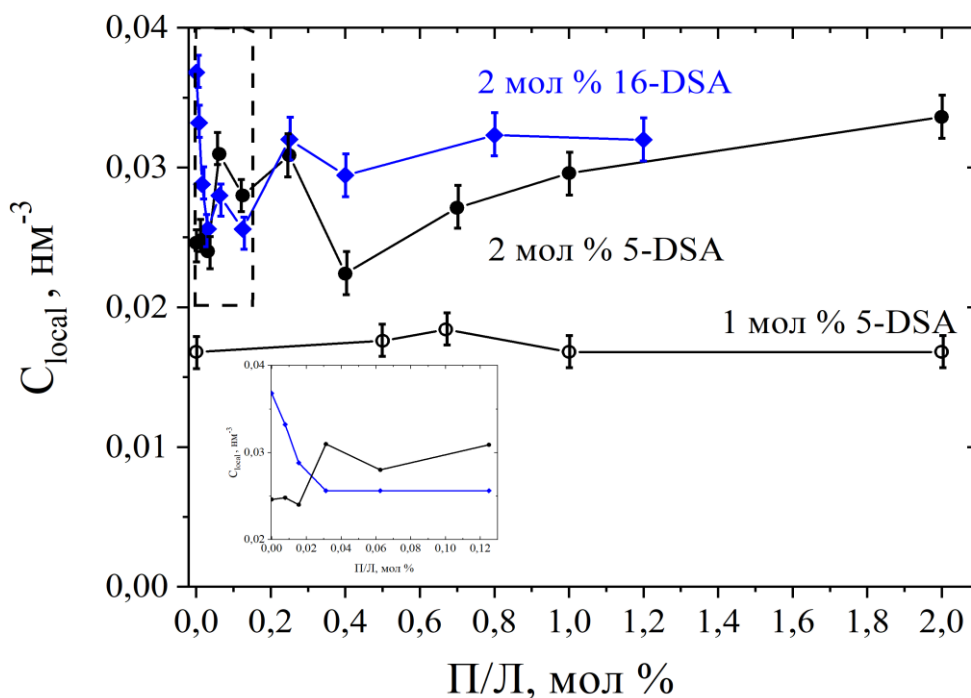


Рисунок 41. Локальные объемные концентрации спин-меченых стеариновых кислот в единицах нм^{-3} для 5-DSA и 16-DSA в мембране POPC как функция соотношения пептида к липиду (П/Л).

Данные получены с использованием уравнения (26) из временных спадов ДЭЭР. На вставке показана увеличенная часть графика, обозначенного пунктирным прямоугольником

Для концентрации 5(16)-DSA 2 мол % значение C_{local} для 16-DSA при П/Л = 0 (т.е. в отсутствие хальципорина) в полтора раза больше, чем C_{local} для 5-DSA, что соответствует данным Рисунке 35. С увеличением П/Л эти две концентрации выравниваются. Данный эффект выравнивания начинается при крайне низкой концентрации пептида и наблюдается уже при 0,01

мол % пептида ($P/L = 1/10\ 000$). Между тем, для концентрации 5-DSA 1 мол % локальная концентрация не меняется при изменении P/L , что соответствует аналогичным значениям для этой концентрации, показанным на Рисунке 35.

Как было показано в предыдущем исследовании [189], локальные концентрации спин-меченых стеариновых кислот без хальципорина превышают таковые для равномерного распределения свободных жирных кислот. Это однозначно указывает на кластеризацию молекул стеариновых кислот. Обнаруженное двукратное превышение локальной концентрации над средней для спин-меченых стеариновых кислот может быть объяснено чередующейся кластеризацией в двух противоположных листках бислоя POPC – см. Рисунок 35. Этот тип кластеризации можно назвать моделью «шахматной шкатулки». Причиной такой чередующейся кластеризации может быть влияние молекул DSA, собранных в одном липидном листке, на противоположный липидный лист.

Из данных, представленных на Рисунках 40 и 41 следует что присутствие хальципорина напрямую влияет на латеральное распределение стеариновых кислот. В работе [189] было обнаружено, что в отсутствие хальципорина локальная концентрация для 5-DSA ниже, чем концентрация 16-DSA (в мембране POPC наблюдается для $\chi > 1$ мол % DSA – см. Рисунок 35). Этот эффект был объяснен взаимным отталкиванием полярных головок и разделением спиновых меток между листками бислоя, что приводит к увеличению расстояний между спиновыми метками в 5-DSA – см. Рисунок 42 А. При добавлении хальципорина в липидный бислой значения C_{local} для 5-DSA возрастают с увеличением количества хальципорина, а для 16-DSA уменьшаются, стремясь к равенству. Это равенство можно интерпретировать как переорганизацию подкластеров стеариновых кислот, схематически показанную на Рисунке 42 Б. Предполагается, что молекулы спин-меченых стеариновых кислот собираются вокруг пептида, поэтому подкластеры в его присутствии становятся крупнее и отделяются друг от друга. Благодаря притяжению к молекулам пептида, взаимное отталкивание полярных головок молекул DSA в этих кластерах может стать менее значимым, поэтому локальная концентрация спиновых меток в 5-DSA становится выше. С другой стороны, из-за разделения кластеров локальная концентрация спиновых меток в 16-DSA становится ниже. Для 5-DSA при концентрации 1 мол % увеличение C_{local} при увеличении P/L не наблюдается (Рисунок 41). Это можно объяснить равенством видимых значений C_{local} для 5-DSA и 16-DSA в отсутствие пептида, которое видно на Рисунке 35. Это равенство означает, что чередующаяся кластеризация стеариновых кислот в двух противоположных листочках не влияет на значения C_{local} для данной концентрации DSA.

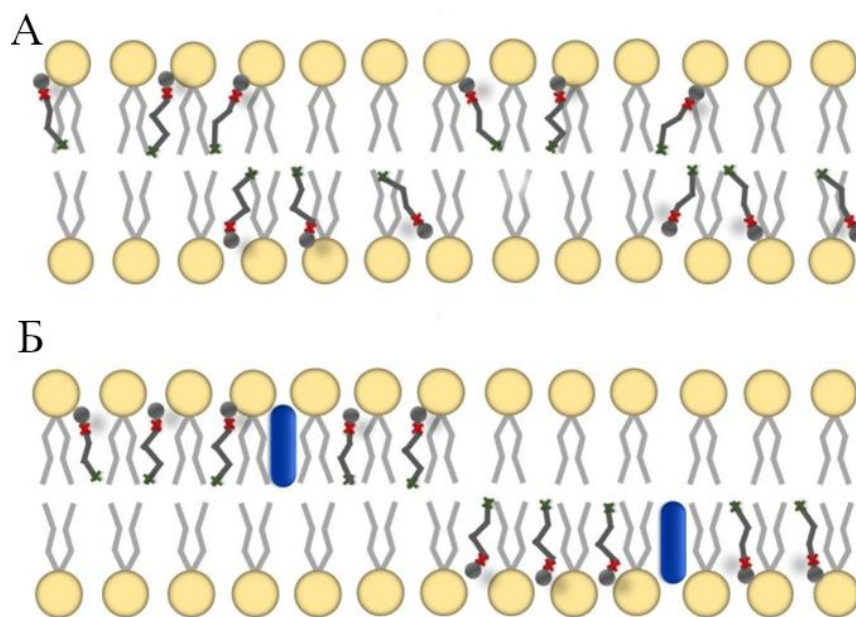


Рисунок 42. Схематическое изображение кластеризации стеариновых кислот в бислое POPC. А – без пептида, Б – в присутствии пептида (изображен синим цветом). Спиновые метки в 5-DSA изображены красными крестами, в 16-DSA — зелеными. Без пептида (А) кластеры разделены на небольшие подкластеры, поочередно расположенные в двух противоположных листах бислоя; локальная концентрация 5-DSA эффективно снижается из-за взаимного отталкивания полярных головок и разделения между листами. С пептидом (Б) подкластеры собираются вокруг пептида, становясь больше и взаимно разделяясь, концентрации стеариновых кислот 5- и 16-DSA выравниваются

Возможным механизмом притяжения DSA к пептидным молекулам может быть модуляция расположения ацильных цепей липидов, которая сопровождается образованием локальных дефектов [196]. Более гибкие и подвижные молекулы DSA занимают локальные пустоты и дефекты упаковки, изменяя тем самым конформацию и относительное расположение липидов. Вероятно, менее громоздкая полярная головка и одиночная цепь свободных жирных кислот делают ее более подходящей для такой компенсации, и в этом случае пептид работает как ее магнит [52]. Этот механизм, по-видимому, позволяет отбирать липиды, привлекая те из них, которые имеют более гибкую структуру (например, обладают меньшим числом двойных связей). Наиболее значимым результатом является то, что влияние антимикробного пептида хальципорина наблюдается при крайне малых концентрациях: эффект проявляется уже при 0,01 мол % (соотношение П/Л = 1/10 000). Для аналогичного пептида средней длины тилопептина В структурные изменения в кластеризации СЖК наблюдались также при низкой концентрации пептида: ~ 0,1 мол % (П/Л ~ 1/1000) [197]. Однако, эта концентрация не столь мала, как в настоящей работе. Для объяснения обнаруженного эффекта необходимы дальнейшие исследования. Кроме того, необходимо пояснить некоторую тенденцию к периодичности,

наблюдаемую на Рисунке 41 как для 5-DSA, так и для 16-DSA. Для 2 мол % 5-DSA можно увидеть локальные минимумы, возникающие вблизи соотношений П/Л: 0,03, 0,12 и 0,4 мол %. Существование этих минимумов, безусловно, превышает экспериментальную погрешность, достигнутую в данном эксперименте. Также можно отметить, что для 1 мол % 5-DSA данные на Рисунке 41 в пределах экспериментальной неопределенности почти постоянны. Эксперименты по рассеянию нейтронов показали, что пептиды в низких концентрациях 0,5 или 1 мол % могут нарушать латеральную неоднородность [42] и вызывать латеральное перераспределение липидов [43]. Эти результаты, вероятно, помогут понять, как короткий пептид убивает бактерии в низких концентрациях, не образуя пор и не разрушая мембрану.

Результаты, обсуждаемые в данном разделе, приведены в работе [198].

3.4. Заключение к главе 3

С помощью ЭПР-спектроскопии спиновых меток было исследовано взаимодействие АМП средней длины хальципорина с липидными мембранами. Полученные в данной работе результаты позволяют заключить, что (1) пептид локализован внутри мембраны, (2) он не склонен к специфической олигомеризации и (3) начиная со сверхнизких концентраций (~ 0,01 мол %), он вызывает латеральную переорганизацию свободных жирных кислот, встроенных в бислои. В отсутствие хальципорина локальная концентрация 5-DSA в бислое POPC ниже, чем 16-DSA. Такое поведение можно объяснить образованием подкластеров стеариновых кислот в двух противоположных листках бислоя. В присутствии пептида локальная концентрация 5-DSA увеличивается, в то время как 16-DSA уменьшается, таким образом, происходит выравнивание этих двух эффективных концентраций. Данный результат можно интерпретировать, предполагая, что подкластеры собираются вокруг пептида, становясь больше и взаимно разделяясь.

В результате данного исследования обнаружено формирование в мембранах нанокластеров свободных жирных кислот, выявлены особенности их пространственного распределения. В частности, сделаны выводы о перераспределении липидов в мембране в присутствии хальципорина, что может быть основой для понимания молекулярного механизма его действия на мембраны бактерий.

4. ЛОКАЛИЗАЦИЯ СПИН-МЕЧЕНЫХ МОЛЕКУЛ ИБУПРОФЕНА И ДИКЛОФЕНАКА В МОДЕЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ РАЗНЫХ ТИПОВ

4.1. Описание задачи

Ибупрофен, наряду с аспирином и диклофенаком, является наиболее известным нестероидным противовоспалительным препаратом, который широко используется в качестве анальгетика и жаропонижающего средства. Совершенствование нестероидных противовоспалительных препаратов ведется по нескольким направлениям: повышение их биодоступности, улучшение совместимости с другими препаратами, снижение негативного воздействия на желудочно-кишечный тракт и др. В связи с этим, новые данные о процессах взаимодействия НПВП с липидными мембранами, ранее недоступные для обнаружения и описания, могут оказаться чрезвычайно полезными. Локализация лекарственного средства в мембране является одной из важнейших характеристик их взаимодействия. В частности, определение вертикальной локализации необходимо для понимания закономерностей латеральной кластеризации.

В настоящей работе будет использован метод электронного парамагнитного резонанса спиновых меток, включая импульсную его разновидность – метод модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха. Также будет использоваться метод усиления парамагнитной релаксации в ЯМР. Эти методы позволяют проводить исследования в нанометровом диапазоне расстояний и получать информацию о структурной организации клеточных мембран на молекулярном уровне. Однако, для их применения необходимо, чтобы биомолекула содержала спиновую метку, поэтому в данной работе изучаются спин-меченые молекулы лекарств. Благодаря этому также удалось снизить концентрацию исследуемых препаратов до терапевтических доз. Комбинация этих двух методов может дать полное представление о локализации спиновых меток в мембране.

4.2. Образцы

Для приготовления изотропного раствора спин-меченый ибупрофен (спин-меченый диклофенак) растворяли в толуоле, при этом концентрация препарата составляла 5 ммоль/л.

Для эксперимента со встраиванием спин-меченого ибупрофена (спин-меченого диклофенака) в мембрану использовались образцы трех типов. В первом типе спин-меченый ибупрофен (спин-меченый диклофенак) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), а затем добавляли к приготовленным заранее модельным мембранам, состоящим только из липида

POPC. Содержание ДМСО составляло не более десяти процентов от общей массы мембраны. Модельные мембраны представляли собой многослойные липосомы. Для их приготовления липид POPC растворялся в хлороформе. Затем растворитель упаривали в потоке азота. Для удаления остатков хлороформа образец находился под вакуумом в течение 4 часов. После этого к липидной пленке добавлялся 0,01 М натрий-фосфатный буфер PBS (0,137 М NaCl, 0,0027 М KCl, pH 7) в соотношении 10 частей воды на одну часть липида по массе. Гидратация образца занимает около двух часов и требует периодического перемешивания. В результате получались многослойные липосомы, смешанные с водой. Лишнюю воду удаляли после центрифугирования при 14000 g в течение 4 минут. Соотношение липида к воде в результате составляло 1:3 по массе. Во втором типе образцов, в отличие от первого, спин-меченый ибупрофен (спин-меченый диклофенак) смешивался с липидом до приготовления мембран. Концентрация SL-ибупрофена (SL-диклофенака) во всех случаях была равна 1 мол % по отношению к липиду. Дальнейшая методика приготовления оставалась той же. И третий тип образцов готовился следующим образом: после высушивания от остатков растворителя под вакуумом, к пленке добавлялся PBS. Затем на образец воздействовали ультразвуком QSonica Q55 (мощность 35 Вт, частота 20 кГц). В результате получалась суспензия однослойных липосом. Для того чтобы отделить лишнюю воду, использовали центрифугирование. Соотношение липида к воде после этого составляло 1:3 по массе.

Для измерений ESEEM использовался образец, содержащий спин-меченый диклофенак (спин-меченый ибупрофен), в концентрации 1 мол % по отношению к липиду POPC в виде многослойных липосом. Для приготовления многослойных липосом все вещества растворялись в хлороформе и смешивались в необходимой пропорции. Затем выполнялась уже описанная последовательность действий, за исключением того, что вместо PBS для гидратирования образцов использовалась тяжелая вода.

В ЯМР экспериментах для приготовления однослойных липосом использовались липиды POPC или DMPC, холестерин, и либо спин-меченый ибупрофен (спин-меченый диклофенак), либо немеченый ибупрофен (немеченый диклофенак). Содержание холестерина составляло либо 0, либо 20 мол % по отношению к липиду. Содержание спин-меченого ибупрофена (спин-меченого диклофенака) составляло либо 0,25, либо 0,5 мол %. Содержание немеченого ибупрофена варьировалось от 0,25 до 5 мол % в зависимости от эксперимента. Все вещества в необходимых пропорциях растворялись в хлороформе и затем смешивались. Затем хлороформ упаривался потоком воздуха. После этого к образцам добавляли тяжелую воду и обрабатывали ультразвуком QSonica Q55 (мощность 35 Вт, частота 20 кГц) в течение 5 минут. Концентрация липидов в растворе была равна 10 мМ. Готовые образцы представляли собой суспензию однослойных липосом. Их объем составлял 0,5 мл. Они помещались в ампулы ЯМР диаметром 5

мм. Для приготовления бицелл липиды DHPC и POPC (или DMPC), взятые в молярном соотношении 2:1, с добавлением SL-ибупрофена (или немеченого ибупрофена) отдельно растворяли в хлороформе, затем растворитель удаляли потоком азота и полученную пленку хранили под вакуумом в течение 4 ч. Затем образцы гидратировали D₂O и проводили три цикла заморозки-разморозки. Согласно литературным данным [199], используемое молярное соотношение короткого липида DHPC и длинного липида POPC или DMPC, способствует образованию бицелл радиусом ~ 6 нм.

4.3. Результаты и обсуждение

4.3.1. Взаимодействие спин-меченого ибупрофена с модельными мембранами и его локализация по данным ESEEM

Обычно нитроксильная метка вводится в ибупрофен путем трансформации карбоксильной группы в сложноэфирную или амидную. Однако такой подход имеет несколько существенных недостатков. Во-первых, ингибирование ЦОГ достигается, в частности, за счет образования связей с карбоксильной группой ибупрофена, поэтому в результате такой замены происходит изменение скорости и эффективности взаимодействия лекарства с мишенью. Кроме того, согласно исследованиям, карбоксильная группа является гидрофильным «якорем» ибупрофена, играющим ключевую роль при взаимодействии с липидными мембранами и их компонентами.

В рамках данного исследования Барановым Д. С. был синтезирован спин-меченый аналог ибупрофена, который содержит нитроксильную метку в третьем положении бензольного кольца. Такой подход к введению спиновой метки был реализован для того, чтобы минимизировать ее влияние на фармакофорные центры и сохранить амфифильность молекулы.

Спектры CW ЭПР при комнатной температуре для спин-меченого ибупрофена, растворенного в толуоле представлены на Рисунке 43 (А). Такой вид спектра является характерным для нитроксильного радикала в растворе и свидетельствует о быстром вращении спиновой метки. На Рисунке 43 (Б) представлены спектры CW ЭПР при комнатной температуре для спин-меченого ибупрофена в бислое POPC. Образцы были получены двумя способами. В первом случае SL-ибупрофен и POPC смешивались до приготовления мембран (пунктирная линия). Во втором случае раствор SL-ибупрофена в ДМСО добавляли к готовым многослойным липомам (сплошная линия). Концентрация SL-ибупрофена в обоих случаях составляла 1 мол % по отношению к липиду. Форма спектров на Рисунке 43 (Б) является характерной для нитроксильного радикала, связанного с мембраной. Это говорит о том, что оба способа

приготовления образцов дают похожий результат. Эти спектры отличаются лишь наличием небольшой примеси узкого триплета для образцов, где спин-меченый ибупрофен добавлялся к уже готовым пленкам. Эта примесь, скорее всего, вызвана SL-ибупрофеном, который не встроился в мембрану, а остался в воде. Для этого же образца наблюдается сужение спектра, которое можно объяснить эффектом пластификации в присутствии ДМСО.

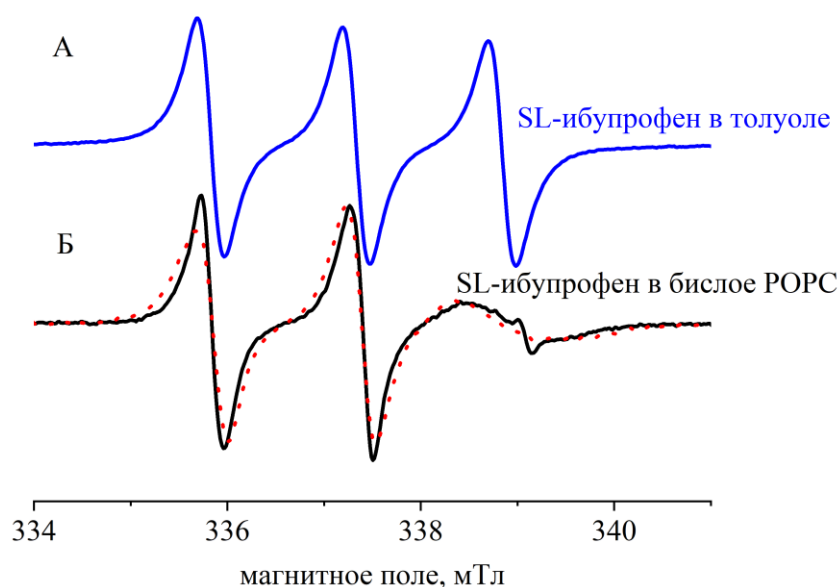


Рисунок 43. Спектры стационарного ЭПР для SL-ибупрофена при комнатной температуре. А – SL-ибупрофен растворен в толуоле в концентрации 5 мМ, Б – в мембране POPC. В последнем случае образцы готовили либо смешивая SL-ибупрофен и липид POPC до приготовления мембраны (пунктирная линия), либо добавляя SL-ибупрофен, растворенный в ДМСО, к уже готовым многослойным липосомам (сплошная линия)

Из формы спектров ЭПР в бислое POPC (Б) следует, что молекулярное движение заторможено по сравнению со случаем свободного вращения в растворе (А). Такое замедление молекулярного движения характерно для спектров ЭПР спин-меченых молекул в мембране POPC при комнатной температуре. Таким образом, можно заключить, что молекулы спин-меченого лекарства связываются с модельными мембранами независимо от способа приготовления образцов.

Информация о расположении спин-меченого ибупрофена относительно поверхности мембраны может быть получена с помощью метода ESEEM. Данные ESEEM для спин-меченого ибупрофена в бислое POPC представлены на Рисунке 44 А. Справочные данные для спин-меченых в различных положениях стеариновых кислот и TEMPO-PC, полученные в аналогичных условиях, также приведены на Рисунке 44 А. На Рисунке 44 Б представлены Фурье-

преобразования сигнала ESEEM. Как известно, положения атомов углерода в спин-меченых стеариновых кислотах примерно соответствуют таковым для липида, в который они встроены (с незначительными отклонениями) [125]. Спиновая метка TEMPO-PC находится непосредственно под воздействием водной оболочки, и для нее характерна наибольшая амплитуда сигнала. В случае спин-меченых стеариновых кислот, n-DSA (где n – номер атома углерода ацильной цепи, с которым связана спиновая метка), амплитуда сигнала уменьшается с увеличением n, поскольку нитроксильный радикал все больше удаляется от поверхности мембраны. Для SL-ибупрофена амплитуда сигнала ESEEM близка к амплитуде сигнала для 5-DSA, из чего следует, что спиновая метка в случае SL-ибупрофена располагается в гидрофобной части мембраны. Это согласуется с расчетами метода МД, которые проводились для немеченого ибупрофена, встроенного в липидный бислой [75, 83, 87]. Согласно этим работам, ибупрофен преимущественно располагается в гидрофобной части мембраны.

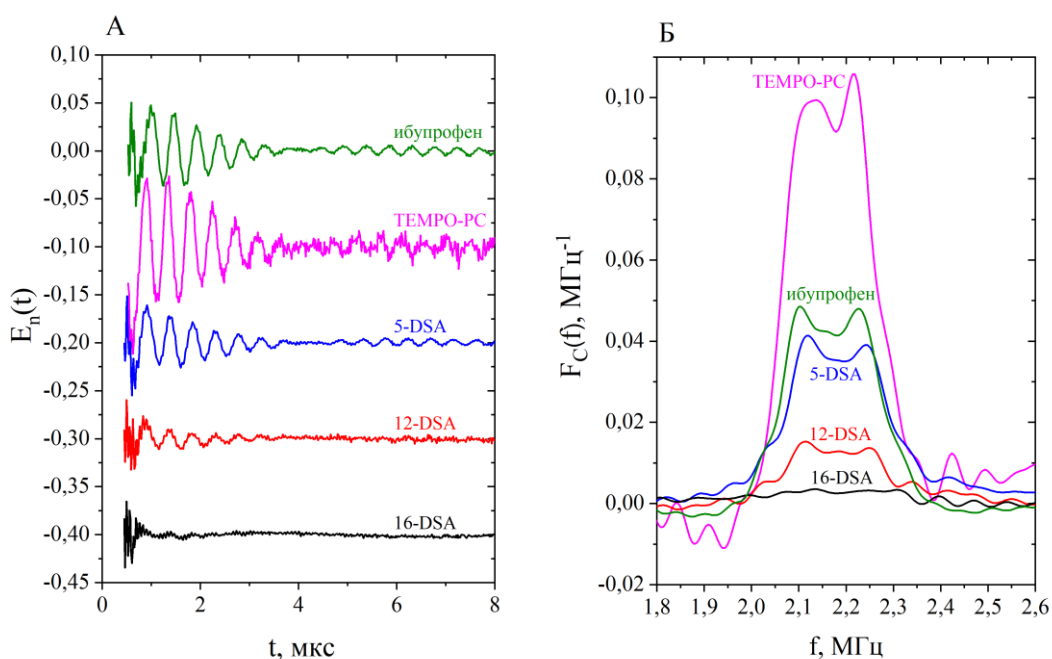


Рисунок 44. А – амплитуды сигнала ESEEM для SL-ибупрофена в бислое POPC, гидратированного D_2O . Также приведены данные, полученные в аналогичных условиях, для TEMPO-PC и 5(12,16)-DSA. Б – Фурье-преобразования сигнала ESEEM

Результаты, обсуждаемые в данном разделе, приведены в работе [176].

4.3.2. Локализация ибупрофена в модельных липидных мембранах по данным PRE NMR

Для исследования взаимодействий между липидными бислоями и ибупрофеном использовались различные экспериментальные и вычислительные подходы, такие как метод молекулярной динамики, сочетание компьютерного моделирования и дифракции нейтронов, рентгеновское рассеяние, рассеяние нейтронов, твердотельный ЯМР, ЭПР спиновых меток, включая импульсный ЭПР, и другие. Полученные данные показали, что ибупрофен преимущественно располагается в гидрофобной части мембраны, а также нарушает предпереход липидного бислоя, уменьшает молекулярную упаковку полярных головок и т.д. Однако типичные концентрации ибупрофена, используемые в большинстве экспериментальных подходов, довольно высоки, обычно от 2 мол % до 20 мол % от общего количества липидов, что гораздо выше типичных терапевтических доз [72, 79, 84, 85]. Благодаря большому магнитному моменту спина электрона использование спин-меченого ибупрофена позволяет снизить исследуемые концентрации до десятых долей мольного процента. В настоящей работе предполагается, что наличие спиновой метки не нарушает межмолекулярное взаимодействие с мембраной, поскольку главное свойство молекулы ибупрофена, а именно полярный карбоксильный остаток и неполярный хвост, не изменяется при мечении. ЯМР эксперименты и обсуждение результатов проводилось в сотрудничестве с О. Ю. Селютиной и лабораторией магнитных явлений ИХКГ СО РАН.

В данном исследовании используется метод ЯМР для изучения спин-решеточной релаксации протонов липидов в присутствии SL-ибупрофена. В качестве экспериментального подхода используется метод усиления парамагнитной релаксации, который позволяет обнаруживать взаимодействия между неспаренным электроном и протонами в ближайшем окружении спиновой метки. Помимо чувствительности к низким концентрациям препарата, этот подход позволяет избирательно исследовать положение спиновой метки относительно различных участков липидной цепи. Также времена релаксации могут быть использованы для определения возможности встраивания молекулы в липидный бислой.

Одним из важнейших компонентов мембран млекопитающих является холестерин. Рентгеновские дифракционные исследования показали, что в присутствии 20 мол % холестерина, ибупрофен в концентрации 5 мол % вытесняется из гидрофобного ядра мембраны в область, расположенную ближе к головной группе бислоя [79]. В данной работе также исследуется влияние холестерина на локализацию ибупрофена, но для концентрации спин-меченого аналога (SL-ибупрофен) на порядок ниже, чем в существующих исследованиях.

^1H ЯМР спектр однослойных липосом РОРС представлен на Рисунке 45 А [200]. Спектр состоит из ряда хорошо различимых линий, что позволяет избирательно исследовать различные положения в липидной цепи.

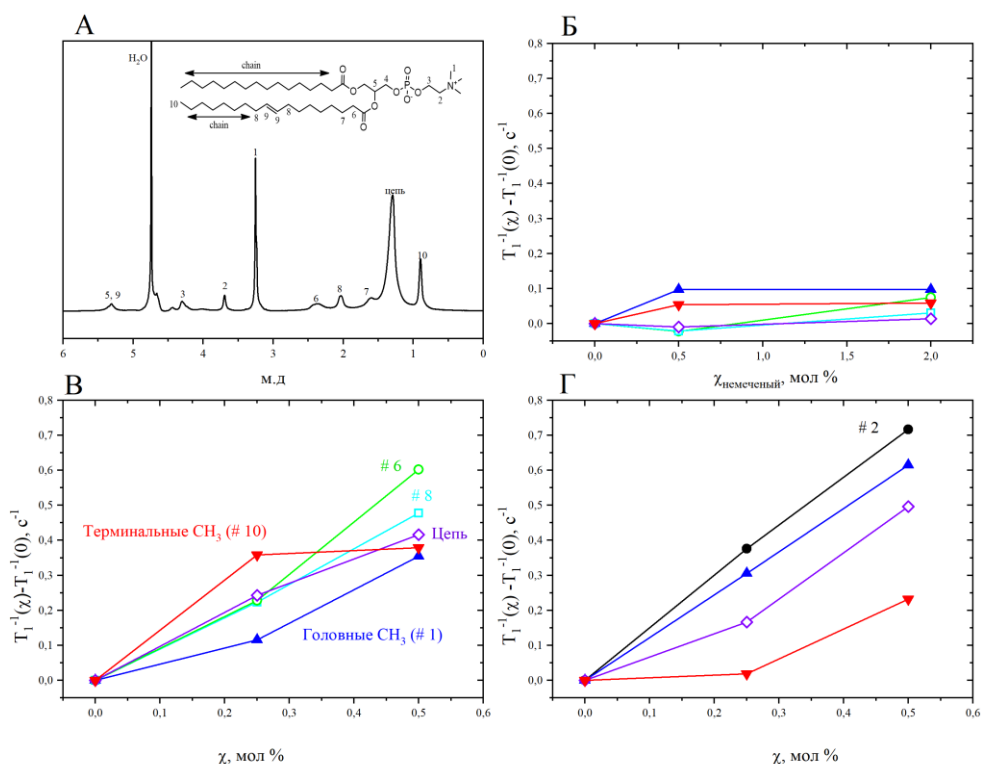


Рисунок 45. А – фрагмент ^1H ЯМР спектра однослойных липосом РОРС. Б – изменение скорости релаксации протонов в бислое РОРС при добавлении немеченого ибупрофена, В – при добавлении SL-ибупрофена, Г – при добавлении SL-ибупрофена и 20 мол % холестерина

На Рисунке 45 Б, В и Г представлены данные сигналов ЯМР, которые можно считать наиболее информативными для целей настоящего исследования. Полный набор экспериментально полученных данных по T_1 приведен в Приложении, Таблицы П1 – П3. Поскольку встраивание гостевых молекул может изменять свойства бислоя, были проведены контрольные эксперименты по измерению T_1 молекул липидов в присутствии немеченых молекул ибупрофена в однослойных липосомах РОРС. Полученные различия в скоростях релаксации T_1^{-1} по сравнению с чистым липидом ($\chi_{\text{немеченого ибупрофена}} = 0$ мол %) приведены на Рисунке 45 Б. Из полученных данных можно сделать вывод, что добавление немеченого ибупрофена не оказывает существенного влияния на времена релаксации. Наблюдаемые небольшие изменения можно объяснить изменением межмолекулярной структуры при добавлении ибупрофена, что, в свою очередь, должно влиять на молекулярные движения, к которым спиновая релаксация протонов очень чувствительна. На Рисунке 45 В показаны

различия в скорости релаксации протонов T_1^{-1} для SL-ибупрофена в POPC по сравнению со случаем чистого липида POPC (когда $\chi = 0$ мол %). Поскольку наблюдаемые эффекты значительно выше, чем для немеченого ибупрофена (Рисунок 45 Б), эти различия могут быть объяснены влиянием спиновой метки, описываемым уравнениями (30) и (31).

При малых концентрациях, когда $\chi = 0,25$ мол %, наиболее сильный эффект наблюдается для протонов терминальных CH_3 -групп липидов – см. Рисунок 45 В. Для протонов в середине гидрофобной части липида (протоны в липидной цепи, протоны № 8 вблизи двойных связей и протоны № 6 под полярной головкой - см. Рисунок 45 А) эффект заметно сильнее, чем для метильных протонов полярной головки (группы $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$). Это означает, что SL-ибупрофен проникает в липидный бислои и располагается в глубине мембраны. Этот результат согласуется с результатами многочисленных исследований по мембранной локализации ибупрофена [79, 86, 87], включая исследование ESEEM, проведенное в данной работе [176]. Из данных на Рисунке 45 В следует, что для $\chi = 0,5$ мол % распределение спин-меченого ибупрофена в гидрофобном хвосте бислоя становится более равномерным.

На Рисунке 45 Г показаны обратные скорости релаксации протонов для SL-ибупрофена в мембране POPC с добавлением 20 мол % холестерина. Здесь спиновая метка оказывает наиболее сильное влияние на протоны липидов, расположенные в полярной головке (в группе $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ и во 2-й позиции – см. Рисунок 45 А). Для протонов терминальных CH_3 -групп влияние оказывается самым незначительным. Отсюда можно сделать вывод, что при добавлении холестерина SL-ибупрофен перемещается из гидрофобного хвоста бислоя в область, которая находится ближе к полярной головке. Такое вытеснение ибупрофена холестерином согласуется с литературными рентгеновскими данными, показывающими, что в присутствии 20 мол % холестерина ибупрофен (не меченый) вытесняется из ядра мембраны и располагается исключительно в области головной группы бислоя [79]. Однако эти данные были получены для $\chi = 5$ мол %, в то время как в данном исследовании были использованы гораздо более низкие концентрации. Литературные данные по моделированию методом молекулярной динамики также указывают на то, что ибупрофен способен перемещаться внутри липидного бислоя [84].

На Рисунке 46 показаны изменения скорости релаксации протонов T_1^{-1} для бицелл DNPC:POPC (2:1) и DNPC:DMPC (2:1) в присутствии немеченого ибупрофена либо спин-меченого ибупрофена. Спектры ЯМР в этих случаях очень похожи на спектры на Рисунке 45 А для бислоя POPC, поэтому здесь используются те же обозначения для линий ЯМР.

Из данных на Рисунке 46 А и В следует, что добавление немеченого ибупрофена не оказывает существенного влияния на времена релаксации. (За исключением терминальных групп CH_3 , для которых наблюдается небольшое уменьшение T_1^{-1} , что свидетельствует о том, что добавление ибупрофена увеличивает свободный объем в центре бицелл, повышая подвижность

метильных групп). Из зависимостей на Рисунке 46 В можно заключить, что наиболее сильное влияние спиновой метки в бицеллах DNPC:POPC (2:1) наблюдается для протонов № 6 (см. Рисунок 45 А) и для протонов цепи. Таким образом, спин-меченый ибупрофен здесь локализован в узком диапазоне глубин, расположенном значительно ниже полярной поверхности бислоя, но определенно за пределами центра бислоя.

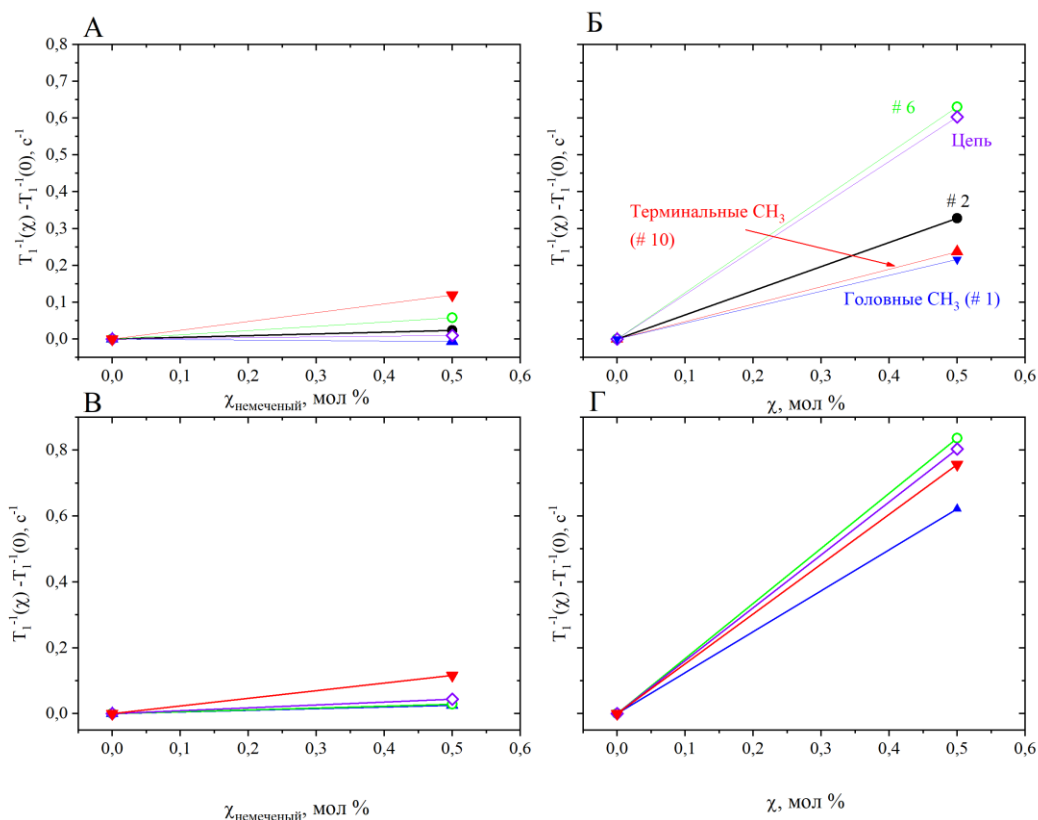


Рисунок 46. Изменение скорости релаксации протонов в бицеллах DNPC:POPC (2:1): А – при добавлении немеченого ибупрофена, Б – при добавлении спин-меченого ибупрофена.

Изменение скорости релаксации протонов в бицеллах DNPC:DMPC (2:1): В – при добавлении немеченого ибупрофена, Г – при добавлении спин-меченого ибупрофена

На Рисунке 46 Г показаны скорости релаксации T_1^{-1} для бицелл, состоящих из смеси DNPC:DMPC (2:1). По сравнению с бицеллами DNPC:POPC (2:1), в бислое DNPC:DMPC локализация SL-ибупрофена распределена по всему бислою. Такое различие в локализации при замене POPC на DMPC может быть связано с тем, что ненасыщенный липид в первом случае заменяется насыщенным во втором. В липиде POPC есть одна ненасыщенная связь, из-за которой образуется изгиб гидрофобного хвоста молекулы. Таким образом, можно предположить, что такой изгиб служит ловушкой для гостевых молекул ибупрофена.

Ядерный эффект Оверхаузера (NOE) используется для повышения чувствительности измерений для таких ядер как ^{13}C , ^{15}N , ^{29}Si , поскольку их естественное содержание и величина

магнитного момента ядер малы. В основе метода лежит прямое магнитное диполь-дипольное взаимодействие между спинами разных ядер. Вторым типом ядер обычно являются протоны. При накачке ядер с большим значением магнитного момента (протоны) происходит усиление сигнала связанных с ними дипольным взаимодействием ядер с меньшим значением магнитного момента. Это и есть ядерный эффект Оверхаузера. Диполь-дипольное взаимодействие зависит от расстояния между взаимодействующими спинами. Соответственно, величина NOE также зависит от этого расстояния.

Одним из наиболее эффективных методов исследования конформационной структуры в ЯМР спектроскопии является метод NOESY для регистрации ядерных эффектов Оверхаузера (nuclear Overhauser effect spectroscopy). С помощью селективного воздействия на выбранную группу протонов данный эксперимент позволяет получить информацию о ближайших соседях в пространстве. NOESY позволяет определять расстояния между магнитными ядрами, которые расположены на расстояниях меньших 5 Å [127, 201, 202].

Метод NOESY использовался для сравнения локализации немеченого и спин-меченого ибупрофена в бицеллах DMPC:DHPC (2:1). На Рисунке 47 представлены ^1H ЯМР спектры и NOESY для бицелл DMPC:DHPC с добавлением ~ 5 мол % немеченого ибупрофена в отсутствие и в присутствии 20 мол % холестерина (в D_2O , pH = 6). В обоих случаях возбуждались все сигналы ароматических протонов ибупрофена в ЯМР спектре. Для ибупрофена в отсутствие холестерина наблюдается кросс-пик (при 0,9 м.д.) только с терминальными группами CH_3 липидов (кросс-пик при 1,8 м.д. соответствует протонам ибупрофена (CH_3)). Известно, что кросс-пики NOESY наблюдаются для ядер, расположенных на расстоянии менее 0,5 нм. Из данных на Рисунке 47 следует, что при добавлении 20 мол % холестерина кросс-пик при 0,9 м.д., соответствующий взаимодействию с терминальными CH_3 -группами липида, исчезает, и при 1,2 и 3,2 м.д. появляется кросс-пик с CH_2 - и головными метильными группами ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) липидов. Это означает, что холестерин вытесняет ибупрофен из центра гидрофобной части бислоя ближе к поверхности бислоя, что согласуется с интерпретацией данных на Рисунке 45 Г.

Таким образом, метод усиления парамагнитной релаксации в ЯМР может быть использован для изучения локализации спин-меченых молекул лекарств в липидных мембранах. Хорошо разрешенные спектры ЯМР на частоте 500 МГц позволили селективно обнаружить усиление релаксации для различных положений в липидной цепи. Высокое значение магнитного момента электрона позволяет исследовать низкие концентрации спин-меченых молекул, вплоть до десятых долей мольного процента. Для исследованных модельных липидных систем – однослойных липосом POPC с холестерином и без него, бицелл DHPC:POPC (2:1) и бицелл DHPC:DMPC (2:1), полученные результаты показывают, что спин-меченый ибупрофен

локализуется в гидрофобной части липидного бислоя. Однако его локализация зависит от концентрации и состава липидов.

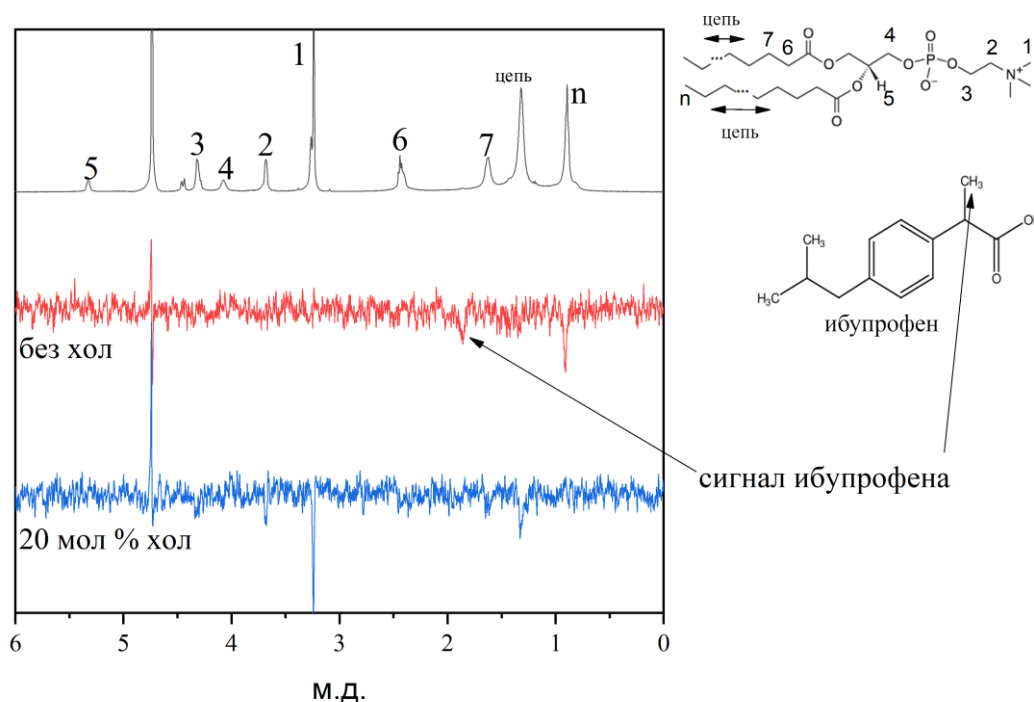


Рисунок 47. Спектр ^1H ЯМР бицелл DMPC:DHPC и селективные градиентные NOESY-спектры ~ 5 мол % немеченого ибупрофена, добавленного в отсутствие (красная линия) и в присутствии 20 мол % холестерина (синяя линия)

При концентрации менее 0,25 мол % SL-ибупрофен в бислое POPC локализуется преимущественно в центре бислоя, а увеличение концентрации выше этого значения приводит к его смещению ближе к поверхности мембраны. Добавление холестерина также приводит к перемещению SL-ибупрофена из центра бислоя в позиции ближе к его поверхности. Этот результат был подтвержден и для немеченого ибупрофена в эксперименте NOESY.

В бицеллах DHPC:POPC ибупрофен локализуется в узком диапазоне глубин значительно ниже полярной поверхности бислоя, но определенно вне центра бислоя. В бицеллах DHPC:DMPC локализация SL-ибупрофена размазана по всему бислою. Такая разница в локализации может быть связана с влиянием изгиба в структуре ненасыщенных липидов POPC: этот изгиб может служить ловушкой для молекул ибупрофена.

Результаты, обсуждаемые в данном разделе, приведены в работе [203].

4.3.3. Взаимодействие спин-меченого диклофенака с модельными мембранами и его локализация по данным ESEEM

Как уже было отмечено выше, наиболее простым способом введения нитроксильной спиновой метки в препараты, являющиеся производными карбоновых кислот, является использование превращений карбоксильных групп. Однако потеря карбоксильной группы в исходной молекуле препаратов является существенным недостатком для их использования в качестве модельных объектов исследования. В рамках данного исследования Барановым Д. С. был синтезирован спин-меченый аналог диклофенака, который содержит нитроксильную метку, связанную с бензольным кольцом через алкильное звено. В такой молекуле сохранена карбоксильная группа, а также связанные с ней молекулярные свойства, в частности, амфифильность. В данной работе исследуется локализация спин-меченого диклофенака в модельной мембране POPC методом ESEEM по аналогии с уже исследованной локализацией для другого спин-меченого препарата – ибупрофена [176].

Спектр стационарного ЭПР при комнатной температуре для спин-меченого диклофенака, растворенного в толуоле (концентрация препарата составляла 5 мМ), представлен на Рисунке 48 (А). Форма спектра свидетельствует о том, что нитроксильный радикал быстро вращается в изотропной среде. На Рисунке 48 (Б) представлены спектры CW ЭПР при комнатной температуре для SL-диклофенака в мембране POPC. Модельные мембраны были приготовлены двумя способами. В первом случае мембраны готовили по методике приготовления многослойных липосом, заранее растворив в хлороформе SL-диклофенак и POPC (концентрация SL-диклофенака составляла 1 мол % по отношению к POPC). Во втором случае SL-диклофенак, растворенный в ДМСО, добавляли к уже полученным мембранам, которые состояли из липида POPC. Форма спектров для двух различных методов приготовления практически одинакова. В спектрах на Рисунке 48 (Б) наблюдается значительное уменьшение амплитуды высокополевой компоненты по сравнению с двумя другими компонентами. Это уменьшение указывает на замедление движения, которое имеет место в случае, если спиновая метка встроена в мембрану. Таким образом, можно сделать вывод, что спин-меченый диклофенак связывается с мембраной.

Аналогичный эксперимент был проделан для спин-меченого диклофенака и однослойных липосом, состоящих из липида POPC. Форма спектра ЭПР для однослойных липосом незначительно отличается от формы спектра для многослойных липосом. Отсюда можно сделать вывод, что их проницаемость схожа для спин-меченого диклофенака. Стационарные спектры ЭПР при комнатной температуре для спин-меченого диклофенака в однослойных липосомах POPC представлены на Рисунке П10 в Приложении.

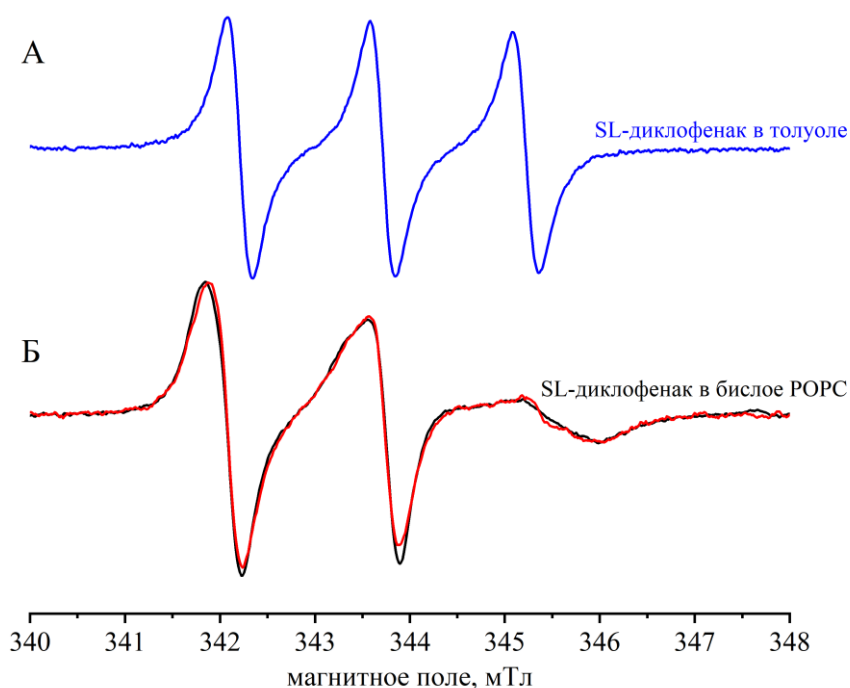


Рисунок 48. Спектры CW ЭПР при комнатной температуре для спин-меченого диклофенака. А – в толуоле (концентрация SL-диклофенака 5 мМ), Б – в мембране POPC. В последнем случае образцы готовились либо путем смешивания SL-диклофенака и POPC до формирования липосом (сплошная линия), либо путем добавления раствора SL-диклофенака в ДМСО, к готовым мембранам (пунктирная линия)

Для определения расположения спин-меченого диклофенака относительно поверхности мембраны применялась спектроскопия ESEEM. На Рисунке 49 А показаны нормированные амплитуды сигнала ESEEM для SL-диклофенака в бислое POPC, гидратированном D_2O . Здесь же также приведены литературные данные для спин-меченых по всей углеродной цепи стеариновых кислот (стеариновые кислоты содержали метку в n -м атоме углерода), n -DSA, и данные для TEMPO-PC. Соответствующие результаты косинусного Фурье-преобразования представлены на Рисунке 49 Б. Для TEMPO-PC характерна самая высокая амплитуда сигнала ESEEM, поскольку спиновая метка находится непосредственно в водной фазе, вблизи полярных головок липида. Для спин-меченых стеариновых кислот, n -DSA, амплитуда сигнала уменьшается с увеличением n , поскольку спиновая метка погружается внутрь мембраны. Для SL-диклофенака амплитуда сигнала близка к амплитуде для 5-DSA. Таким образом, можно сделать вывод, что спиновая метка встроена во внутреннюю часть мембраны, а ее среднее положение соответствует пятому положению атома углерода в липидной цепи.

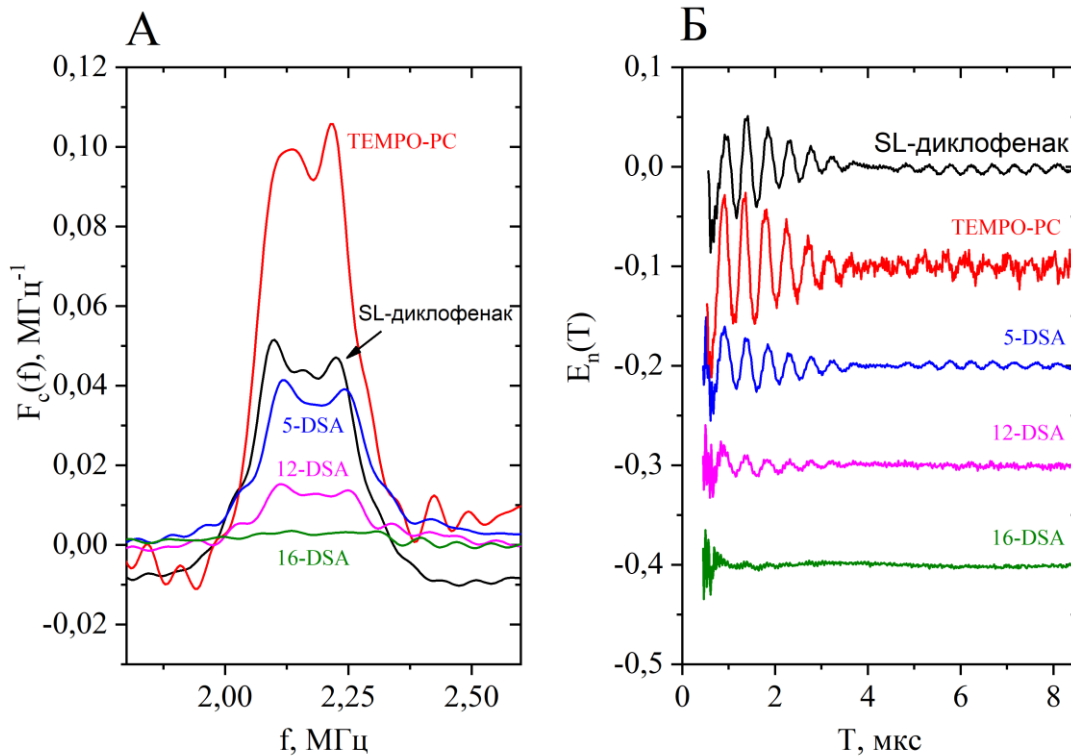


Рисунок 49. А – Амплитуды сигнала ESEEM для SL-дмклофенака в бислое РОРС, гидратированного D_2O . Для сравнения приведены литературные данные, полученные в аналогичных условиях, для TEMPO-PC и 5(12,16)-DSA. Б –Фурье-преобразования сигнала ESEEM

Результаты, обсуждаемые в данном разделе, приведены в работе [177].

4.4. Заключение к главе 4

Исследования ESEEM для спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в мембране РОРС дали похожий результат: оба этих препарата локализуются в гидрофобной части мембраны, пространственное расположение спиновой метки соответствует положению пятого атома углерода в ацильной цепи. Для спин-меченого ибупрофена эти данные были уточнены и дополнены методом PRE. Основной результат заключается в том, что спин-меченый ибупрофен в отсутствие холестерина локализуется в гидрофобной части липидного бислоя вблизи двойной связи независимо от типа мембраны. Но при добавлении холестерина к модельной мембране РОРС происходит смещение спин-меченого ибупрофена из центра бислоя в положения, более близкие к его поверхности.

5. НАНОРАЗМЕРНОЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И КЛАСТЕРИЗАЦИЯ СПИН-МЕЧЕННЫХ МОЛЕКУЛ ИБУПРОФЕНА И ДИКЛОФЕНАКА В МОДЕЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ

5.1. Описание задачи

Обезболивающее действие нестероидных противовоспалительных препаратов связано с их ингибированием фермента циклооксигеназы, который участвует в синтезе простагландинов. Простагландины – это группа гормоноподобных липидных веществ, которые являются медиаторами воспаления и боли. Однако в дополнение к ЦОГ-пути появляется все больше доказательств альтернативного механизма действия НПВП через взаимодействие с клеточной мембраной. В результате этого взаимодействия могут изменяться физико-химические свойства мембран, что, в свою очередь, может повлиять на ее функциональность и вызвать ряд побочных эффектов. Таким образом, исследования механизмов взаимодействия между НПВП и мембранами на молекулярном уровне позволит получить полезную информацию о фармакокинетике и токсичности лекарственных препаратов.

Считается, что мембраны имеют гетерогенную структуру в нанометровой шкале расстояний. Методы импульсного двойного электрон-электронного резонанса чувствительны как раз к таким расстояниям, что делает их перспективными для изучения такой гетерогенности. Относительно недавно было показано, что метод ДЭЭР, который раньше применялся в основном к дважды спин-меченым биомолекулам, может быть применен также и к (моно) спин-меченым молекулам для выявления особенностей их наноразмерного пространственного распределения и кластеризации. Важным преимуществом ДЭЭР-спектроскопии является то, что она позволяет исследовать спин-спиновое диполь-дипольное взаимодействие между спиновыми метками, расположенными друг от друга в нанометровом диапазоне расстояний. Наноскопическая структура и динамика мембран, содержащих НПВП, представляют собой особый интерес для современных научных исследований. В данной работе исследуется взаимодействие спин-меченого ибупрофена и диклофенака с модельной мембраной, состоящей из липида POPC, методом двойного электрон-электронного резонанса.

5.2. Образцы

Для исследований методом ДЭЭР использовались многослойные липосомы, состоящие из липида POPC. Концентрация SL-ибупрофена (SL-диклофенака) варьировалась от 0,15 до 2,5 мол

% по отношению к липиду. Методика приготовления многослойных липосом была описана в главе 3, раздел 3.2.

5.3. Результаты и обсуждение

5.3.1. Наноразмерное пространственное распределение ибупрофена в липидном бислое

Стационарные ЭПР спектры, снятые для различных молярных концентраций χ SL-ибупрофена в бислое POPC, представлены на Рисунке 50 А для комнатной температуры и на Рисунке 50 Б для 200 К. При комнатной температуре спектры демонстрируют сужение, вызванное движением спиновых меток. Ширина спектральной линии немного увеличивается с ростом концентрации, как видно из вставки к Рисунку 50 А. Это увеличение может быть связано со спин-спиновыми взаимодействиями между спиновыми метками (либо спин-обменными, либо магнитными диполь-дипольными взаимодействиями). Эффект не велик, но, тем не менее, превышает экспериментальную погрешность.

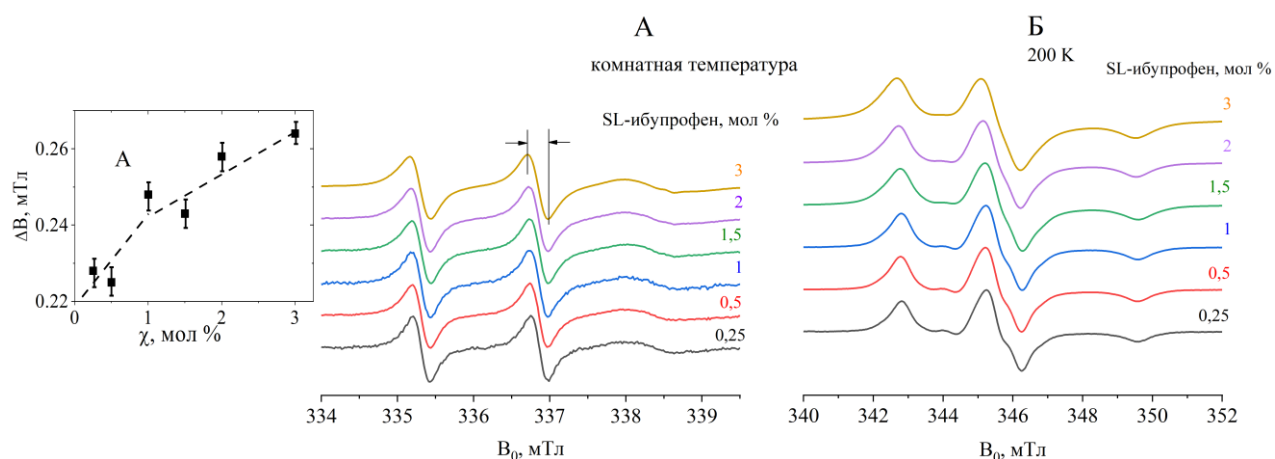


Рисунок 50. Стационарные спектры ЭПР для различных концентраций SL-ибупрофена в бислое POPC. А – при комнатной температуре, Б – при 200 К. На вставке показана зависимость ширины центральной компоненты от концентрации при комнатной температуре, пунктирная линия нанесена для наглядности

Форма спектров, снятых при охлаждении, характерна для иммобилизованных нитроксильных радикалов. Ширина спектров здесь, по крайней мере, в четыре раза больше, чем при комнатной температуре. Таким образом, она практически нечувствительна к спин-спиновым взаимодействиям, которые, вероятно, будут увеличиваться с ростом концентрации.

Полученные спады сигнала ДЭЭР показаны на Рисунке 51 в полулогарифмических координатах с двумя различными осями абсцисс: t на Рисунке 51 А и $t^{2/3}$ на Рисунке 51 Б. Для сигналов ДЭЭР, показанных на Рисунке 51 А, характерно быстрое начальное затухание, которое происходит в интервале времени $0 < t < 40$ нс, затем это падение сменяется линейным спадом. Можно предположить, что линейность согласуется с теоретическим уравнением (26), если пренебречь быстрым падением в начале. Но это уравнение не обеспечивает количественного описания экспериментальных данных. Значение C_{local} не может быть меньше C_{random} , которая ожидается для случайного пространственного распределения. Значение p_B для SL-ибупрофена было найдено в калибровочном эксперименте ДЭЭР в стеклюющейся при замерзании смеси этанола/метанола (95:5 w/w) (Рисунок П11); это значение оказалось равным 0,22. Тогда из данных на Рисунке 51 А получается, что уравнение (26) для образца 3 мол % приводит к значению C_{local} всего $0,0072 \text{ нм}^{-3}$, что в несколько раз меньше χ . Из этого следует, что трехмерное пространственное распределение не подходит для описания полученных экспериментальных сигналов ДЭЭР.

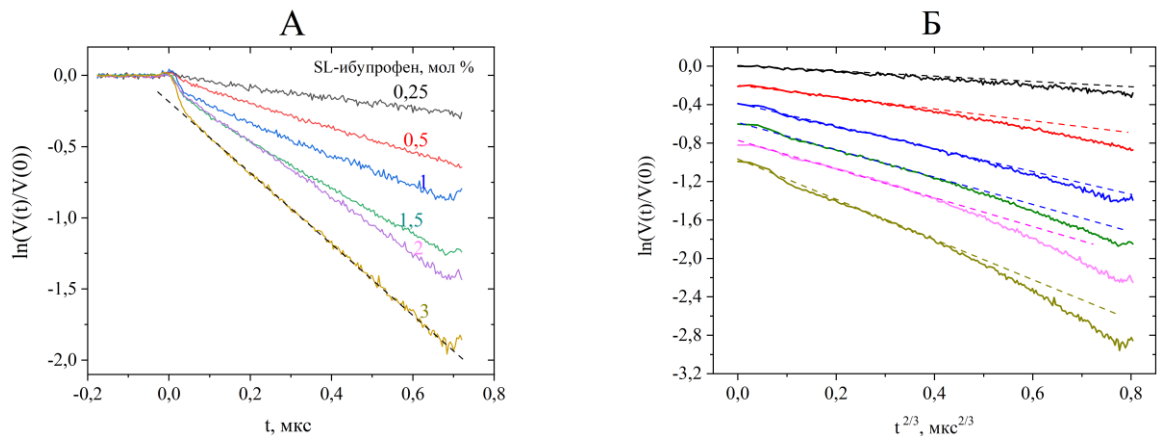


Рисунок 51. Спад сигналов ДЭЭР для SL-ибупрофена в бислое РОРС, полученные для различных молярных концентраций χ . А – данные представлены в зависимости от t ; Б – те же данные в зависимости от $t^{2/3}$. Прямые пунктирные линии представляют линейные аппроксимации

Двумерная модель пространственного распределения является более подходящей для бислоев, поэтому она была применена для спин-меченого ибупрофена в бислое РОРС. Экспериментальные данные, полученные в нашей предыдущей работе [203], а также литературные данные метода молекулярной динамики [75, 83, 87] показывают, что молекула ибупрофена располагается почти у поверхности мембраны, благодаря своей амфифильной структуре. В рамках данного исследования уравнение (27) было уточнено Дзюбой С. А. [204]:

$$V_{2D}(t) = \exp\left(-3,37\sigma_p b \left(\frac{g^2 \beta^2 t}{\hbar}\right)^{2/3}\right). \quad (32)$$

Экспериментальные данные ДЭЭР приведены на Рисунке 51 Б в зависимости от $t^{2/3}$ для сравнения теоретическим уравнением (32) для двумерного пространственного распределения. Для данных, представленных на Рисунке 51 Б, не наблюдается быстрого начального спада по сравнению с данными на Рисунке 51 А. Однако экспериментальные данные нелинейны, что можно объяснить межплоскостным взаимодействием между спиновыми метками в двух противоположных слоях бислоя. Также нелинейность для этого случая была показана в моделировании, проведенном в работе [189]. В данном случае уравнение для двумерного пространственного распределения не может быть применено напрямую. Моделирование для межплоскостного взаимодействия предсказывает нулевой наклон при малых временных задержках для временной зависимости сигнала ДЭЭР, поэтому линейная аппроксимация начального наклона на Рисунке 51 Б может быть непосредственно использована для применения уравнения (32). На Рисунке 51 Б эти начальные линейные зависимости показаны пунктирными линиями.

На Рисунке 52 показаны рассчитанные значения σ_{local} , полученные из линейных аппроксимаций начального наклона данных на Рисунке 51 Б в зависимости от содержания спин-меченого ибупрофена χ . Данные представлены в единицах нм^{-2} . Пунктирная линия соответствует функции $\sigma_{random} = 0,01\chi/A_L$, которая предполагается для случайного двумерного пространственного распределения. A_L — площадь, приходящаяся на липид ($\sim 0,60 \text{ нм}^2$). Из данных, приведенных на Рисунке 52 можно сделать вывод, что во всех случаях $\sigma_{local} \geq \sigma_{random}$, соответственно, модель двумерного случайного распределения спинов не противоречит экспериментальным данным. Также для $\chi < 1$ мол % σ_{local} в два раза больше, чем σ_{random} . Это превышение свидетельствует о неоднородности пространственного распределения молекул спин-меченого ибупрофена. При $\chi > 2$ мол % достигается примерное равенство σ_{local} и σ_{random} , то есть пространственное распределение SL-ибупрофена в бислое становится ближе к случайному. Обнаруженная концентрационная зависимость может быть объяснена следующей моделью. При $\chi < 1$ мол % молекулы SL-ибупрофена образуют кластеры, которые появляются поочередно в двух противоположных слоях бислоя. Это пространственное распределение можно схематически представить, как шахматную шкатулку или коробку, как показано на Рисунке 53. Тогда в каждом слое бислоя локальная поверхностная концентрация σ_{local} будет в два раза больше по сравнению со случайным пространственным распределением. При больших $\chi > 2$ мол % эти кластеры разрушаются, и пространственное распределение становится однородным. Подобный эффект превышения локальной концентрации над средней в два раза уже наблюдался ранее в данной работе для спин-меченых молекул стеариновой кислоты в бислое POPC [189].

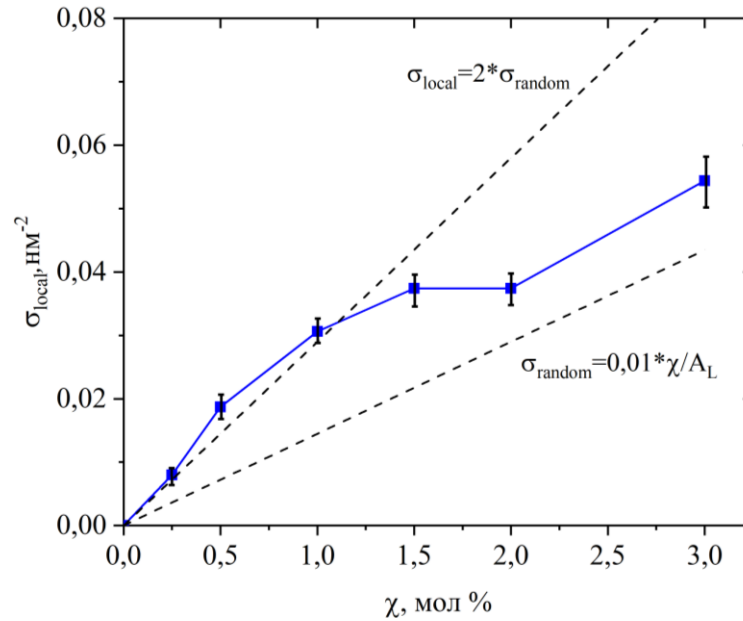


Рисунок 52. Локальная поверхностная концентрация SL-ибупрофена σ_{local} в бислое POPC как функция молярной концентрации χ (синие квадраты). Данные приведены в нм^{-2} . Пунктирная линия представляет функцию $\sigma_{random} = 0,01\chi/A_L$, которую можно ожидать для полностью случайного пространственного распределения

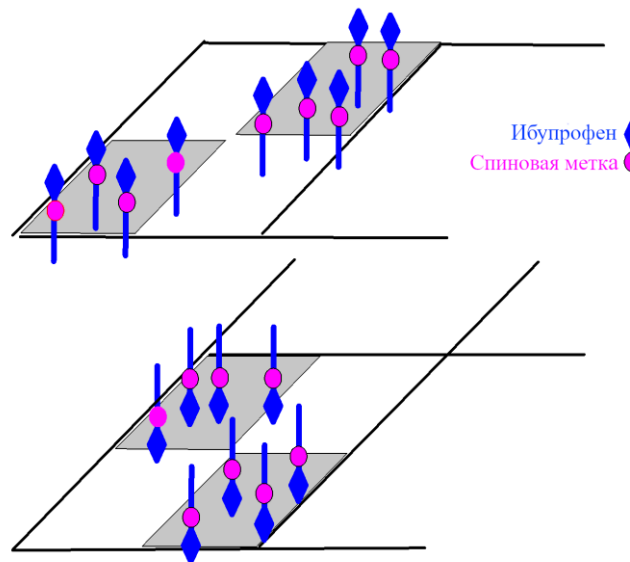


Рисунок 53. Схематическая модель кластеризации спин-меченого ибупрофена «шахматная шкатулка». Кластеры состоят из подкластеров, чередующихся в двух противоположных листках бислоя

Максимально достижимая поверхностная концентрация в кластере составляет около 2 мол %, что позволяет оценить характерное расстояние между молекулами SL-ибупрофена в кластере как $\sqrt{A_L/0,02} \approx 5$ нм. Концентрационная зависимость на Рисунке 52 напоминает ту, что приведена на вставке к Рисунку 50 А для ширины линии стационарного ЭПР при комнатной температуре: ширина линии ЭПР здесь также резко возрастает при $\chi < 1$ мол %, а при большем χ возрастание становится медленнее. Поэтому можно предположить, что пространственная неоднородность, наблюдаемая ДЭЭР в замороженных образцах, отражает то, что происходит при физиологических температурах. Данные СВ ЭПР, взятые отдельно, не могут служить источником информации об этой гетерогенности из-за невыраженности эффекта и возможности других объяснений (диполь-дипольное или обменное взаимодействие).

В нашем предыдущем исследовании [203] было обнаружено, что при малых концентрациях спин-меченого ибупрофена в мембране POPC, когда $\chi = 0,25$ мол %, наиболее сильный эффект наблюдается для протонов терминальных CH_3 -групп липидов, то есть ибупрофен локализуется преимущественно в центре бислоя. При увеличении этой концентрации молекула смещается ближе к поверхности мембраны, а его распределение становится более равномерным. Вполне вероятно, что это изменение в распределении спин-меченого ибупрофена может быть связано с его самосборкой в мембране, которая, как установлено, происходит поочередно в двух противоположных листках бислоя.

Таким образом, проведенное в данной работе исследование ДЭЭР для SL-ибупрофена в модельной липидной мембране позволило получить информацию о наноразмерном пространственном распределении этих молекул. Полученные результаты согласуются с теорией двумерного случайного распределения спинов. Поэтому можно сделать вывод, что молекулы спин-меченого ибупрофена располагаются в двух плоскостях в двух противоположных листках бислоя. Сравнение с теорией позволило получить поверхностные концентрации SL-ибупрофена. Для средних молярных концентраций χ менее 1 мол % эти концентрации оказались в два раза выше χ . Такое увеличение можно объяснить поочередной сборкой спин-меченого ибупрофена в двух противоположных листках бислоя. Максимально достижимая поверхностная концентрация в сборке составляет около 2 мол %, когда χ превышает 2 мол %, кластеры исчезают, и распределение SL-ибупрофена становится случайным.

Результаты, обсуждаемые в данном разделе, приведены в работе [204].

5.3.2. Наноразмерное пространственное распределение диклофенака в липидном бислое

Стационарные ЭПР спектры, полученные для различных концентраций SL-диклофенака в мембране РОРС представлены на Рисунке 54. При комнатной температуре форма спектров типична для нитроксильных радикалов, встроенных в липидный бислой – см. Рисунок 54 А. При этом спектры практически не изменяются при увеличении концентрации. Спектры, снятые при охлаждении, имеют характерную для иммобилизованных нитроксильных радикалов в мембране форму – см. Рисунок 54 Б. Спектр уширяется с увеличением концентрации, а его амплитуда падает из-за диполь-дипольного взаимодействия между спиновыми метками.

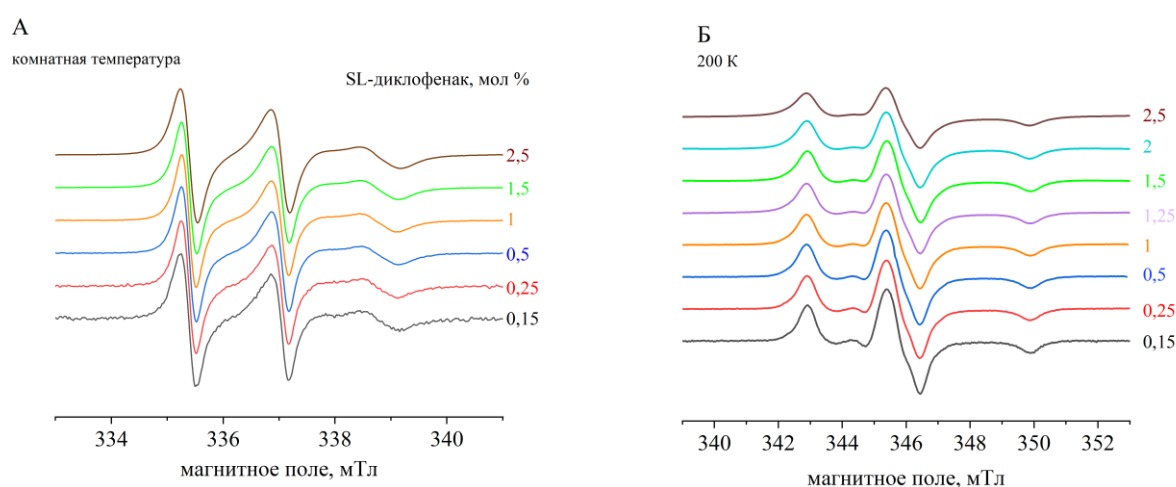


Рисунок 54. Спектры СВ ЭПР, полученные для различных концентраций SL-диклофенака в мембране РОРС. А – данные получены при комнатной температуре, Б – при 200 К

Временные спады сигнала ДЭЭР при температуре 80 К для спин-меченого диклофенака в мембране РОРС показаны на Рисунке 55. Данные получены в зависимости от различных временных задержек между импульсами, формирующими эхо t . Эксперимент с несколькими временными задержками t был проделан для проверки возможного влияния диполь-дипольного взаимодействия на затухание сигнала эха для наблюдаемых спинов А, которое может проявляться при высокой концентрации спиновых меток [205]. Полученные данные показаны на Рисунке 55. Из данных на Рисунке 55 следует, что при высоком значении молярной концентрации χ такая зависимость действительно имеет место: сигнал ДЭЭР затухает быстрее с уменьшением t . Причиной такой зависимости является интерференция дополнительного дипольного пути, возникающего для детектируемых спинов (спинов А). При высокой концентрации спинов в образце, возникает эффект «мгновенной диффузии». Этот эффект приводит к более быстрому затуханию эха для близко расположенных спинов, так что при больших t спины с большим расстоянием между ними вносят основной вклад в сигнал эха. Тогда затухание сигнала ДЭЭР

при больших τ действительно должно быть медленнее, чем при малых τ . Такая зависимость от τ является «паразитным» эффектом, поскольку приводит к потере наблюдаемых спинов. Поэтому значение τ должно быть достаточно малым, чтобы этой зависимостью можно было пренебречь. В данном случае это происходит при τ около 300 нс.

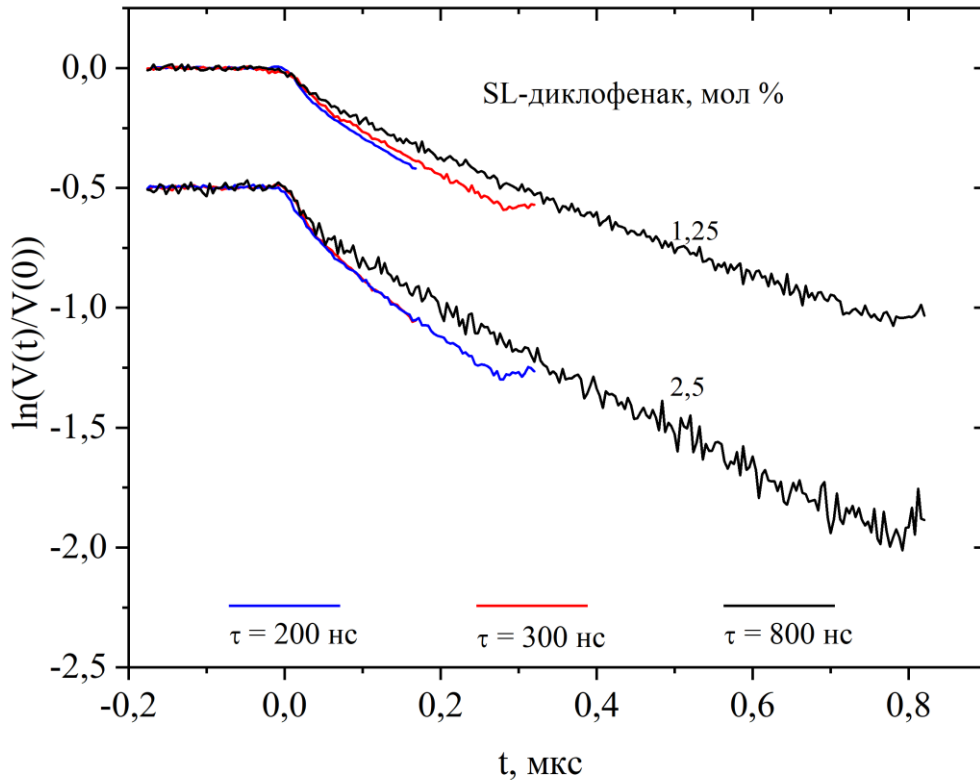


Рисунок 55. Полулогарифмический график данных ДЭЭР для SL-диклофенака в бислое РОРС, полученный для различных молярных концентраций χ и для различных временных задержек τ

Экспериментальные данные ДЭЭР для временной задержки $\tau = 300$ нс показаны на Рисунках 56 А для трехмерной и 56 Б для двумерной моделей пространственного распределения. Для того чтобы выбрать модель пространственного распределения, необходимо изучить зависимость сигнала ДЭЭР от времени. Трехмерная модель может быть описана теоретическим уравнением (26) с экспоненциальной зависимостью от времени t , двумерная модель – уравнением (32) с экспоненциальной зависимостью от $t^{2/3}$. Согласно этим двум моделям выбраны оси абсцисс на этих двух рисунках.

Локальные объемные и поверхностные концентрации в первом и втором случаях можно найти, если известен параметр r_B для калибровочного образца. Его значение для спин-меченого диклофенака в стеклующейся смеси этанола и метанола (95:5 w/w) оказалось равным 0,25 – см. Рисунок П12 в Приложении. Для спадов, представленных на Рисунке 56 А, характерно быстрое начальное падение сигнала, происходящее в отрезке времени $t < 40$ нс. Такое затухание сигнала

не описывается теоретическим уравнением (26). Если произвести расчет в рамках трехмерной модели для последующего линейного спада, то получатся значения локальных объемных концентраций, которые на порядок меньше средних концентраций. Соответственно, трехмерная модель количественно не описывает экспериментальные данные ДЭЭР для SL-диклофенака в мембране РОРС. Данные на Рисунке 56 Б демонстрируют хорошее согласие с линейными зависимостями от $t^{2/3}$, что предполагает соответствие теоретическому уравнению (32) для двумерного пространственного распределения.

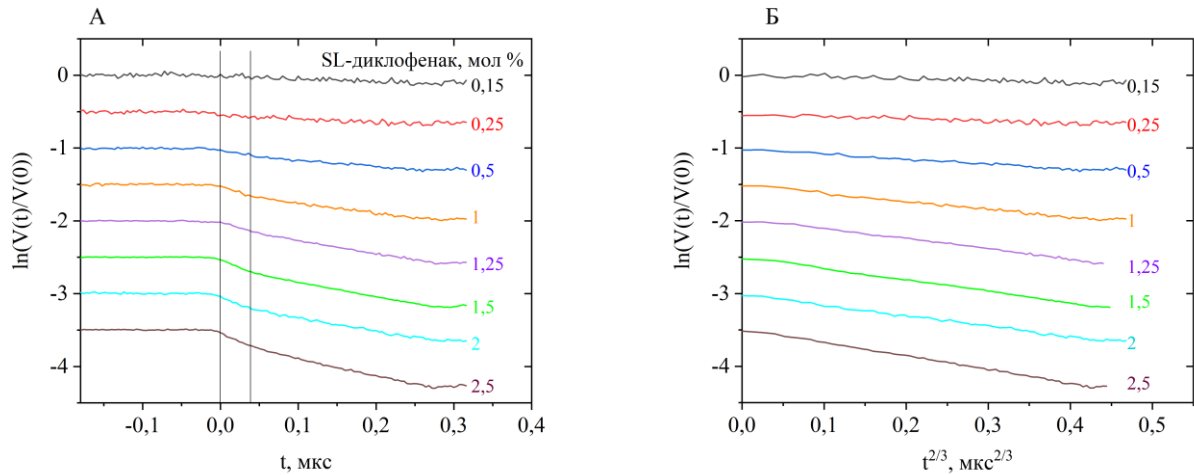


Рисунок 56. Экспериментальные данные ДЭЭР для различных концентраций SL-диклофенака в модельной мембране РОРС. А – данные представлены в зависимости от t ; Б – те же данные в зависимости от $t^{2/3}$. Прямые линии выделяют временной участок $t < 40$ нс

В рамках двумерной модели были посчитаны локальные поверхностные концентрации σ_{local} . Полученные данные количественно не противоречат эксперименту. На Рисунке 57 представлены найденные локальные поверхностные концентрации в зависимости от среднего содержания SL-диклофенака χ . Данные приведены в единицах нм^2 . На Рисунке 57 также приведена функция для случайного пространственного распределения $\sigma_{random} = 0,01\chi/A_L$. A_L – площадь, приходящаяся на липид. В бислое РОРС принимается равной $\sim 0,60 \text{ нм}^2$. Эта зависимость ожидается для случайного пространственного распределения молекул спин-меченого диклофенака. σ_{local} превышает σ_{random} в случае молярных концентрация $\chi < 2$ мол %. Такое превышение однозначно подразумевает кластеризацию молекул. Также можно отметить, что при малых $\chi < 1$ мол % σ_{local} близка к $2\sigma_{random}$. Подобное ранее наблюдалось в данной работе для различных типов спин-меченых молекул в бислое РОРС [189, 204] и было объяснено чередующейся в двух противоположных листках бислоя кластеризацией (модель шахматной шкатулки). Для $\chi \geq 1$ мол % это чередование нарушается, кластеры разрушаются, и распределение становится ближе к равномерному. Физическая природа этих особенностей кластеризации в настоящее время неясна. Можно лишь констатировать факт, что чередующаяся кластеризация

подразумевает, что молекулы SL-диклофенака, которые появляются в одном слое бислоя, мешают их появлению в противоположном слое, однако это ограничение снимается при высоких концентрациях препарата.

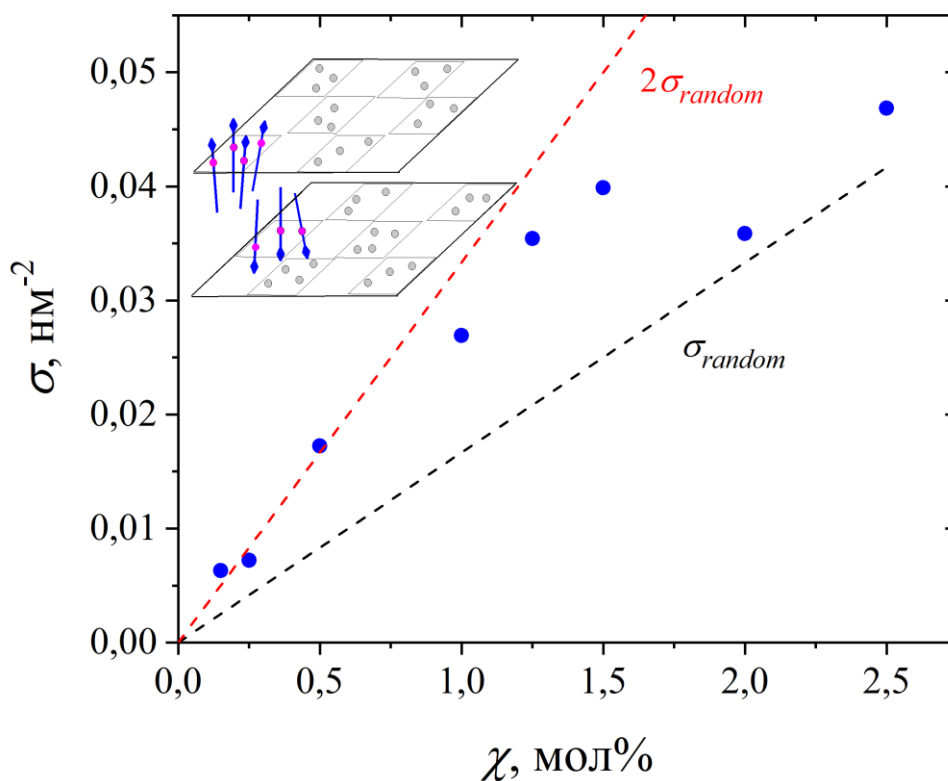


Рисунок 57. Локальная поверхностная концентрация SL-диклофенака в бислое РОРС в зависимости от его молярной концентрации χ . Две пунктирные линии представляют зависимость $\sigma_{random} = 0,01\chi/A_L$, ожидаемую для случайного пространственного распределения и его удвоенную версию, $2\sigma_{random}$. На вставке показана модель чередующейся кластеризации спин-меченого диклофенака в двух противоположных листках бислоя

Таким образом, полученные в данном разделе результаты для SL-диклофенака указывают на кластеризацию его молекул в мембране РОРС. Кластеризация происходит в виде поочередной сборки в двух противоположных листках бислоя со случайным двумерным пространственным распределением внутри кластеров.

Результаты, обсуждаемые в данном разделе, приведены в работе [206].

5.4. Заключение к главе 5

С помощью ЭПР-спектроскопии спиновых меток были исследованы наноразмерное пространственное распределение, кластеризация и локализация НПВП спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельных фосфолипидных мембранах разных типов.

В результате данного исследования обнаружено формирование в мембранах нанокластеров SL-ибупрофена и SL-диклофенака, выявлены особенности их пространственного распределения. В частности, было показано, что их пространственное распределение в мембране РОРС ближе к двумерному, а модель кластеризации напоминает «шахматную шкатулку» с попеременным чередованием кластеров в противоположных листках бислоя. Такая модель подразумевает, что кластеры спин-меченых молекул, появляющиеся в одном листке бислоя, предотвращают их появление в противоположном листке бислоя. Однако, это ограничение снимается при высоких концентрациях спин-меченых молекул ($\chi > 1$ мол %). Данный результат согласуется с полученными нами ранее данными о кластеризации спин-меченых молекул стеариновой кислоты в бислое РОРС [188].

6. НАНОРАЗМЕРНОЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И КЛАСТЕРИЗАЦИЯ СПИН-МЕЧЕННЫХ МОЛЕКУЛ ИБУПРОФЕНА И ДИКЛОФЕНАКА В ПРИСУТСТВИИ ЛИПИДНЫХ РАФТОВ В МОДЕЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ

6.1. Описание задачи

Липидные рафты – это наноразмерные ансамбли липидов, обогащенные холестерином, и относительно более упорядоченные чем их окружение. Образование рафтов означает разделение мембраны на наноразмерные неупорядоченные и упорядоченные жидкие структуры. Несмотря на большое количество исследований, до сих пор остаются открытыми вопросы о времени жизни липидных рафтов, об их функциях в мембране, об их составе и т.д. Более того, до сих пор ведутся споры и о самом их существовании. Для того чтобы ответить на эти вопросы, требуется больше представлений о наноразмерной латеральной сегрегации в мембранах. Прямая экспериментальная информация о молекулярной структуре липидных и холестериновых комплексов остается скудной, поскольку они являются высокодинамичными, нестабильными и небольшими по размеру доменами. Среди других экспериментальных методов, ЭПР спиновых меток может предоставить информацию на молекулярном уровне. Импульсная ЭПР спектроскопия в варианте двойного электрон-электронного резонанса специально разработана для получения взаимного пространственного распределения спиновых меток в нанометровом диапазоне расстояний. В данной работе исследуется влияние липидных рафтов на наноразмерное пространственное распределение и кластеризацию спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельных фосфолипидных мембранах методом ДЭЭР.

6.2. Образцы

Из-за чрезвычайной сложности реальных биологических мембран часто изучаются простые модельные липидные системы. Липид DOPC включает в себя две ненасыщенные связи, а DPPC состоит из двух полностью насыщенных ацильных цепей. Известно, что в бислоях состава DOPC/DPPC/холестерин могут образовываться наноразмерные жидконеупорядоченные и упорядоченные структуры, называемые липидными рафтами. Однако следует отметить, что такой липидный состав не встречается в реальных клеточных мембранах, поэтому это лишь полезная модельная система.

Модельные мембраны получали из эквимольной смеси липидов DOPC и DPPC, либо из этой же смеси, но с добавлением 0, 10, 20 или 30 мол % холестерина. Таким образом, конечный

липидный состав мембраны выглядел следующим образом: $(0,5-0,5x_{chol})/(0,5-0,5x_{chol})/x_{chol}$. К этим липидам добавляли либо спин-меченый ибупрофен, либо диклофенак в диапазоне концентраций от 0,15 до 2,5 мол %. Для приготовления многослойных липосом все необходимые вещества растворяли отдельно в хлороформе, а затем смешивали в нужных соотношениях. Растворитель упаривали потоком азота. Для удаления остатков хлороформа, образцы находились в вакууме в течение 4 ч. После этого к полученным пленкам добавляли избыток буфера PBS (pH 7,0) в пропорции 10 частей воды на одну часть липида. Затем образцы хранились при комнатной температуре в течение 2 ч, при этом их периодически перемешивали. Для того, чтобы отделить лишнюю воду, образцы центрифугировали при 14000 g в течение 4 мин. После чего удаляли лишнюю воду, оставшуюся на поверхности. В результате соотношение липида к воде составляло 1:3 по массе. Для импульсных ЭПР-экспериментов образцы помещали в стеклянную ампулу с наружным диаметром 3 мм. Для измерений при охлаждении образцы быстро замораживали путем погружения в жидкий азот.

6.3. Результаты и обсуждение

6.3.1. Наноразмерное пространственное распределение и кластеризация спин-меченого ибупрофена в присутствии липидных рафтов

Спектры стационарного ЭПР при комнатной температуре, полученные для различных молярных концентраций SL-ибупрофена в бислоях состава DOPC/DPPC/холестерин, где содержание холестерина варьируется от 0 до 30 мол %, аналогичны спектрам, полученным в данном исследовании для бислоя POPC и приведены на Рисунке П13 в Приложении. Ширина спектральной линии на Рисунке П13 практически не зависит от концентрации и от содержания холестерина. Как и в случае с бислоем POPC, форма этих спектров характерна для замедленного молекулярного движения спиновых меток: высокопольная составляющая имеет меньшую интенсивность относительно других компонент. Данный факт указывает на прямое связывание спин-меченого ибупрофена с мембраной.

Спектры стационарного ЭПР при охлаждении показаны на Рисунке 58. Формы линий этих спектров типичны для иммобилизованных нитроксильных радикалов. Все спектры на Рисунке 58 нормированы на значение второго интеграла по магнитному полю, что означает их приведение к одинаковой общей интенсивности. Из данных на Рисунке 58 следует, что ширина линии увеличивается с концентрацией, это увеличение для нормированных спектров проявляется также в виде падения амплитуд линий, поскольку общая интенсивность спектров сохраняется.

Поскольку молекулярное движение отсутствует, это увеличение ширины линии может быть связано только с диполь-дипольным взаимодействием.

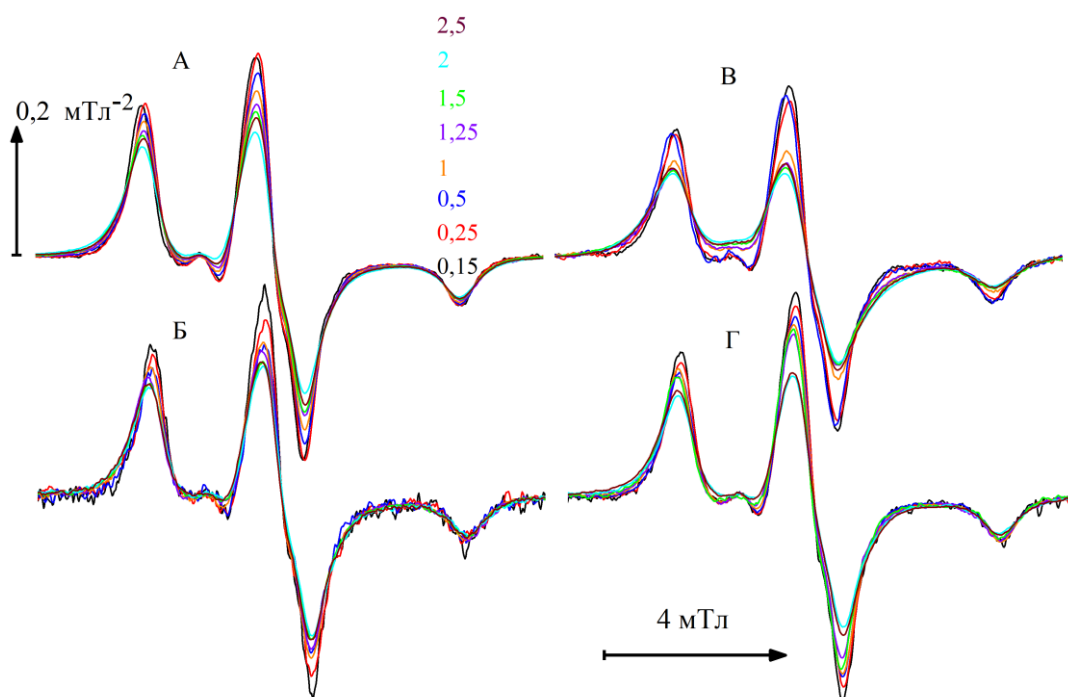


Рисунок 58. Спектры стационарного ЭПР для различных концентраций χ SL-ибупрофена в бислоях DOPC/DPPC/холестерин, полученные при 200 К. А – содержание холестерина составляло 0 мол %, Б – содержание холестерина составляло 10 мол %, В – 20 мол %, Г – 30 мол %. Все спектры нормированы на значение второго интеграла по магнитному полю

Однако получить информацию о диполь-дипольном взаимодействии из этих спектров напрямую сложно, поскольку на их форму может влиять неоднородное уширение из-за сверхтонких взаимодействий с окружающими ядрами и анизотропии g -фактора, тогда как спектроскопия ДЭЭР специально разработана для извлечения чистого вклада диполь-дипольных взаимодействий.

Спады сигнала ДЭЭР были получены в зависимости от различных временных задержек τ для проверки возможного влияния диполь-дипольных взаимодействий на затухание сигнала ЭСЭ для наблюдаемых спинов А – см. Рисунок 59. Данное влияние может проявляться в измерениях при больших концентрациях спинов. Наблюдаемая зависимость от τ может возникнуть из-за взаимодействия между спинами А, эта τ -зависимость является «паразитным» эффектом в измерениях. Влияние взаимодействия спинов А на сигнал ЭСЭ возникает за счет так называемого эффекта «мгновенной спектральной диффузии». Этот эффект может возникнуть, когда взаимная ориентация спин-меченых молекул коррелирует, он уменьшается с уменьшением τ . Стоит

отметить, что корреляция ориентаций предполагает образование ориентационно-упорядоченной структуры.

Поэтому этого эффекта можно избежать, выбрав достаточно малое τ . При содержании холестерина $x_{хол} = 0$ мол % (Рисунок 59 А) и $x_{хол} = 10$ мол % (Рисунок 59 Б) спады не зависят от τ , в то время как для $x_{хол} = 20$ мол % (Рисунок 59 В) и $x_{хол} = 30$ мол % (Рисунок 59 Г) при концентрации SL-ибупрофена ≥ 1 мол % появляется зависимость от τ . Данная зависимость имеет тенденцию исчезать во всех случаях для $\tau = 200$ нс (разница между случаями $\tau = 200$ нс и $\tau = 300$ нс незначительна). Так как эта зависимость является «паразитным» эффектом в измерениях, при содержании холестерина $x_{хол} = 20$ мол % и $x_{хол} = 30$ мол %, анализируются данные только для $\tau = 200$ нс.

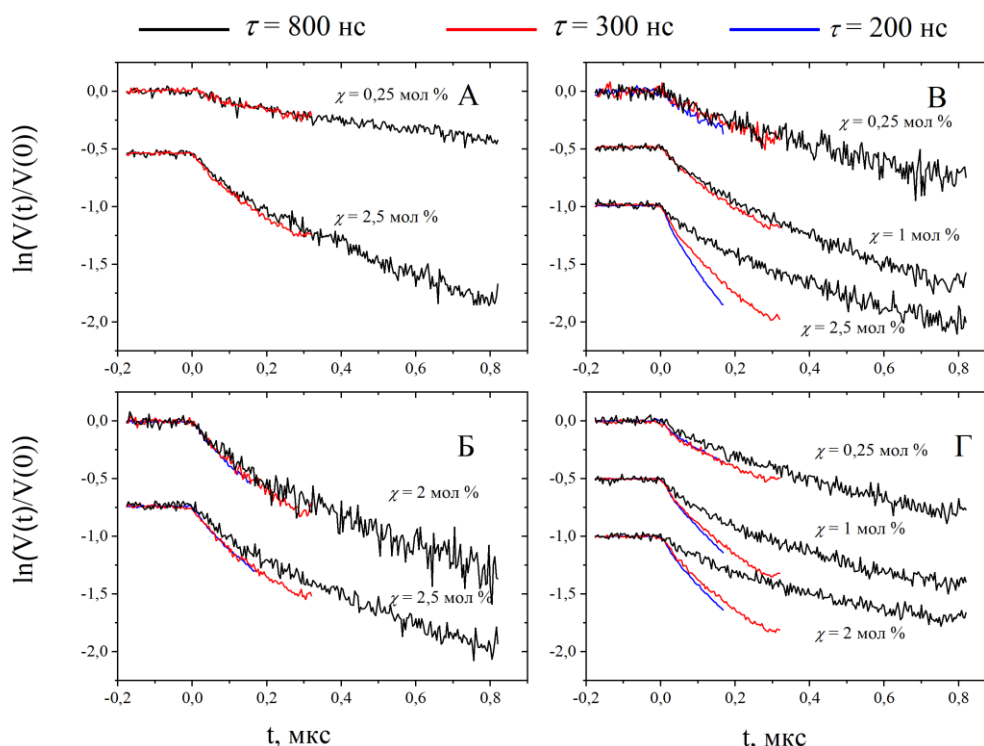


Рисунок 59. Полулогарифмический график трехимпульсных исходных данных ДЭЭР для SL-ибупрофена в бислоях состава DOPC/DPPC/холестерин, полученный для различных молярных концентраций SL-ибупрофена χ и для различных задержек τ . А – содержание холестерина $x_{хол} = 0$ мол %, Б – 10 мол %, В – 20 мол % и Г – 30 мол %

Еще одной особенностью данных на Рисунке 59 является их нелинейность (для $t > 0$), что не согласуется с теоретическим уравнением (26) для трехмерного пространственного распределения спиновых меток. Можно предположить, что для спин-меченого ибупрофена в мембране DOPC/DPPC/холестерин будет более уместна двумерная модель, которая является более подходящей для бислоев. Согласно теоретическому уравнению (32), временные спады

сигнала ДЭЭР должны быть линейными при $t^{2/3}$. На Рисунке 60 показан соответствующий полулогарифмический график данных ДЭЭР. Линейность, согласующаяся с теоретическим уравнением, теперь наблюдается для данных на Рисунках 60 А, Б и для данных на Рисунке 60 В и Г при концентрации SL-ибупрофена $\chi < 0,25$ мол %.

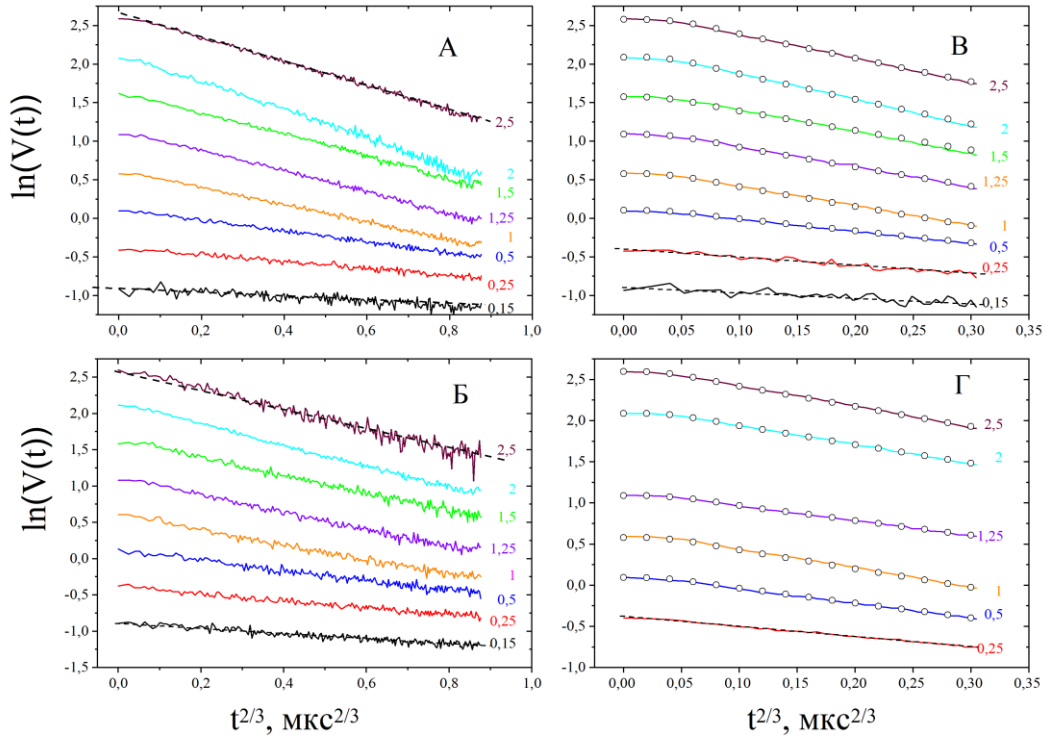


Рисунок 60. Полулогарифмический график экспериментальных трехимпульсных данных ДЭЭР для SL-ибупрофена в бислоях DOPC/DPPC/холестерин в зависимости от $t^{2/3}$. Данные получены для различных молярных концентраций SL-ибупрофена χ . А – содержание холестерина $x_{хол} = 0$ мол %, Б – 10 мол %, В – 20 мол %, Г – 30 мол %. Пунктирные линии представляют собой линейные аппроксимации в соответствии с уравнением (32) для двухмерного пространственного распределения. Пустые круги демонстрируют симуляцию в рамках модели «недоступности» – см. ниже

Однако для содержания холестерина $x_{хол} = 20$ мол % (Рисунок 60 В) и 30 мол % (Рисунок 60 Г) линейность отсутствует. На начальном временном интервале, когда $t^{2/3} < 0,05$ мкс^{2/3} сигнал ДЭЭР затухает медленней, чем при $t^{2/3} > 0,05$ мкс^{2/3}. Такая закономерность также может быть объяснена в рамках двумерной модели, которая, однако, должна модифицироваться путем допущения некоторых дополнительных особенностей пространственного распределения спиновых меток.

Аналогичное начальное замедление затухания сигнала ДЭЭР ранее уже наблюдалось для спин-меченых молекул холестана в модельных мембранах [186]. Это объяснялось квазирегулярным пространственным распределением молекул внутри кластера «сверхрешетки»

с фиксированным параметром решетки. В данной модели спиновые метки располагаются в плоской квадратичной «сверхрешетке». Однако у этой модели есть и некоторые недостатки. Во-первых, для биологических мембран могут подойти и другие распределения, например, гексагональные. А во-вторых, биологические мембраны обязательно должны иметь какую-то нерегулярность, которую сложно учесть в этой модели. Поэтому в данном случае будет использована другая модель, в которой регулярность достигается путем введения некоторого радиуса недоступности R_{min} вокруг каждой спиновой метки [153]. Данная модель подразумевает, что между молекулами со спиновыми метками возникает взаимное отталкивание. Это отталкивание может происходить, например, за счет электростатических взаимодействий или за счет образования сольватационных оболочек вокруг молекул. Эта модель имеет только два свободных параметра: R_{min} и σ_{local} , оба параметра имеют простой физический смысл и могут быть найдены в процессе моделирования. Расчеты в рамках модели «недоступности» проводились следующим образом. Для круга некоторого выбранного радиуса R_{max} из соотношения $N = \pi R_{max}^2 \sigma_{local}$ получалось число N спиновых меток. Эти N молекул случайным образом размещались в процессе Монте-Карло по кругу с ограничением, что любые две из них находятся не ближе R_{min} , а затем уравнение (22) использовалось для расчета сигнала ДЭЭР $V(t)$. Радиус R_{max} был выбран достаточно большим, чтобы конечный результат не зависел от его значения. Расчеты и моделирование проводились Дзюбой С. А.

Результаты данного моделирования приведены на Рисунках 60 В, Г (пустые круги). Наблюдается довольно хорошее согласие между моделированием и экспериментом. В ходе моделирования было установлено, что наиболее подходящие значения R_{min} варьируются в узком диапазоне от 1,25 до 1,45 нм. Эффективность возбуждения p_B в уравнении (22) была получена в калибровочном эксперименте для SL-ибупрофена, растворенного в стеклообразной смеси этанол/метанол (95:5 w:w). Этот параметр оказался равным 0,14. В более ранних исследованиях, проведенных в нашей лаборатории для спин-меченого диклофенака, параметр p_B равнялся 0,22 [204]. Такое различие можно объяснить потерей спиновых меток при хранении. Предполагается, что эта потеря не повлияла на свойства молекулы. Поскольку экспериментальные временные спады ДЭЭР на Рисунках 60 А, Б и для самых низких концентраций χ на рисунках 60 В, Г хорошо подчиняются линейной зависимости, соответствующей теоретическому уравнению (32) для случайного двумерного пространственного распределения спиновых меток, то σ_{local} может быть получена непосредственно из касательных к этим зависимостям.

Также было выполнено моделирование диполь-дипольного уширения в стационарных ЭПР спектрах. При содержании холестерина $x_{хол} = 0$ мол % и 10 мол %, данные ДЭЭР для спин-меченого ибупрофена на Рисунке 60, демонстрируют хорошее согласие с двумерной теоретической моделью, поэтому при их моделировании использовалось уравнение (32). Это

уравнение было подвергнуто Фурье преобразованию с поверхностной концентрацией σ_{local} в качестве параметра моделирования. Рассчитанный результат подвергали математической свертке с формой линии ЭПР для самой низкой концентрации χ , использованной в эксперименте ($\chi = 0,15$ мол %). Для содержания холестерина $x_{хол} = 20$ и 30 мол % вместо уравнения (32) использовалась модель недоступности. Обобщенные результаты этих расчетов приведены на Рисунке 61, где единственным подгоночным параметром была поверхностная концентрация σ_{local} . Полученный результат количественно согласуется с соответствующими экспериментальными данными. Другие примеры спектрального моделирования представлены на Рисунке П14 в Приложении.

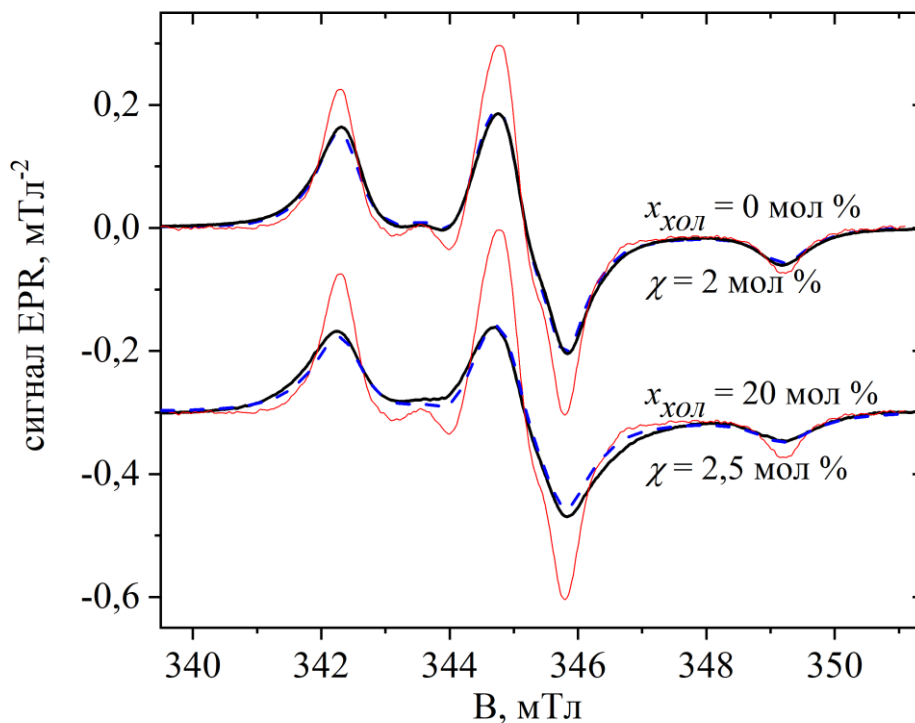


Рисунок 61. Обобщенные результаты моделирования дипольного уширения экспериментальных спектров ЭПР ибупрофена в бислое DOPC/DPPC/холестерин при 200 К. Все спектры нормированы на значение второго интеграла по магнитному полю. Черные сплошные линии – экспериментально полученные спектры, синие пунктирные линии – их наиболее приближенное моделирование, красные сплошные линии соответствуют низкому содержанию спин-меченого ибупрофена $\chi = 0,15$ мол % ($x_{хол} = 0$ мол %) и приведены для сравнения

Однако такое моделирование имеет недостаток: для его корректного применения необходимо знать точную форму линии ЭПР при нулевой концентрации SL-ибупрофена, т.е.

когда $\chi = 0$ мол %. Поскольку эта задача невыполнима, для корректного нахождения σ_{local} требуется некоторая дополнительная информация. На Рисунке 62 представлены значения σ_{local} , полученные в эксперименте ДЭЭР, с использованием либо уравнения (32) для двумерного случайного пространственного распределения, либо модели недоступности, как описано выше. Данные приведены в зависимости от содержания SL-ибупрофена χ . На этом же Рисунке приведены результаты моделирования спектров CW ЭПР с учетом значения σ_{local} , определенного из данных ДЭЭР при наименьшем $\chi = 0,15$ мол % (что составляет $0,015 \text{ нм}^{-2}$ - см. Рисунок 62 А). Наблюдается корреляция между σ_{local} , полученных из спектров CW ЭПР, и σ_{local} , полученных ДЭЭР. Этого стоило ожидать, поскольку на данные ДЭЭР и CW ЭПР влияет один и тот же механизм диполь-дипольного взаимодействия. С другой стороны, CW EPR не дает достоверной информации при низких концентрациях спиновых меток, потому что наблюдаемые эффекты невелики. Поэтому сочетание двух подходов будет оптимальным.

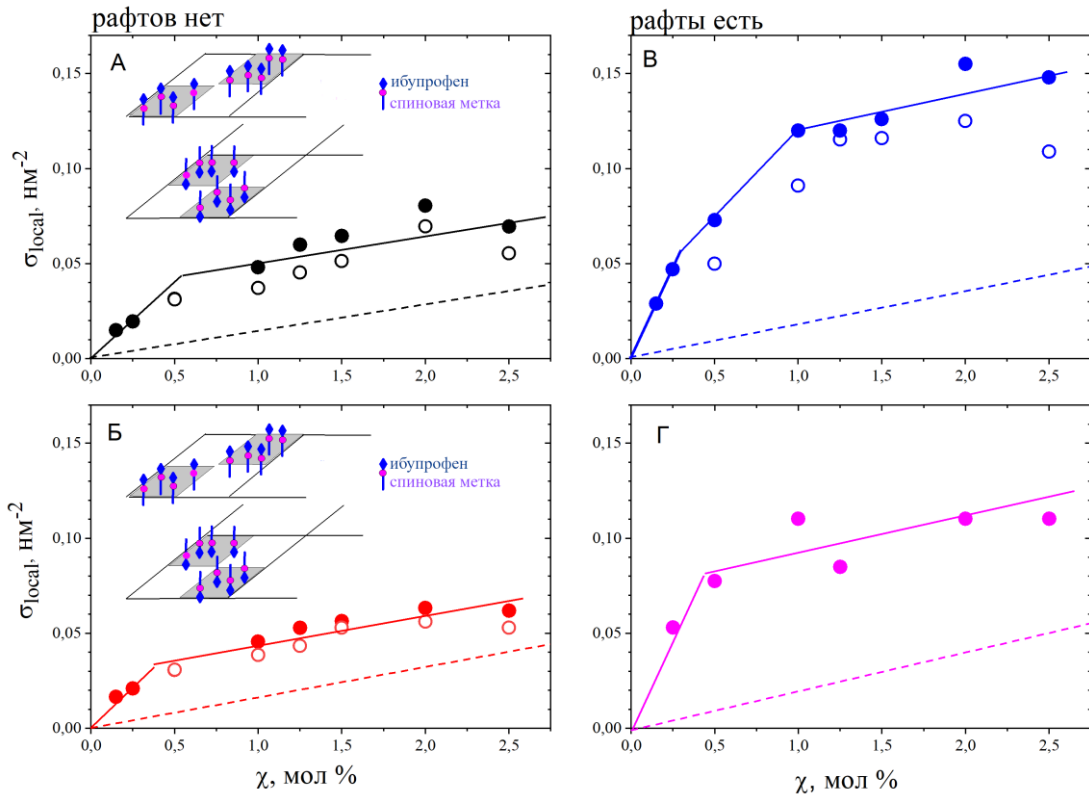


Рисунок 62. Локальная поверхностная концентрация SL-ибупрофена в бислое DPPC/DOPC/холестерин в зависимости от его молярной концентрации χ при различном содержании холестерина. А – 0 мол %, Б – 10 мол %, В – 20 мол %, Г – 30 мол %. Закрашенные круги – значения локальных концентраций, полученных из данных ДЭЭР, пустые круги – из данных CW ЭПР. Сплошные линии нарисованы для наглядности. Пунктирные линии представляют функции $\sigma_{random} = 0,01\chi/A_L$, ожидаемые для случайного пространственного распределения

Пунктирные линии на Рисунке 62 представляют собой функцию $\sigma_{random} = 0,01\chi/A_L$, где A_L – площадь, приходящаяся на липид, которая ожидается для случайного пространственного распределения спиновых меток. Известно, что A_L уменьшается в присутствии холестерина (так называемый конденсирующий эффект холестерина). Для бислоя DPPC, согласно различным литературным источникам, A_L варьируется от 0,63 до 0,71 нм², для бислоя DOPC – от 0,60 до 0,82 нм². В присутствии холестерина A_L уменьшается на ~ 10 % при $x_{хол} = 10$ мол %, на ~ 20 % при $x_{хол} = 20$ мол % и на ~ 30 % при $x_{хол} = 30$ мол % [99, 207]. В расчетах будут использоваться оценки $A_L \approx 0,70$ нм², 0,63 нм², 0,56 нм² и 0,49 нм² для $x_{хол} = 0$ мол %, $x_{хол} = 10$ мол %, $x_{хол} = 20$ мол % и $x_{хол} = 30$ мол %, соответственно. (Стоит отметить, что эти оценки являются лишь грубыми приближениями; кроме того, в данном случае мы пренебрегаем возможным уменьшением A_L при замораживании). Локальные концентрации для спин-меченого ибупрофена в бислое DOPC/DPPC/холестерин во всех случаях превышают σ_{random} – см. Рисунок 62. Этот факт явно указывает на кластеризацию SL-ибупрофена. В отсутствие холестерина и при низком содержании холестерина $x_{chol} = 10$ мол % локальные значения σ_{local} примерно вдвое превышают $0,01\chi/A_L$ (при $\chi < 2$ мол %). Этот результат согласуется с тем, что было обнаружено нами для SL-ибупрофена в бислое POPC [204]. Это было объяснено чередованием кластеров в двух противоположных листках бислоя. При $\chi > 2$ мол % это чередование, по-видимому, нарушается, что также согласуется с данными для бислоя POPC. Из данных на Рисунке 62 В, Г следует, что локальная поверхностная концентрация заметно превышает значение $2\sigma_{random}$. Таким образом, кластеризация здесь, кроме возможного чередования двух листочков, включает в себя еще и сборку молекул в пучки с некоторым разделением между ними. Значения σ_{local} , приведенные на Рисунке 62, позволяют оценить среднее расстояние между спиновыми метками как $1/\sqrt{\sigma_{local}}$. Даже для самого высокого значения σ_{local} (0,15 нм⁻²) это дает оценку ~ 2,6 нм, так что кластеризация спин-меченого ибупрофена опосредована липидами.

Исследование спектров комбинационного рассеяния для бислоев, состоящих из эквимольной смеси DOPC/DPPC и различного содержании холестерина, показало, что в замороженных (170 К) бислоях липидные рафты также замораживаются, когда концентрация холестерина варьируется между 9 и 38 мол % [208]. Эти две границы близки к границам сосуществования неупорядоченной и упорядоченной (т.е. липидных рафтов) фаз при физиологических температурах [111, 209, 210]. При комнатной температуре липидные рафты образуются при концентрации холестерина от 12 до 38 мол % [210]. Таким образом, две концентрации холестерина, использованные в данном исследовании (20 и 30 мол %), определенно попадают в этот диапазон концентраций для образования рафтов.

Из данных на Рисунках 59 и 60 следует, что при $x_{хол} = 20$ и 30 мол % появляются две новые особенности в затухании сигнала ДЭЭР по сравнению со случаями без холестерина или с его

низким содержанием ($x_{хол} = 10$ мол %): во-первых, затухание сигнала ДЭЭР сильно зависит от временной задержки τ , когда она уменьшается с 800 нс до 200 или 300 нс, и, во-вторых, для малых τ сигнал ДЭЭР затухает медленно при малых t и ускоряется при больших t . Этот «ускоряющийся» спад можно смоделировать в рамках модели «недоступности», в которой спиновые метки не могут приблизиться друг к другу ближе, чем на некоторое минимальное расстояние R_{min} . Эта недоступность фактически означает квазирегулярность, которая может появиться внутри рафтов, которые, как известно, являются относительно упорядоченной структурой. Тогда можно предположить, что эти особенности связаны с взаимодействием спин-меченого ибупрофена с липидными рафтами.

Подобная квазирегулярность в липидных рафтах уже наблюдалась в исследованиях взаимодействия спин-меченого холестерина с липидными рафтами в бислое DOPC/DPPC/холестерин. Было высказано предположение, что холестерин может быть окружен насыщенными молекулами DPPC, что может привести к образованию тесных связок холестерин-DPPC (субструктур или субдоменов). Эти субструктуры могут служить платформами для сверхрешетки гостевых молекул, что и наблюдается в данном исследовании. SL-ибупрофен в нашем случае будет погружаться между этими субдоменами, образуя квазирегулярную наноразмерную сверхрешетку – см. Рисунок 63.

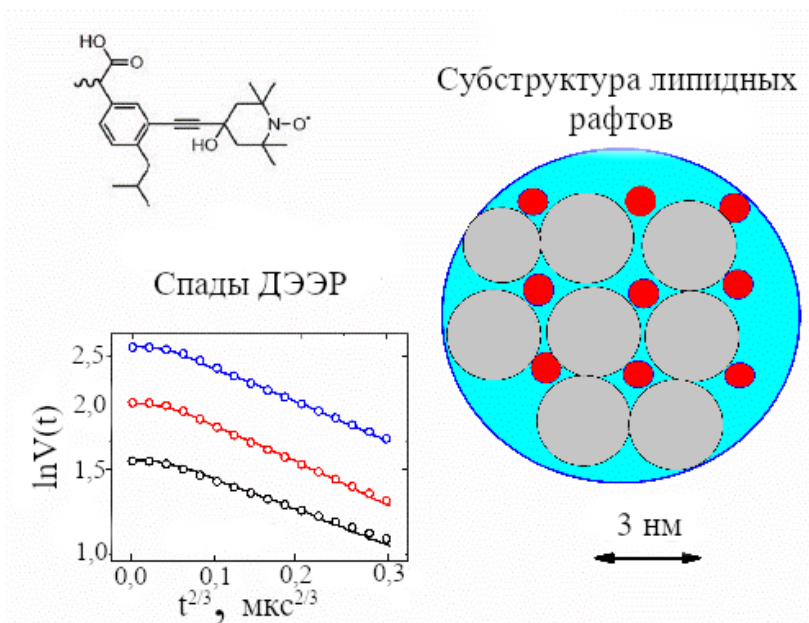


Рисунок 63. Сверху слева – структурная формула спин-меченого ибупрофена, снизу слева – пример спада сигнала ДЭЭР для регулярного пространственного распределения молекул, справа – схематическое изображение субструктуры липидного рафта: красные круги – спин-меченый ибупрофен, большие серые круги – субдомены холестерина с насыщенными молекулами DPPC, которые служат платформами для сверхрешетки гостевых молекул, большой голубой круг – липидный рафт, вид сверху

Субдомены с различными кристаллографическими осями в упорядоченных доменах также были обнаружены в экспериментах по дифракции электронов [211]. Такие субструктуры в локально упорядоченной фазе, почти такого же размера, как и в работе [211], были впервые обнаружены с помощью метода молекулярной динамики для тройных смесей DPPC или пальмитоил-сфингомиелина, DOPC или POPC и холестерина [212, 213]. Было сделано предположение, что ненасыщенные липиды и холестерин связываются с окружающими субдоменами плотно упакованных насыщенных липидов [212-214]. Позже моделирование методом молекулярной динамики [215] показало, что эта субструктуризация опосредует проникновение воды и кислорода через мембраны. В рамках концепции «субструктуризации» можно предположить, что при низких концентрациях SL-ибупрофена, $\chi < 0,5$ мол %, спин-меченый ибупрофен случайным образом занимает возможные места, образованные этими субструктурами в рафте, и сигнал ДЭЭР, таким образом, подчиняется двумерному теоретическому уравнению (32). С увеличением χ спин-меченый ибупрофен занимает все больше и больше доступных мест, что делает его пространственное распределение все более регулярным. Локальная поверхностная концентрация σ_{local} на Рисунках 62 В, Г для $\chi > 0,5$ мол % медленно увеличивается с ростом χ , изменяясь между $0,08 \text{ нм}^{-2}$ и $0,15 \text{ нм}^{-2}$. Среднее расстояние между спиновыми метками оценивается как 3,5 нм и 2,6 нм в этих двух случаях соответственно. Поскольку это значение заметно выше, чем использовавшееся в моделировании значение $R_{min} \approx 1,35 \text{ нм}$, такая оценка означает, что простое квадратное регулярное распределение неприменимо для данного случая. То же самое справедливо и для гексагонального регулярного распределения. Эти средние расстояния могут служить оценкой параметра сверхрешетки молекул SL-ибупрофена.

Итак, в данной работе было показано, что ДЭЭР-спектроскопия спин-меченых гостевых молекул в биологических мембранах может дать информацию о взаимодействии этих молекул с липидными рафтами. Хотя метод ДЭЭР может применяться только в отсутствие молекулярного движения, то есть при низких температурах, обычно ниже 200 К, имеющиеся данные позволяют предположить, что липидные рафты, существующие при физиологических температурах, сохраняются и при замораживании. Для SL-ибупрофена в бислоях DOPC/DPPC/холестерин, изученных в настоящей диссертации, данные CW ЭПР и ДЭЭР указывают на кластеризацию спин-меченого ибупрофена при его концентрации $\chi > 0,1$ мол % и его чередующуюся сборку в двух противоположных листках бислоя в отсутствие холестерина, либо при его низких концентрациях. В присутствии холестерина SL-ибупрофен поглощается липидными рафтами, которые, предположительно, существуют в этой системе при концентрации $x_{хол} > 10$ мол %. Это объяснение основано на наблюдаемом резком изменении в затухании сигнала ДЭЭР для $x_{хол} = 20$ мол % и 30 мол %, которое может быть смоделировано в рамках модели квазирегулярного

пространственного распределения молекул SL-ибупрофена. Кроме того, найденная поверхностная концентрация становится существенно выше по сравнению со случаем, когда $\chi \leq 10$ мол %. Это означает, что кластеризация в данном случае, кроме чередования в двух противоположных листках бислоя, включает в себя еще и сборку молекул в пучки с некоторым разделением между ними. Параметр сверхрешетки, полученный при моделировании, составляет около 3,0 нм. Сам факт такого квазирегулярного пространственного распределения гостевых молекул в биологических мембранах может служить дополнительным аргументом в пользу гипотезы липидных рафтов. Более того, обнаруженная квазирегулярность указывает на то, что липидные рафты имеют внутреннюю субструктуру. Обнаруженные в данном исследовании свойства липидных рафтов могут быть универсальными для различных типов малых молекул лекарств и иметь конкретные терапевтические последствия.

Результаты, обсуждаемые в данном разделе, приведены в работе [216].

6.3.2. Наноразмерное пространственное распределение и кластеризация спин-меченого диклофенака в присутствии липидных рафтов

Стационарные ЭПР-спектры при комнатной температуре, полученные для SL-диклофенака в бислое DOPC/DPPC либо DOPC/DPPC/холестерин, представлены на Рисунке 64 для различных концентраций SL-диклофенака. Форма спектров для всех случаев выглядит похожей и указывает на заторможенное молекулярное движение, типичное для спин-меченых молекул, встроенных в мембрану. При изменении молярной концентрации форма линии меняется незначительно.

На Рисунке 65 показаны спектры стационарного ЭПР при 200 К для SL-диклофенака в бислое DOPC/DPPC либо DOPC/DPPC/холестерин, полученные для различных молярных концентраций χ . В данном случае ширина линии возрастает с увеличением молярной концентрации. Чтобы визуализировать это увеличение, все спектры нормируются на их значения второго интеграла по магнитному полю. При 200 К молекулярное движение замораживается, поэтому увеличение ширины линии в спектрах ЭПР вызвано только диполь-дипольными взаимодействиями. Спектры на Рисунке 65 демонстрируют, что повышение концентрации SL-диклофенака (χ) приводит к значительному уширению линий ЭПР, кроме того, амплитуда линий падает с ростом концентрации. Однако на форму линии, кроме диполь-дипольного взаимодействия, могут влиять также и другие факторы.

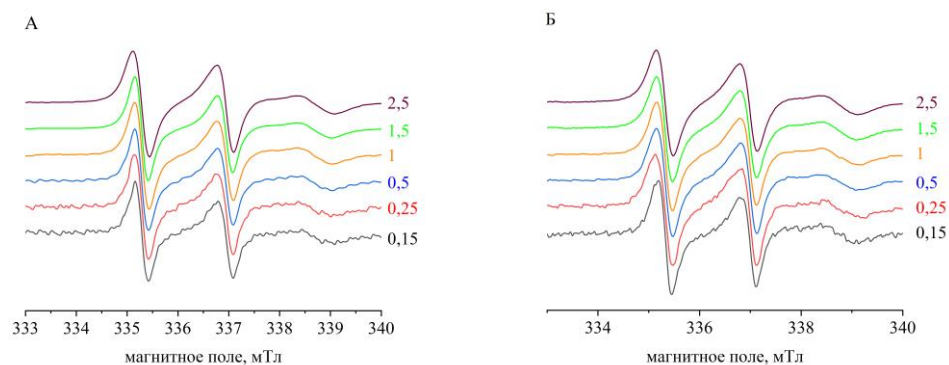


Рисунок 64. Стационарные спектры ЭПР для различных концентраций SL-диклофенака при комнатной температуре: А – в бислое DOPC/DPPC, Б – в бислое DOPC/DPPC/холестерин.

Спектры нормированы на их максимальную амплитуду

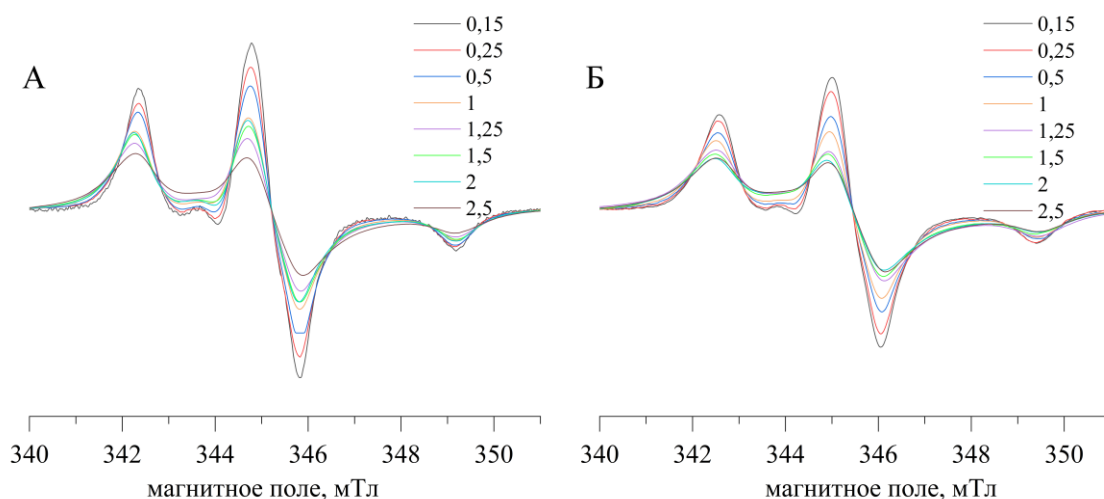


Рисунок 65. Стационарные спектры ЭПР для различных концентраций SL-диклофенака при температуре 200 К: А – в бислое DOPC/DPPC, Б – в бислое DOPC/DPPC/холестерин. Спектры нормированы на значение их второго интеграла по магнитному полю

Для извлечения чистого вклада диполь-дипольного взаимодействия предназначена спектроскопия ДЭЭР. Ранее в нашей работе [216] было показано, что в липидных бислоях временные спады ДЭЭР при высоких концентрациях спин-меченых молекул могут зависеть от временной задержки τ между импульсами, формирующими эхо. Поэтому в данном исследовании также проводились измерения с разными τ . Наиболее показательные результаты этих измерений представлены на Рисунке 66. Из данных на Рисунке 66 следует, что при высоком значении молярной концентрации χ действительно есть τ -зависимость. Сигнал ДЭЭР затухает быстрее с увеличением τ . Причиной такой зависимости является влияние эффекта «мгновенной диффузии» для детектируемых спинов А при их высокой концентрации. Этот эффект приводит к более быстрому затуханию эха для близко расположенных спинов, поэтому при больших τ спины с

большим расстоянием между ними вносят основной вклад в сигнал эха. Тогда затухание сигнала ДЭЭР при больших τ действительно должно быть медленнее, чем при малых τ . Именно этот эффект и наблюдается на Рисунках 66 А и Б. Такая зависимость от τ нежелательна, поскольку приводит к потере наблюдаемых спинов. Поэтому значение τ должно быть достаточно малым, чтобы этой зависимостью можно было пренебречь.

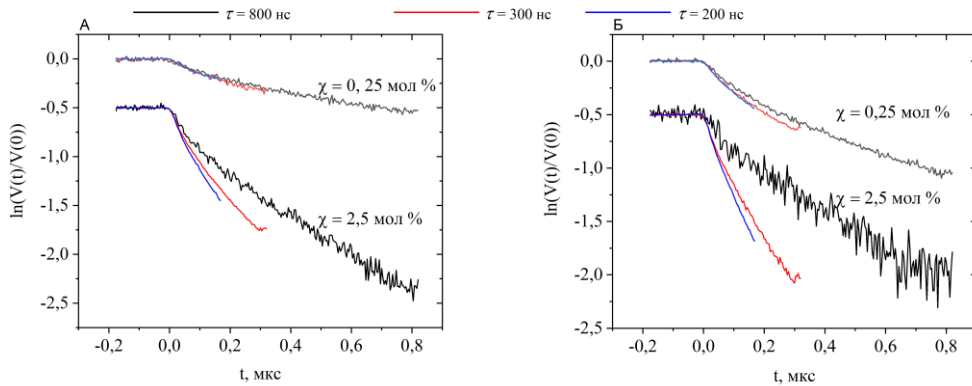


Рисунок 66. Спады сигнала ДЭЭР для SL-диклофенака, полученные для различных молярных концентраций SL-диклофенака χ и для различных задержек τ . А – бислою состава DOPC/DPPC, Б – DOPC/DPPC/холестерин

Из данных Рисунке 66 можно сделать вывод, что это происходит при τ около 200 нс для бислоя DOPC/DPPC и DOPC/DPPC/холестерин. Также можно отметить, что при $t > 0$ появляется нелинейность данных. Это означает, что уравнение (26) не применимо в данном случае. Действительно, двумерное пространственное распределение является более соответствующим для бислоев.

На Рисунке 67 представлены экспериментальные данные ДЭЭР, построенные в координатах $t^{2/3}$, соответствующие двумерному пространственному распределению. Итак, для бислоев DOPC/DPPC и DOPC/DPPC/холестерин наблюдается заметное замедление спадов в начале, когда $t < 0,1^{2/3}$. Нелинейность подобного типа наблюдалась ранее в нашей работе для бислоя DOPC/DPPC/холестерин и спин-меченого ибупрофена [216], а также в работе по исследованию спин-меченого холестана [186] и объяснялась регулярным наноразмерным пространственным распределением молекул при их тесном контакте. Эффект τ -зависимости, возникающий вследствие эффекта «мгновенной диффузии» для наблюдаемых спинов А, имеет ту же физическую основу, что и эффект ДЭЭР – оба они вызываются модуляцией диполь-дипольных взаимодействий микроволновыми импульсами.

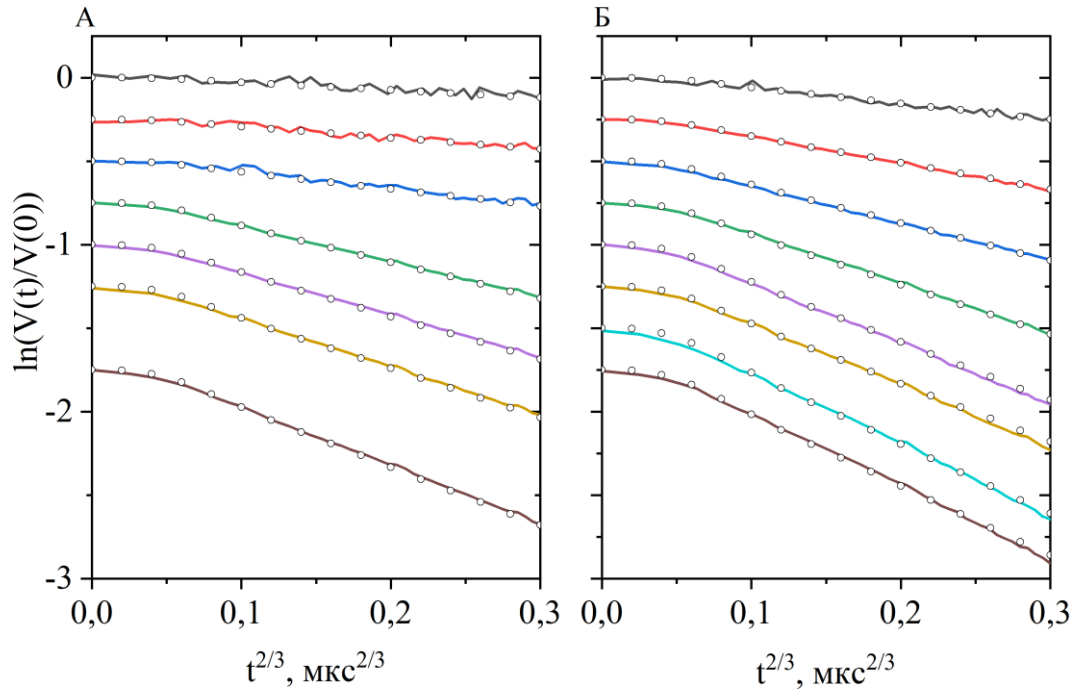


Рисунок 67. Полулогарифмический график трехимпульсных временных спадов ДЭЭР для SL-диклофенака, полученные для различных молярных концентраций χ . А – состав бислоя DOPC/DPPC, Б – DOPC/DPPC/холестерин. Данные построены в зависимости от $t^{2/3}$ для сравнения с уравнением (32). Задержка τ составляет 200 нс. Пустые круги представляют результаты моделирования в рамках модели недоступности – см. ниже

Простое двухимпульсное эхо также, как и ДЭЭР, может быть использовано для извлечения информации о диполь-дипольных взаимодействиях. Однако этот простой подход имеет несколько недостатков – ограничение мертвого времени, вызванное электрон-ядерными взаимодействиями (так называемый эффект ESEEM), а также быстрое затухание сигнала из-за спиновой релаксации. Их можно устранить, разделив друг на друга два временных спада, полученных при разных положениях поля [152]. На Рисунке 68 показан результат такого деления для 2,5 мол % SL-диклофенака в бислое DOPC/DPPC и DOPC/DPPC/холестерин. Временное поведение для этих двух случаев существенно различается. Можно сделать предположение, что объяснение, данное в нашем предыдущем исследовании [216] для спин-меченого ибупрофена, может быть применено и для SL-диклофенака. Модель «недоступности», предложенная в [216], предполагает, что спиновые метки случайным образом распределены в двумерном пространстве, но не могут приблизиться друг к другу ближе, чем на некоторое расстояние R_{min} . Кроме R_{min} , эта модель имеет только один свободный параметр, σ_{local} . Результаты этого моделирования представлены на Рисунке 67 А и Б в виде пустых кружков. R_{min} во всех этих моделированиях был принят равным 1,4 нм. Наблюдается корреляция между экспериментом и моделированием.

Наилучшие значения σ_{local} приведены на Рисунке 69. Расчеты для данной модели проводились Дзюбой С.А.

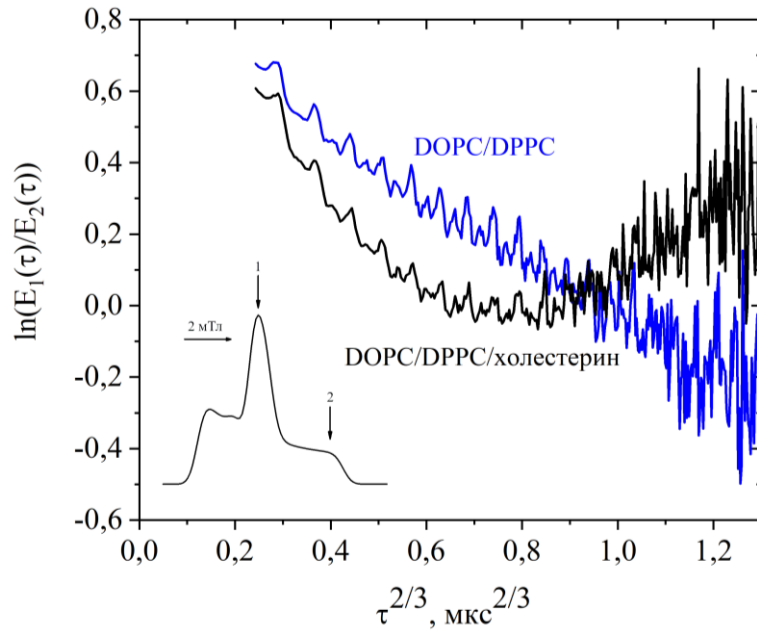


Рисунок 68. Спад мгновенной диффузии для SL-диклофенака в бислоях DOPC/DPPC и DOPC/DPPC/холестерин (логарифмы отношения спадов спинового эха в центральной компоненте спектра к правой компоненте)

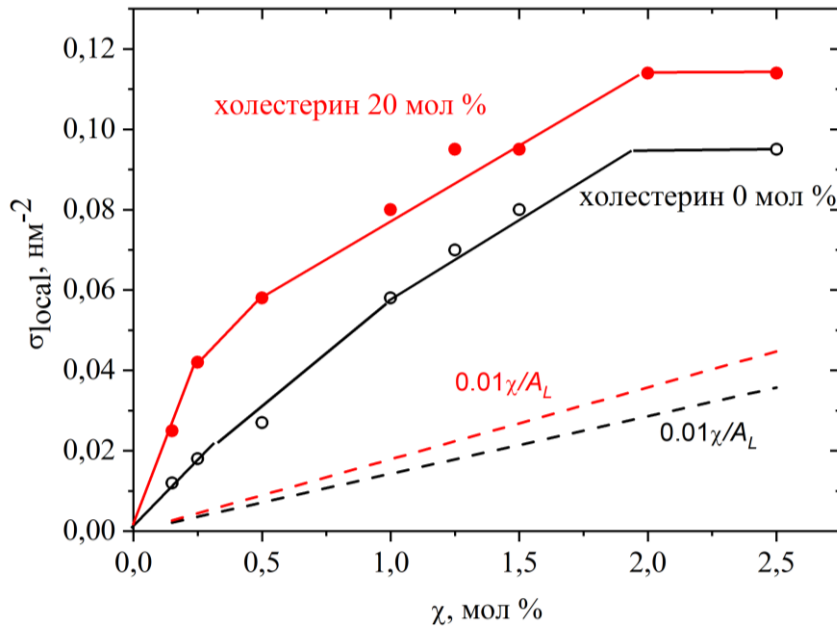


Рисунок 69. Локальная поверхностная концентрация SL-диклофенака в бислое DOPC/DPPC и DOPC/DPPC/холестерин как функция молярной концентрации χ . Сплошные линии проведены для наглядности. Две пунктирные линии представляют функции $\sigma_{local} = 0,01\chi/A_L$, ожидаемые для случайного пространственного распределения в этих двух типах бислоев

Пунктирные прямые линии, проведенные на Рисунке 69, представляют ситуацию для случайного двумерного пространственного распределения спиновых меток в мембране (значения A_L были взяты из работы [216]). Найденные значения σ_{local} лежат значительно выше этой линии, что указывает на кластеризацию спин-меченых молекул. Поведение спадов сигнала ДЭЭР на Рисунке 67 А и Б для бислоя DOPC/DPPC в отсутствие и в присутствии холестерина подобно друг другу. Однако это сходство не обязательно означает схожий характер пространственного распределения, поскольку временной интервал для ДЭЭР, для которого возможно исследование сигнала, слишком мал. Из сходства данных для бислоев DOPC/DPPC и DOPC/DPPC/холестерин можно сделать вывод только о том, что короткодействующая структура окружения в этих двух бислоях практически одинакова. Скорее всего, это окружение образовано насыщенными молекулами DPPC или ненасыщенными молекулами DOPC, охватывающими SL-диклофенак.

Данные двухимпульсного ЭСЭ можно рассматривать как дополнение данных ДЭЭР для больших временных задержек (вместо временной задержки t в ДЭЭР в случае двухимпульсного ЭСЭ временная задержка соответствует τ). Эти данные представлены на Рисунке 68. Поскольку большие временные задержки подразумевают исследование больших расстояний, эти данные показывают, что дальний порядок в бислое DOPC/DPPC и DOPC/DPPC/холестерин существенно различается. Для последнего случая двухимпульсная временная зависимость ЭСЭ очень похожа на ту, что наблюдалась в работе для свободных радикалов гальвиноксила в фуллеренсодержащей полимерной матрице, где такое временное поведение было приписано образованию октаэдрического кластера радикалов [217]. Вероятно, подобная кластеризация наблюдается и в данном исследовании.

Однако детальный анализ временной зависимости двухимпульсного ЭСЭ, а также сопоставление этих данных с результатами ДЭЭР – задача наших будущих исследований. Сейчас можно сделать вывод, что молекулы SL-диклофенака образуют взаимно упорядоченные (нано)кластеры в бислое DOPC/DPPC/холестерин. Эти упорядоченные кластеры образуют некую «сверхрешетку». Среднее расстояние между молекулами SL-диклофенака, оцененное из Рисунка 69, как $(\sigma_{local})^{-1/2}$ при большом χ , составляет около 3 нм. Это значение можно отнести к параметру данной сверхрешетки.

Известно, что бислоем DOPC/DPPC/холестерин, исследуемого молярного состава (0,4:0,4:0,2) образует липидные рафты при физиологических температурах. Также известно, что такая гетерогенность мембраны сохраняется при охлаждении. Тогда данные на Рисунке 66 можно интерпретировать как свидетельство того, что молекулы SL-диклофенака захватываются липидными рафтами. Аналогичный вывод был сделан в работе [216] для спин-меченого ибупрофена в бислое DOPC/DPPC/холестерин того же состава.

Итак, исследование ДЭЭР (моно) спин-меченых молекул позволяет получить информацию об их взаимном пространственном распределении. Полученные результаты для (моно) спин-меченого диклофенака свидетельствуют о его кластеризации в исследованных липидных бислоях. В бислоях DOPC/DPPC и DOPC/DPPC/холестерин структура ближнего радиуса действия, вероятно, образована молекулами DPPC, DOPC и холестерина, охватывающими молекулы SL-диклофенака. Эта связка липидов и холестерина препятствует контакту молекул ближе, чем на 1,4 нм. Полученные данные можно объяснить, предположив, что SL-диклофенак поглощается липидными рафтами, которые, как предполагается, существуют в этой системе даже при низких температурах. Это объяснение основано на данных двухимпульсного эксперимента ЭСЭ, которые выявили особенности, характерные для дальнего порядка спин-меченых молекул. Параметр сверхрешетки, полученный из найденной поверхностной концентрации SL-диклофенака, составляет около 3,0 нм. Наличие такой сверхрешетки указывает на то, что липидные рафты имеют внутреннюю субструктуру. Сравнение и сопоставление данных ДЭЭР и двухимпульсного ЭСЭ является предметом дальнейших исследований, которые, возможно, позволят получить больше информации об этой внутренней субструктуре липидных рафтов.

Результаты, обсуждаемые в данном разделе, приведены в работе [206].

6.4. Заключение к главе 6

Итак, данные ДЭЭР для SL-диклофенака в модельной системе бислоев DOPC/DPPC/холестерин указывают на кластеризацию молекул лекарства. В присутствии холестерина, при его содержании 20 мол %, для которого предполагается формирование липидных рафтов, SL-диклофенак образует квазирегулярные структуры с параметром сверхрешетки около 3,0 нм. Образование квазирегулярных структур можно объяснить захватом SL-диклофенака липидными рафтами. Результаты данного исследования демонстрируют дополнительные доказательства существования липидных рафтов в клеточных мембранах и позволяют получить информацию об их структуре.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

- 1) Методом ДЭЭР получена информация о кластеризации спин-меченых молекул стеариновых кислот в модельных липидных мембранах: формировании кластеров и их структуре, взаимном пространственном распределении молекул в кластерах. Предложена модель кластеризации по типу «шахматной шкатулки» с попеременным чередованием кластеров в двух противоположных слоях бислоя.
- 2) Методом ДЭЭР получена информация о кластеризации спин-меченых молекул НПВП ибупрофена и диклофенака в модельных липидных мембранах. Здесь также оказалась применимой модель «шахматной шкатулки» с попеременным чередованием кластеров в двух противоположных слоях бислоя.
- 3) Методом ДЭЭР показано, что пептид-антибиотик хальципорин в липидной мембране POPC индуцирует латеральную перегруппировку встроенных в нее спин-меченых стеариновых кислот. Причем такая перегруппировка происходит начиная со сверхмалых концентраций пептида ($\sim 0,01$ мол %, или $1/10000$). Предположено, что такое перераспределение свободных жирных кислот и липидов может быть одним из возможных механизмов разрушающего действия пептида-антибиотика хальципорина на мембрану бактерий.
- 4) Методами ESEEM и усиления парамагнитной релаксации в ЯМР установлено, что спин-меченый ибупрофен в отсутствие холестерина локализуется в гидрофобной части модельной мембраны. Причем его локализация зависит от концентрации и липидного состава. Добавление холестерина к модельной мембране POPC приводит к смещению спин-меченого ибупрофена из центра бислоя в положения, более близкие к его поверхности. Спин-меченый диклофенак в такой мембране локализуется около пятого положения ацильной цепи липида.
- 5) Методом ДЭЭР установлено, что в модельной системе DOPC/DPPC/холестерин при содержании холестерина, для которого предполагается формирование липидных рафтов, спин-меченый ибупрофен и диклофенак образуют квазирегулярные наноструктуры с параметром «сверхрешетки» порядка 3,0 нм. Образование квазирегулярных структур можно объяснить захватом ибупрофена или диклофенака липидными рафтами. С одной стороны, этот факт является дополнительным свидетельством в пользу существования липидных рафтов, с другой – показывает наличие их внутренней наноструктуры.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

АМП – антимикробные пептиды

МАП - мембраноактивные пептиды

СЖК – свободные жирные кислоты

ЦОГ – циклооксигеназа

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ESEEM - метод модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха

ДЭЭР – спектроскопия двойного электрон-электронного резонанса

SL-ибупрофен – спин-меченый ибупрофен

SL-диклофенак – спин-меченый диклофенак

POPC – 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин

CW ЭПР – стационарный ЭПР

DOPC – 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин

DPPC – 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин

CW ЭПР – стационарный ЭПР

П/Л – пептид к липиду

МУРН – малоугловое рассеяние нейтронов

Ac – ацетил

Trp – триптофан

Val – валин

Aib – α -аминоизомасляная кислота

Ala – аланин

Gln – глутамин

Ser – серин

Leu – лейцин

Lol – лейцинол

ТЕМРО – 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил

СТВ – сверхтонкое взаимодействие

ЭСЭ – электронное спиновое эхо

ССИ – сигнал свободной индукции

FRET – Ферстеровский резонансный перенос энергии

TAM – триарилметильный радикал

AP-сайт – апуриновые/апиримидиновые сайты

APЕ1 – AP-эндонуклеаза 1

PRE – Paramagnetic Relaxation Enhancement, усиление парамагнитной релаксации в ЯМР

DHPC – 1,2-дигептаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин

DMPC – 1,2-димеристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин

DSA – doxyl stearic acid, спин-меченая стеариновая кислота

ТОАК – 1-оксил-4-амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-карбоновая кислота

PBS – натрий-фосфатный буфер

NOESY – nuclear Overhauser effect spectroscopy

Chalc-SL – спин-меченый хальципорин

ТЕМРО-РС – 2-олеоил-1-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфо(темпо)холин

DMCO – диметилсульфоксид

NOE – ядерный эффект Оверхаузера

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю, д.ф.-м.н., профессору Дзюбе Сергею Андреевичу, который оказывал неоценимую помощь и поддержку не только на всех этапах работы, но и за ее пределами. Благодаря бесценному опыту и знаниям, которые научный руководитель передал диссертанту, эта работа существует. Кроме того, автор выражает благодарность коллективу лаборатории химии и физики свободных радикалов (ИХКГ СО РАН) за создание дружеской рабочей атмосферы, помощь в любых начинаниях, за полезный и разносторонний опыт, переданный от старших коллег. Отдельно автор благодарит к.ф.-м.н. Голышеву Е. А., которая активно принимала участие в обучении автора, а также давала стоящие советы для развития данной работы; также автор выражает признательность к.ф.-м.н. Селютиной О. Ю. за доступ к приборной базе, который позволил значительно расширить и дополнить данную работу; д.ф.-м.н. Кулику Л. В., к.ф.-м.н. Исаеву Н. П. за то, что всегда были готовы ответить на задаваемые автором вопросы и выразить альтернативное мнение касательно каких-либо спорных моментов в работе; к.ф.-м.н. Сыряминой В. Н. за полезные замечания относительно исследования, а также за переданные автору программы для обработки данных. Особую благодарность автор выражает Российскому Научному Фонду за поддержку данного исследования в рамках проекта 21-13-00025.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. Н. Черенкевич, Г. Г. Мартинович, А. И. Хмельницкий, Биологические мембраны / БГУ: Минск, 2009. – 184 с.
2. H. Watson, Biological membranes // *Essays Biochem.* – 2015. – V. 59. – P. 43-69.
3. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. C. Raff, K. Roberts, P. Walter, J. H. Wilson, T. Hunt, Molecular biology of the cell, Sixth edition / *Garland Science, Taylor and Francis Group*: New York, NY, 2015. – 1464 p.
4. G. Guidotti, The Composition of Biological Membranes // *Arch. Intern. Med.* – 1972. – V. 129, No. 2. – P. 194-201.
5. R. Ventura, I. Martínez-Ruiz, M. I. Hernández-Alvarez, Phospholipid Membrane Transport and Associated Diseases // *Biomedicines.* – 2022. – V. 10, No. 5. – P. 1201.
6. H. Eibl, Phospholipids as Functional Constituents of Biomembranes // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 1984. – V. 23, No. 4. – P. 257-271.
7. R. Dawaliby, C. Trubbia, C. Delporte, C. Noyon, J. M. Ruyschaert, P. Van Antwerpen, C. Govaerts, Phosphatidylethanolamine Is a Key Regulator of Membrane Fluidity in Eukaryotic Cells // *J. Biol. Chem.* – 2016. – V. 291, No. 7. – P. 3658-3667.
8. X. Cheng, J. C. Smith, Biological Membrane Organization and Cellular Signaling // *Chem. Rev.* – 2019. – V. 119, No. 9. – P. 5849-5880.
9. Я. Кольман, К.-Г. Рём, Наглядная биохимия / *Лаборатория знаний*: Москва, 2022. – 509 с.
10. Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин, Биологическая химия / *Медицина*: Москва, 1998. – 704 с.
11. A. Seelig, J. Seelig, Effect of a single cis double-bond on structure of a phospholipid bilayer // *Biochem.* – 1977. – V. 16. – P. 45-50.
12. Р. Геннис, Биомембраны. Молекулярная структура и функции / *Мир*: Москва, 1997. – 624 с.
13. В. Ф. Антонов, А. М. Черныш, Биофизика / *Владос*: Москва, 1999. – 288 с.
14. C. C. C. R. De Carvalho, M. J. Caramujo, The Various Roles of Fatty Acids // *Molecules.* – 2018. – V. 23, No. 10. – P. 2583.
15. B. Mostofian, T. Zhuang, X. Cheng, J. D. Nickels, Branched-Chain Fatty Acid Content Modulates Structure, Fluidity, and Phase in Model Microbial Cell Membranes // *J. Phys. Chem. B.* – 2019. – V. 123, No. 27. – P. 5814-5821.
16. S. S. Funari, F. Barceló, P. V. Escribá, Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes // *J. Lipid Res.* – 2003. – V. 44, No. 3. – P. 567-575.
17. Ю. А. Овчинников, Биоорганическая химия / *Просвещение*: Москва, 1987. – 816 с.

18. A. A. Bahar, D. Ren, Antimicrobial peptides // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2013. – V. 6, No. 12. – P. 1543-1575.
19. S. Riedl, D. Zweytick, K. Lohner, Membrane-active host defense peptides – Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs // *Chem. Phys. Lipids*. – 2011. – V. 164, No. 8. – P. 766-781.
20. D. W. Hoskin, A. Ramamoorthy, Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. – V. 1778, No. 2. – P. 357-375.
21. M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms // *Nature*. – 2002. – V. 415, No. 6870. – P. 389-395.
22. J. M. Conlon, A. Sonnevend, Antimicrobial peptides in frog skin secretions // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – V. 618. – P. 3-14.
23. B. M. Peters, M. E. Shirtliff, M. A. Jabra-Rizk, Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? // *PLoS Pathog.* – 2010. – V. 6, No. 10. – P. e1001067.
24. K. Radek, R. Gallo, Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system // *Semin. Immunopathol.* – 2007. – V. 29, No. 1. – P. 27-43.
25. X. Zhao, H. Wu, H. Lu, G. Li, Q. Huang, LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides // *PLoS One*. – 2013. – V. 8, No. 6. – P. e66557.
26. D. Hultmark, H. Steiner, T. Rasmuson, H. G. Boman, Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* // *Eur. J. Biochem.* – 1980. – V. 106, No. 1. – P. 7-16.
27. R. Bals, X. Wang, R. L. Meegalla, S. Wattler, D. J. Weiner, M. C. Nehls, J. M. Wilson, Mouse beta-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs // *Infect. Immun.* – 1999. – V. 67, No. 7. – P. 3542-3547.
28. H. Jenssen, P. Hamill, R. E. Hancock, Peptide antimicrobial agents // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – V. 19, No. 3. – P. 491-511.
29. C. Walsh, Where will new antibiotics come from? // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2003. – V. 1, No. 1. – P. 65-70.
30. V. Teixeira, M. J. Feio, M. Bastos, Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes // *Prog. Lipid. Res.* – 2012. – V. 51, No. 2. – P. 149-177.
31. J. M. Loeffler, D. Nelson, V. A. Fischetti, Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase // *Science*. – 2001. – V. 294, No. 5549. – P. 2170-2172.
32. X. Г. Мусин, АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ — ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ЗАМЕНА ТРАДИЦИОННЫМ АНТИБИОТИКАМ // *Инфекция и иммунитет*. – 2018. – Т. 8, №. 3. – С. 295-308.

33. F. Costa, I. F. Carvalho, R. C. Montelaro, P. Gomes, M. C. Martins, Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces // *Acta Biomater.* – 2011. – V. 7, No. 4. – P. 1431-1440.
34. J. Wade, F. Lin, M. Hossain, R. Dawson, Chemical synthesis and biological evaluation of an antimicrobial peptide gonococcal growth inhibitor // *Amino acids.* – 2012. – V. 43. – P.
35. N. Papo, Z. Oren, U. Pag, H. G. Sahl, Y. Shai, The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277, No. 37. – P. 33913-33921.
36. Y. Huang, J. Huang, Y. Chen, Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function // *Protein Cell.* – 2010. – V. 1, No. 2. – P. 143-152.
37. L. Pauling, The nature of the chemical bond, / *Cornell University Press*: England, 1960. – 664 p.
38. S. A. Okorochonkov, G. A. Zheltukhina, V. E. Nebol'sin, Antimicrobial peptides: mode of action and perspectives of practical application // *Biomed. Khim.* – 2012. – V. 58, No. 2. – P. 131-143.
39. M. R. Yeaman, N. Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance // *Pharmacol. Rev.* – 2003. – V. 55, No. 1. – P. 27-55.
40. B. Bechinger, The SMART model: Soft Membranes Adapt and Respond, also Transiently, in the presence of antimicrobial peptides // *J. Pept. Sci.* – 2015. – V. 21, No. 5. – P. 346-355.
41. E. S. Salnikov, D. A. Erilov, A. D. Milov, Y. D. Tsvetkov, C. Peggion, F. Formaggio, C. Toniolo, J. Raap, S. A. Dzuba, Location and aggregation of the spin-labeled peptide trichogin GA IV in a phospholipid membrane as revealed by pulsed EPR // *Biophys. J.* – 2006. – V. 91, No. 4. – P. 1532-1540.
42. S. Qian, D. Rai, W. T. Heller, Alamethicin Disrupts the Cholesterol Distribution in Dimyristoyl Phosphatidylcholine–Cholesterol Lipid Bilayers // *J. Phys. Chem. B.* – 2014. – V. 118, No. 38. – P. 11200-11208.
43. V. K. Sharma, S. Qian, Effect of an Antimicrobial Peptide on Lateral Segregation of Lipids: A Structure and Dynamics Study by Neutron Scattering // *Langmuir.* – 2019. – V. 35, No. 11. – P. 4152-4160.
44. E. F. Afanasyeva, V. N. Syryamina, S. A. Dzuba, Communication: Alamethicin can capture lipid-like molecules in the membrane // *J. Chem. Phys.* – 2017. – V. 146, No. 1. – P.
45. E. F. Afanasyeva, V. N. Syryamina, M. De Zotti, F. Formaggio, C. Toniolo, S. A. Dzuba, Peptide antibiotic trichogin in model membranes: Self-association and capture of fatty acids // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2019. – V. 1861, No. 2. – P. 524-531.
46. H. Brückner, H. Graf, Paracelsin, a peptide antibiotic containing alpha-aminoisobutyric acid, isolated from *Trichoderma reesei* Simmons. Part A // *Experientia.* – 1983. – V. 39, No. 5. – P. 528-530.

47. M. R. Hermosa, I. Grondona, E. A. Iturriaga, J. M. Diaz-Minguez, C. Castro, E. Monte, I. Garcia-Acha, Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66, No. 5. – P. 1890-1898.
48. E. Benedetti, A. Bavoso, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, C. Toniolo, G. M. Bonora, Peptaibol antibiotics: a study on the helical structure of the 2-9 sequence of emerimicins III and IV // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1982. – V. 79, No. 24. – P. 7951-7954.
49. B. Biondi, C. Peggion, M. De Zotti, C. Pignaffo, A. Dalzini, M. Bortolus, S. Oancea, G. Hilma, A. Bortolotti, L. Stella, J. Z. Pedersen, V. N. Syryamina, Y. D. Tsvetkov, S. A. Dzuba, C. Toniolo, F. Formaggio, Conformational properties, membrane interaction, and antibacterial activity of the peptaibiotic chalciporin A: Multitechnique spectroscopic and biophysical investigations on the natural compound and labeled analogs // *Biopolymers.* – 2017. – e23083.
50. R. M. Epand, S. Rotem, A. Mor, B. Berno, R. F. Epand, Bacterial Membranes as Predictors of Antimicrobial Potency // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – V. 130, No. 43. – P. 14346-14352.
51. P. Wadhvani, R. F. Epand, N. Heidenreich, J. Bürck, A. S. Ulrich, R. M. Epand, Membrane-Active Peptides and the Clustering of Anionic Lipids // *Biophys. J.* – 2012. – V. 103, No. 2. – P. 265-274.
52. V. N. Syryamina, E. F. Afanasyeva, S. A. Dzuba, F. Formaggio, M. De Zotti, Peptide-membrane binding is not enough to explain bioactivity: A case study // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2022. – V. 1864, No. 9. – P. 183978.
53. J. Pan, S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle, Alamethicin Aggregation in Lipid Membranes // *J. Membr. Biol.* – 2009. – V. 231, No. 1. – P. 11-27.
54. J. R. Vane, R. M. Botting, Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs // *Am. J. Med.* – 1998. – V. 104, No. 3a. – P. 2S-8S; discussion 21S-22S.
55. C. Hawkey, D. Cullen, D. Greenwood, J. Wilson, R. Logan, Prescribing of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in general practice: Determinants and consequences // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 1997. – V. 11. – P. 293-298.
56. Н. А. Шостак, А. А. Клименко, НЕСТЕРОИДНЫЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ – СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ // *Клиницист.* – 2013. – Т. 7, №. 3-4. – С. 53-61.
57. Z. Zhang, F. Chen, L. Shang, Advances in antitumor effects of NSAIDs // *Cancer Manag. Res.* – 2018. – V. 10. – P. 4631-4640.
58. L. J. Hunter, D. M. Wood, P. I. Dargan, The patterns of toxicity and management of acute nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) overdose // *Open Access Emerg. Med.* – 2011. – V. 3. – P. 39-48.

59. M. M. Moreno, P. Garidel, M. Suwalsky, J. Howe, K. Brandenburg, The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2009. – V. 1788, No. 6. – P. 1296-1303.
60. J. R. Vane, R. M. Botting, Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action // *Inflamm. Res.* – 1998. – V. 47 Suppl 2. – P. S78-87.
61. L. J. Crofford, PROSTAGLANDIN BIOLOGY // *Gastroenterol Clin. North Am.* – 2001. – V. 30, No. 4. – P. 863-876.
62. A. Lanas, Improving on our goal to reduce NSAID-induced GI complications: a challenging task? // *Am. J. Gastroenterol.* – 2008. – V. 103, No. 5. – P. 1104-1105.
63. A. Al-Saeed, Gastrointestinal and Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs // *Oman Med. J.* – 2011. – V. 26, No. 6. – P. 385-391.
64. C. Nunes, G. Brezesinski, C. Pereira-Leite, J. L. F. C. Lima, S. Reis, M. Lúcio, NSAIDs Interactions with Membranes: A Biophysical Approach // *Langmuir.* – 2011. – V. 27, No. 17. – P. 10847-10858.
65. B. Cryer, M. Feldman, Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs // *Am. J. Med.* – 1998. – V. 104, No. 5. – P. 413-421.
66. M. Manrique-Moreno, J. Howe, M. Suwalsky, P. Garidel, K. Brandenburg, Physicochemical Interaction Study of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs with Dimyristoylphosphatidylethanolamine Liposomes // *Lett. Drug Des. Discov.* – 2010. – V. 7, No. 1. – P. 50-56.
67. M. Manrique-Moreno, J. Londoño-Londoño, M. Jemioła-Rzemińska, K. Strzałka, F. Villena, M. Avello, M. Suwalsky, Structural effects of the Solanum steroids solasodine, diosgenin and solanine on human erythrocytes and molecular models of eukaryotic membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 1838, No. 1 Pt B. – P. 266-277.
68. M. Manrique-Moreno, F. Villena, C. P. Sotomayor, A. M. Edwards, M. A. Muñoz, P. Garidel, M. Suwalsky, Human cells and cell membrane molecular models are affected in vitro by the nonsteroidal anti-inflammatory drug ibuprofen // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2011. – V. 1808, No. 11. – P. 2656-2664.
69. M. Wood, M. Morales, E. Miller, S. Braziel, J. Giancaspro, P. Scollan, J. Rosario, A. Gayapa, M. Krmic, S. Lee, Ibuprofen and the Phosphatidylcholine Bilayer: Membrane Water Permeability in the Presence and Absence of Cholesterol // *Langmuir.* – 2021. – V. 37, No. 15. – P. 4468-4480.
70. M. N. Giraud, C. Motta, J. J. Romero, G. Bommelaer, L. M. Lichtenberger, Interaction of indomethacin and naproxen with gastric surface-active phospholipids: a possible mechanism for the gastric toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – V. 57, No. 3. – P. 247-254.

71. S. L. Winski, D. E. Carter, Arsenate toxicity in human erythrocytes: characterization of morphologic changes and determination of the mechanism of damage // *J. Toxicol. Environ. Health A*. – 1998. – V. 53, No. 5. – P. 345-355.
72. V. K. Sharma, E. Mamontov, M. Tyagi, Effects of NSAIDs on the nanoscopic dynamics of lipid membrane // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2020. – V. 1862, No. 2. – P. 183100.
73. M. A. Barrett, S. Zheng, G. Roshankar, R. J. Alsop, R. K. R. Belanger, C. Huynh, N. Kučerka, M. C. Rheinstädter, Interaction of Aspirin (Acetylsalicylic Acid) with Lipid Membranes // *PLoS One*. – 2012. – V. 7, No. 4. – P. e34357.
74. M. Suwalsky, J. Belmar, F. Villena, M. J. Gallardo, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka, Acetylsalicylic acid (aspirin) and salicylic acid interaction with the human erythrocyte membrane bilayer induce in vitro changes in the morphology of erythrocytes // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2013. – V. 539, No. 1. – P. 9-19.
75. A. Khajeh, H. Modarress, The influence of cholesterol on interactions and dynamics of ibuprofen in a lipid bilayer // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2014. – V. 1838, No. 10. – P. 2431-2438.
76. R. J. Alsop, M. A. Barrett, S. Zheng, H. Dies, M. C. Rheinstädter, Acetylsalicylic acid (ASA) increases the solubility of cholesterol when incorporated in lipid membranes // *J. Soft Matter*. – 2014. – V. 10, No. 24. – P. 4275-4286.
77. M. A. Barrett, S. Zheng, L. A. Toppozini, R. J. Alsop, H. Dies, A. Wang, N. Jago, M. Moore, M. C. Rheinstädter, Solubility of cholesterol in lipid membranes and the formation of immiscible cholesterol plaques at high cholesterol concentrations // *J. Soft Matter*. – 2013. – V. 9, No. 39. – P. 9342-9351.
78. R. J. Alsop, L. Toppozini, D. Marquardt, N. Kučerka, T. A. Harroun, M. C. Rheinstädter, Aspirin inhibits formation of cholesterol rafts in fluid lipid membranes // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2015. – V. 1848, No. 3. – P. 805-812.
79. R. J. Alsop, C. L. Armstrong, A. Maqbool, L. Toppozini, H. Dies, M. C. Rheinstädter, Cholesterol expels ibuprofen from the hydrophobic membrane core and stabilizes lamellar phases in lipid membranes containing ibuprofen // *J. Soft Matter*. – 2015. – V. 11, No. 24. – P. 4756-4767.
80. M. Manrique-Moreno, L. Heinbockel, M. Suwalsky, P. Garidel, K. Brandenburg, Biophysical study of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) ibuprofen, naproxen and diclofenac with phosphatidylserine bilayer membranes // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2016. – V. 1858, No. 9. – P. 2123-2131.
81. K. D. Rainsford, *Ibuprofen: Discovery, Development and Therapeutics / Wiley-Blackwell*, 2015. – 624 p.

82. L. L. Mazaleuskaya, K. N. Theken, L. Gong, C. F. Thorn, G. A. FitzGerald, R. B. Altman, T. E. Klein, PharmGKB summary: ibuprofen pathways // *Pharmacogenet Genom.* – 2015. – V. 25, No. 2. – P. 96-106.
83. J. P. Jämbeck, A. P. Lyubartsev, Exploring the Free Energy Landscape of Solutes Embedded in Lipid Bilayers // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2013. – V. 4, No. 11. – P. 1781-1787.
84. M. B. Boggara, M. Mihailescu, R. Krishnamoorti, Structural Association of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs with Lipid Membranes // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – V. 134, No. 48. – P. 19669-19676.
85. S. Jaksch, F. Lipfert, A. Koutsioubas, S. Mattauch, O. Holderer, O. Ivanova, H. Frielinghaus, S. Hertrich, S. F. Fischer, B. Nickel, Influence of ibuprofen on phospholipid membranes // *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* – 2015. – V. 91, No. 2. – P. 022716.
86. J. Kremkow, M. Luck, D. Huster, P. Müller, H. A. Scheidt, Membrane Interaction of Ibuprofen with Cholesterol-Containing Lipid Membranes // *Biomolecules.* – 2020. – V. 10, No. 10. – P.
87. E. Aloï, B. Rizzuti, R. Guzzi, R. Bartucci, Association of ibuprofen at the polar/apolar interface of lipid membranes // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2018. – V. 654. – P. 77-84.
88. R. Altman, B. Bosch, K. Brune, P. Patrignani, C. Young, Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology // *Drugs.* – 2015. – V. 75, No. 8. – P. 859-877.
89. M. E. Palomo, M. P. Ballesteros, P. Frutos, Analysis of diclofenac sodium and derivatives // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1999. – V. 21, No. 1. – P. 83-94.
90. T. D. Warner, F. Giuliano, I. Vojnovic, A. Bukasa, J. A. Mitchell, J. R. Vane, Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1999. – V. 96, No. 13. – P. 7563-7568.
91. E. Fernandes, T. B. Soares, H. Gonçalves, S. Bernstorff, M. E. C. D. Real Oliveira, C. M. Lopes, M. Lúcio, A Molecular Biophysical Approach to Diclofenac Topical Gastrointestinal Damage // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19, No. 11. – P. 3411.
92. L. M. Lichtenberger, Y. Zhou, E. J. Dial, R. M. Raphael, NSAID injury to the gastrointestinal tract: evidence that NSAIDs interact with phospholipids to weaken the hydrophobic surface barrier and induce the formation of unstable pores in membranes // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2006. – V. 58, No. 11. – P. 1421-1428.
93. A. Basile, K. Ghasemzadeh, Current Trends and Future Developments on (Bio)-Membranes/ *Elsevier*, 2019. – 311-340 p.
94. M. R. Krause, S. L. Regen, The Structural Role of Cholesterol in Cell Membranes: From Condensed Bilayers to Lipid Rafts // *Acc. Chem. Res.* – 2014. – V. 47, No. 12. – P. 3512-3521.

95. M. Sugahara, M. Uragami, X. Yan, S. L. Regen, The Structural Role of Cholesterol in Biological Membranes // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123, No. 32. – P. 7939-7940.
96. S.-T. Yang, A. J. B. Kreutzberger, J. Lee, V. Kiessling, L. K. Tamm, The role of cholesterol in membrane fusion // *Chem. Phys. Lipids.* – 2016. – V. 199. – P. 136-143.
97. F. R. Maxfield, I. Tabas, Role of cholesterol and lipid organization in disease // *Nature.* – 2005. – V. 438, No. 7068. – P. 612-621.
98. N. B. Myant, Cholesterol metabolism // *J. Clin. Pathol. Suppl. (Assoc Clin Pathol).* – 1973. – V. 5. – P. 1-4.
99. W. C. Hung, M. T. Lee, F. Y. Chen, H. W. Huang, The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers // *Biophys J.* – 2007. – V. 92, No. 11. – P. 3960-3967.
100. S. Chakraborty, M. Doktorova, T. R. Molugu, F. A. Heberle, H. L. Scott, B. Dzikovski, M. Nagao, L.-R. Stingaciu, R. F. Standaert, F. N. Barrera, J. Katsaras, G. Khelashvili, M. F. Brown, R. Ashkar, How cholesterol stiffens unsaturated lipid membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2020. – V. 117, No. 36. – P. 21896-21905.
101. J. R. Silvius, Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – V. 1610, No. 2. – P. 174-183.
102. G. L. Nicolson, The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2014. – V. 1838, No. 6. – P. 1451-1466.
103. K. Simons, J. L. Sampaio, Membrane organization and lipid rafts // *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* – 2011. – V. 3, No. 10. – P. a004697.
104. P. J. Quinn, Lipid–lipid interactions in bilayer membranes: Married couples and casual liaisons // *Prog. Lipid Res.* – 2012. – V. 51, No. 3. – P. 179-198.
105. O. G. Mouritsen, Model answers to lipid membrane questions // *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* – 2011. – V. 3, No. 9. – P. a004622.
106. P. J. Quinn, C. Wolf, The liquid-ordered phase in membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1788, No. 1. – P. 33-46.
107. J. Aittoniemi, P. S. Niemelä, M. T. Hyvönen, M. Karttunen, I. Vattulainen, Insight into the putative specific interactions between cholesterol, sphingomyelin, and palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine // *Biophys J.* – 2007. – V. 92, No. 4. – P. 1125-1137.
108. H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J. Peter Slotte, Cholesterol interactions with phospholipids in membranes // *Prog. Lipid Res.* – 2002. – V. 41, No. 1. – P. 66-97.
109. D. Marsh, Cholesterol-induced fluid membrane domains: A compendium of lipid-raft ternary phase diagrams // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2009. – V. 1788, No. 10. – P. 2114-2123.

110. D. Lingwood, J. Ries, P. Schwille, K. Simons, Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2008. – V. 105, No. 29. – P. 10005-10010.
111. L. J. Pike, Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function // *J. Lipid Res.* – 2006. – V. 47, No. 7. – P. 1597-1598.
112. D. A. Brown, E. London, Functions of lipid rafts in biological membranes // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1998. – V. 14. – P. 111-136.
113. L. J. Pike, X. Han, K. N. Chung, R. W. Gross, Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis // *Biochem.* – 2002. – V. 41, No. 6. – P. 2075-2088.
114. I. A. Prior, C. Muncke, R. G. Parton, J. F. Hancock, Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains // *J. Cell Biol.* – 2003. – V. 160, No. 2. – P. 165-170.
115. P. I. Kuzmin, S. A. Akimov, Y. A. Chizmadzhev, J. Zimmerberg, F. S. Cohen, Line Tension and Interaction Energies of Membrane Rafts Calculated from Lipid Splay and Tilt // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88, No. 2. – P. 1120-1133.
116. A. C. Brown, K. B. Towles, S. P. Wrenn SP, Measuring raft size as a function of membrane composition in PC-based systems: Part II--ternary systems // *Langmuir.* – 2007. - V. 23(22). – p.11188-96.
117. A. J. García-Sáez, S. Chiantia, P. Schwille, Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282, No. 46. – P. 33537-33544.
118. T. Baumgart, S. T. Hess, W. W. Webb, Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension // *Nature.* – 2003. – V. 425, No. 6960. – P. 821-824.
119. L. J. Pike, The challenge of lipid rafts // *J. Lipid Res.* – 2009. – V. 50 Suppl, No. Suppl. – P. S323-328.
120. S. R. Shaikh, M. Edidin, Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation2 // *The American Journal of Clinical Nutrition.* – 2006. – V. 84, No. 6. – P. 1277-1289.
121. С. А. Дзюба, Метод спиновых меток и зондов с использованием импульсной ЭПР-спектроскопии // *Russ. Chem. Rev.* – 2007. – Т. 76. – С. 699-713.
122. А. Б. Рубин, Современные методы биофизических исследований: Практикум по биофизике: Учебное пособие / *Высшая школа*: Москва, 1988 –358 с.
123. А. Н. Кузнецов, А. Л. Бучаченко, И.-т. х. ф. А. СССР, Метод спинового зонда: (Основы и применение) / *Наука*, 1976. – С. 210.

124. А. Н. Тихонов, Спиновые метки // *Соросовский образовательный журнал*. – 1998. – №. 1. – С. 8-15.
125. L. Stimson, L. Dong, M. Karttunen, A. Wisniewska, M. Dutka, T. Róg, Stearic Acid Spin Labels in Lipid Bilayers: Insight through Atomistic Simulations // *J. Phys. Chem. B*. – 2007. – V. 111, No. 43. – P. 12447-12453.
126. А. Н. Козицина, ЭПР-спектроскопия, электрохимические и комбинированные методы анализа : учебно-методическое пособие / *Издательство Уральского университета*: Екатеринбург. – 2018. – 60 с.
127. С. А. Дзюба, Основы магнитного резонанса: учебное пособие / *НГУ*, 2010. – 366 с.
128. Е. Н. Кукаев, А. Ю. Куксин, А. О. Тишкина, Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса / *МФТИ*: Москва, 2016. – 40 с.
129. Ю. Д. Цветков, А. Д. Милов, М. А.Г., Импульсный двойной электрон-электронный резонанс (PELDOR) — спектроскопия ЭПР в нанометровом диапазоне расстояний // *Усп. хим.* – 2008. – Т. 77. – С. 515-550.
130. К. М. Салихов, А. Г. Семенов, Ю. Д. Цветков, Электронное спиновое эхо и его применение / *Наука*: Новосибирск, 1976. – 342 с.
131. A. Schweiger, G. Jeschke, Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance / *Oxford University Press*, 2001. – 578 p.
132. R. T. Weber, ELEXSYS E 580 pulse EPR spectrometer user's manual / *Bruker BioSpin Corporation*, 2001.
133. С. А. Дзюба, Изучение структуры биологических мембран с помощью ESEEM спектроскопии спиновых меток и дейтериевого замещения // *Журн. структ. химии.* – 2013. – Т. 54. – С. S5 – S19.
134. Y. Deligiannakis, A. W. Rutherford, Electron spin echo envelope modulation spectroscopy in photosystem I // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2001. – V. 1507, No. 1. – P. 226-246.
135. S. A. Dikanov, Y. D. Tsvetkov, Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy, / *CRC Press*, 1992. – 432 p
136. R. Mehra, B. Dehury, K. P. Kepp, Cryo-temperature effects on membrane protein structure and dynamics // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2020. – V. 22, No. 10. – P. 5427-5438.
137. S. A. Dzuba, Structural studies of biological membranes using ESEEM spectroscopy of spin labels and deuterium substitution // *J. Struct. Chem.* – 2013. – V. 54, No. 1. – P. 1-15.
138. Y. Deligiannakis, M. Louloudi, N. Hadjiliadis, Electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopy as a tool to investigate the coordination environment of metal centers // *Coord. Chem. Rev.* – 2000. – V. 204. – P. 1-112.

139. R. B. Zaripov, R. M. Aminova, K. M. Salikhov, Application of ESEEM to study the structure of free radicals // *Appl. Magn. Reson.* – 2009. – V. 35, No. 2. – P. 337-358.
140. A. Milov, K. Salikhov, M. Shirov, Application of ELDOR in electron-spin echo for paramagnetic center space distribution in solids // *Fizika Tverdogo Tela.* – 1981. – V. 23, No. 4. – P. 975-982.
141. A. Milov, A. Ponomarev, Y. D. Tsvetkov, Electron-electron double resonance in electron spin echo: Model biradical systems and the sensitized photolysis of decalin // *Chem. Phys. Lett.* – 1984. – V. 110, No. 1. – P. 67-72.
142. R. G. Larsen, D. J. Singel, Double electron–electron resonance spin–echo modulation: Spectroscopic measurement of electron spin pair separations in orientationally disordered solids // *J. Chem. Phys.* – 1993. – V. 98, No. 7. – P. 5134-5146.
143. V. Pfannebecker, H. Klos, M. Hubrich, T. Volkmer, A. Heuer, U. Wiesner, H. W. Spiess, Determination of End-to-End Distances in Oligomers by Pulsed EPR // *J. Phys. Chem.* – 1996. – V. 100, No. 32. – P. 13428-13432.
144. M. Teucher, J. W. Sidabras, A. Schnegg, Milliwatt three- and four-pulse double electron electron resonance for protein structure determination // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2022. – V. 24, No. 20. – P. 12528-12540.
145. R. E. Martin, M. Pannier, F. Diederich, V. Gramlich, M. Hubrich, H. W. Spiess, Determination of End-to-End Distances in a Series of TEMPO Diradicals of up to 2.8 nm Length with a New Four-Pulse Double Electron Electron Resonance Experiment // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* – 1998. – V. 37, No. 20. – P. 2833-2837.
146. M. Pannier, S. Veit, A. Godt, G. Jeschke, H. W. Spiess, Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins // *J. Magn. Reson.* – 2000. – V. 142, No. 2. – P. 331-340.
147. A. D. Milov, A. G. Maryasov, Y. D. Tsvetkov, Pulsed electron double resonance (PELDOR) and its applications in free-radicals research // *Appl. Magn. Reson.* – 1998. – V. 15, No. 1. – P. 107-143.
148. A. D. Milov, Y. D. Tsvetkov, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, J. Raap, Self-Assembling Properties of Membrane-Modifying Peptides Studied by PELDOR and CW-ESR Spectroscopies // *J. Am. Chem. Soc.* – 2000. – V. 122, No. 16. – P. 3843-3848.
149. C. Abé, D. Klose, F. Dietrich, W. H. Ziegler, Y. Polyhach, G. Jeschke, H. J. Steinhoff, Orientation selective DEER measurements on vinculin tail at X-band frequencies reveal spin label orientations // *J. Magn. Reson.* – 2012. – V. 216. – P. 53-61.
150. G. Jeschke, The contribution of modern EPR to structural biology // *Emerg. Top. Life Sci.* – 2018. – V. 2, No. 1. – P. 9-18.

151. A. D. Milov, Y. A. Grishin, S. A. Dzuba, Y. D. Tsvetkov, Effect of Pumping Pulse Duration on Echo Signal Amplitude in Four-Pulse PELDOR // *Appl. Magn. Reson.* – 2011. – V. 41, No. 1. – P. 59-67.
152. S. A. Dzuba, Conducting a three-pulse DEER experiment without dead time: A review // *J. Magn. Reson.* – 2023. – V. 14-15. – P. 100100.
153. S. A. Dzuba, M. E. Kardash, Clustering of spin-labeled cholesterol analog diluted in bilayers of saturated and unsaturated phospholipids // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* – 2018. – V. 1860, No. 12. – P. 2527-2531.
154. A. Milov, K. Salikhov, M. Shirov, Use of the double resonance in electron spin echo method for the study of paramagnetic center spatial distribution in solids // *Fizika Tverdogo Tela.* – 1981. – V. 23, No. 4. – P. 975-982.
155. O. Schiemann, T. F. Prisner, Long-range distance determinations in biomacromolecules by EPR spectroscopy // *Q. Rev. Biophys.* – 2007. – V. 40, No. 1. – P. 1-53.
156. G. Jeschke, DEER Distance Measurements on Proteins // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2012. – V. 63, No. Volume 63, 2012. – P. 419-446.
157. O. Schiemann, C. A. Heubach, D. Abdullin, K. Ackermann, M. Azarkh, E. G. Bagryanskaya, M. Drescher, B. Endeward, J. H. Freed, L. Galazzo, D. Goldfarb, T. Hett, L. Esteban Hofer, L. Fábregas Ibáñez, E. J. Hustedt, S. Kucher, I. Kuprov, J. E. Lovett, A. Meyer, S. Ruthstein, S. Saxena, S. Stoll, C. R. Timmel, M. Di Valentin, H. S. McHaourab, T. F. Prisner, B. E. Bode, E. Bordignon, M. Bennati, G. Jeschke, Benchmark Test and Guidelines for DEER/PELDOR Experiments on Nitroxide-Labeled Biomolecules // *J. Am. Chem. Soc.* – 2021. – V. 143, No. 43. – P. 17875-17890.
158. Gunnar W. Reginsson, O. Schiemann, Pulsed electron–electron double resonance: beyond nanometre distance measurements on biomacromolecules // *Biochem. J.* – 2011. – V. 434, No. 3. – P. 353-363.
159. G. Jeschke, The contribution of modern EPR to structural biology // *Emerg. Top. Life Sci.* – 2018. – V. 2, No. 1. – P. 9-18.
160. C. S. Klug, J. B. Feix, Methods and applications of site-directed spin labeling EPR spectroscopy // *Methods Cell Biol.* – 2008. – V. 84. – P. 617-658.
161. J. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy / Springer, 2006. – 698 p.
162. S. Y. Park, P. P. Borbat, G. Gonzalez-Bonet, J. Bhatnagar, A. M. Pollard, J. H. Freed, A. M. Bilwes, B. R. Crane, Reconstruction of the chemotaxis receptor-kinase assembly // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2006. – V. 13, No. 5. – P. 400-407.

163. D. Hilger, Y. Polyhach, E. Padan, H. Jung, G. Jeschke, High-resolution structure of a Na⁺/H⁺ antiporter dimer obtained by pulsed electron paramagnetic resonance distance measurements // *Biophys J.* – 2007. – V. 93, No. 10. – P. 3675-3683.
164. C. W. Kay, C. Elsässer, R. Bittl, S. R. Farrell, C. Thorpe, Determination of the distance between the two neutral flavin radicals in augments of liver regeneration by pulsed ELDOR // *J. Am. Chem Soc.* – 2006. – V. 128, No. 1. – P. 76-77.
165. G. Sicoli, F. Wachowius, M. Bennati, C. Höbartner, Probing Secondary Structures of Spin-Labeled RNA by Pulsed EPR Spectroscopy // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2010. – V. 49, No. 36. – P. 6443-6447.
166. G. W. Reginsson, N. C. Kunjir, S. T. Sigurdsson, O. Schiemann, Trityl Radicals: Spin Labels for Nanometer-Distance Measurements // *Chem. Eur. J.* – 2012. – V. 18, No. 43. – P. 13580-13584.
167. G. Shevelev, O. Krumkacheva, A. Lomzov, A. Kuzhelev, O. Rogozhnikova, D. Trukhin, T. Troitskaya, V. Tormyshev, M. Fedin, D. Pyshnyi, E. G. Bagryanskaya, Physiological-Temperature Distance Measurement in Nucleic Acid using Triarylmethyl-Based Spin Labels and Pulsed Dipolar EPR Spectroscopy // *J. Am. Chem Soc.* – 2014. – V. 136. – P.
168. O. A. Krumkacheva, G. Y. Shevelev, A. A. Lomzov, N. S. Dyrkheeva, A. A. Kuzhelev, V. V. Koval, V. M. Tormyshev, Y. F. Polienko, M. V. Fedin, D. V. Pyshnyi, O. I. Lavrik, E. G. Bagryanskaya, DNA complexes with human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1: structural insights revealed by pulsed dipolar EPR with orthogonal spin labeling // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47, No. 15. – P. 7767-7780.
169. R. Sharp, L. Lohr, J. Miller, Paramagnetic NMR relaxation enhancement: recent advances in theory // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* – 2001. – V. 38, No. 2. – P. 115-158.
170. J. Iwahara, C. Tang, G. Marius Clore, Practical aspects of ¹H transverse paramagnetic relaxation enhancement measurements on macromolecules // *J. Magn. Reson.* – 2007. – V. 184, No. 2. – P. 185-195.
171. O. Y. Selyutina, I. E. Apanasenko, A. V. Kim, E. A. Shelepova, S. S. Khalikov, N. E. Polyakov, Spectroscopic and molecular dynamics characterization of glycyrrhizin membrane-modifying activity // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2016. – V. 147. – P. 459-466.
172. O. Y. Selyutina, E. A. Shelepova, E. D. Paramonova, L. A. Kichigina, S. S. Khalikov, N. E. Polyakov, Glycyrrhizin-induced changes in phospholipid dynamics studied by ¹H NMR and MD simulation // *Arch Biochem Biophys.* – 2020. – V. 686. – P. 108368.
173. G. M. Clore, J. Iwahara, Theory, Practice, and Applications of Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Characterization of Transient Low-Population States of Biological Macromolecules and Their Complexes // *Chem. Rev.* – 2009. – V. 109, No. 9. – P. 4108-4139.

174. A. J. Lenard, F. A. A. Mulder, T. Madl, Solvent paramagnetic relaxation enhancement as a versatile method for studying structure and dynamics of biomolecular systems // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* – 2022. – V. 132-133. – P. 113-139.
175. K. Y. Lee, Z. Fang, M. Enomoto, G. Gasmi-Seabrook, L. Zheng, S. Koide, M. Ikura, C. B. Marshall, Two Distinct Structures of Membrane-Associated Homodimers of GTP- and GDP-Bound KRAS4B Revealed by Paramagnetic Relaxation Enhancement // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2020. – V. 59, No. 27. – P. 11037-11045.
176. D. S. Baranov, A. S. Smorygina, S. A. Dzuba, Synthesis of Spin-Labeled Ibuprofen and Its Interaction with Lipid Membranes // *Molecules.* – 2022. – V. 27, No. 13. – P. 4127.
177. D. S. Baranov, A. S. Kashnik, A. N. Atnyukova, S. A. Dzuba, Spin-Labeled Diclofenac: Synthesis and Interaction with Lipid Membranes // *Molecules.* – 2023. – V. 28, No. 16. – P. 5991.
178. N. Kuznetsov, A. Milov, V. Koval, R. Samoilo, Y. Grishin, D. Knorre, Y. Tsvetkov, O. Fedorova, S. Dzuba, PELDOR study of conformations of double-spin-labeled single- and double-stranded DNA with non-nucleotide inserts // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2009. – V. 11. – P. 6826-6832.
179. D. Marsh, Spin-Label Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy / *CRC Press*, 2019. – 516 p.
180. N. V. Surovtsev, S. A. Dzuba, Flexibility of phospholipids with saturated and unsaturated chains studied by Raman scattering: The effect of cholesterol on dynamical and phase transitions // *J. Chem. Phys.* – 2014. – V. 140, No. 23. – P.
181. E. A. Golysheva, S. A. Dzuba, Lipid chain mobility and packing in DOPC bilayers at cryogenic temperatures // *Chem. Phys. Lipids.* – 2020. – V. 226. – P. 104817.
182. O. Schiemann, P. Cekan, D. Margraf, T. F. Prisner, S. T. Sigurdsson, Relative orientation of rigid nitroxides by PELDOR: beyond distance measurements in nucleic acids // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2009. – V. 48, No. 18. – P. 3292-3295.
183. D. Abdullin, G. Hagelueken, R. Hunter, G. Smith, O. Schiemann, Geometric model-based fitting algorithm for orientation-selective PELDOR data // *Mol. Phys.* – 2014. – V. 113. – P. 1-17.
184. N. Kučerka, M. P. Nieh, J. Katsaras, Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1808, No. 11. – P. 2761-2771.
185. L. Janosi, A. A. Gorfe, Simulating POPC and POPC/POPG Bilayers: Conserved Packing and Altered Surface Reactivity // *J. Chem. Theory Comput.* – 2010. – V. 6, No. 10. – P. 3267-3273.
186. V. V. Unguryan, E. A. Golysheva, S. A. Dzuba, Double Electron–Electron Resonance of Spin-Labeled Cholestane in Model Membranes: Evidence for Substructures inside the Lipid Rafts // *The J. Phys. Chem. B.* – 2021. – V. 125, No. 33. – P. 9557-9563.

187. J. F. Nagle, S. Tristram-Nagle, Structure of lipid bilayers // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – V. 1469, No. 3. – P. 159-195.
188. H. J. Steinhoff, N. Radzwill, W. Thevis, V. Lenz, D. Brandenburg, A. Antson, G. Dodson, A. Wollmer, Determination of interspin distances between spin labels attached to insulin: comparison of electron paramagnetic resonance data with the X-ray structure // *Biophys J.* – 1997. – V. 73, No. 6. – P. 3287-3298.
189. A. S. Smorygina, E. A. Golysheva, S. A. Dzuba, Clustering of Stearic Acids in Model Phospholipid Membranes Revealed by Double Electron–Electron Resonance // *Langmuir.* – 2021. – V. 37, No. 47. – P. 13909-13916.
190. T. Smirnova, A. Smirnov, Peptide-Membrane Interactions by Spin-Labeling EPR // *Methods Enzym.* – 2015. – V. 564. – P. 219-258.
191. E. A. Golysheva, A. S. Smorygina, S. A. Dzuba, Double Electron–Electron Resonance vs. Instantaneous Diffusion Effect on Spin-Echo for Nitroxide Spins Labels // *Appl. Magn. Res.* – 2022. – V. 53, No. 3. – P. 685-698.
192. M. E. Kardash, S. A. Dzuba, Lipid-Mediated Clusters of Guest Molecules in Model Membranes and Their Dissolving in the Presence of Lipid Rafts // *J. Phys. Chem. B.* – 2017. – V. 121, No. 20. – P. 5209-5217.
193. K. Konov, N. Isaev, S. Dzuba, Glycerol penetration profile in phospholipid bilayers measured by ESEEM of spin-labelled lipids // *Mol. Phys.* – 2013. – V. 111. – P. 2882-2886.
194. A. D. Milov, R. I. Samoiloova, A. A. Shubin, Y. A. Grishin, S. A. Dzuba, ESEEM Measurements of Local Water Concentration in D2O-Containing Spin-Labeled Systems // *Appl. Magn. Reson.* – 2008. – V. 35, No. 1. – P. 73-94.
195. R. Pain, Principles of protein structure: By G E Schulz and R H. Schirmer. pp 314. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 1979. DM54 ISBN 3-540-90386-0 // *Biochem. Educ.* – 2010. – V. 8. – P. 124-124.
196. P. K. Koumkoua, C. Aisenbrey, E. Salnikov, O. Rifi, B. Bechinger, On the design of supramolecular assemblies made of peptides and lipid bilayers // *J. Pept. Sci.* – 2015. – V. 21, No. 8. – P. 688-688.
197. V. N. Syryamina, N. E. Sannikova, M. De Zotti, M. Gobbo, F. Formaggio, S. A. Dzuba, Tylopeptin B peptide antibiotic in lipid membranes at low concentrations: Self-assembling, mutual repulsion and localization // *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* – 2021. – V. 1863, No. 9. – P. 183585.
198. A. Kashnik, V. Syryamina, B. Biondi, C. Peggion, F. Formaggio, S. Dzuba, DEER/PELDOR Study of the Effect of Extremely Low Concentrations of the Antimicrobial Peptide Chalciporin A on the Membrane Lipid Organization // *Appl. Magn. Reson.* – 2023. – V. 54. – P. 1-14.

199. J. Liebau, W. Ye, L. Mäler, Characterization of fast-tumbling isotropic bicelles by PFG diffusion NMR // *Magn. Reson. Chem.* – 2017. – V. 55, No. 5. – P. 395-404.
200. O. Cruciani, L. Mannina, A. P. Sobolev, C. Cametti, A. Segre, An Improved NMR Study of Liposomes Using 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine as Model // *Molecules.* – 2006. – V. 11, No. 5. – P. 334-344.
201. H. A. Scheidt, D. Huster, The interaction of small molecules with phospholipid membranes studied by ¹H NOESY NMR under magic-angle spinning // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2008. – V. 29, No. 1. – P. 35-49.
202. G. Rule, K. Hitchens, Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy / *Springer*, 2005. – 530 p.
203. A. S. Kashnik, O. Y. Selyutina, D. S. Baranov, N. E. Polyakov, S. A. Dzuba, Localization of the ibuprofen molecule in model lipid membranes revealed by spin-label-enhanced NMR relaxation // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembr.* – 2023. – V. 1865, No. 8. – P. 184215.
204. A. S. Kashnik, D. S. Baranov, S. A. Dzuba, Ibuprofen in a Lipid Bilayer: Nanoscale Spatial Arrangement // *Membranes.* – 2022. – V. 12, No. 11. – P. 1077.
205. K. Salikhov, I. Khairuzhdinov, R. Zaripov, Three-Pulse ELDOR Theory Revisited // *Appl. Magn. Reson.* – 2014. – V. 45. – P. 573-619.
206. A. Kashnik, A. Atnyukova, D. Baranov, S. Dzuba, DEER Study of Spatial Arrangement of Spin-Labeled Diclofenac in Lipid Bilayers of Different Composition // *Appl. Magn. Reson.* – 2024. – P. 1-13.
207. H. Saito, W. Shinoda, Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers: a molecular dynamics study // *J. Phys. Chem. B.* – 2011. – V. 115, No. 51. – P. 15241-15250.
208. D. V. Leonov, S. A. Dzuba, N. V. Surovtsev, Normal vibrations of ternary DOPC/DPPC/cholesterol lipid bilayers by low-frequency Raman spectroscopy // *RSC Adv.* – 2019. – V. 9, No. 59. – P. 34451-34456.
209. P. Heftberger, B. Kollmitzer, A. A. Rieder, H. Amenitsch, G. Pabst, In situ determination of structure and fluctuations of coexisting fluid membrane domains // *Biophys. J.* – 2015. – V. 108, No. 4. – P. 854-862.
210. J. H. Davis, J. J. Clair, J. Juhasz, Phase equilibria in DOPC/DPPC-d62/cholesterol mixtures // *Biophys. J.* – 2009. – V. 96, No. 2. – P. 521-539.
211. M. Kinoshita, S. Yamaguchi, N. Matsumori, Low-flux scanning electron diffraction reveals substructures inside the ordered membrane domain // *Sci. Rep.* – 2020. – V. 10, No. 1. – P. 22188.
212. A. J. Sodt, R. W. Pastor, E. Lyman, Hexagonal Substructure and Hydrogen Bonding in Liquid-Ordered Phases Containing Palmitoyl Sphingomyelin // *Biophys. J.* – 2015. – V. 109, No. 5. – P. 948-955.

213. A. J. Sodt, M. L. Sandar, K. Gawrisch, R. W. Pastor, E. Lyman, The molecular structure of the liquid-ordered phase of lipid bilayers // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – V. 136, No. 2. – P. 725-732.
214. S. Park, I. Levental, R. W. Pastor, W. Im, Unsaturated Lipids Facilitate Partitioning of Transmembrane Peptides into the Liquid Ordered Phase // *J. Chem. Theory Comput.* – 2023. – V. 19, No. 15. – P. 5303-5314.
215. A. Ghysels, A. Krämer, R. M. Venable, W. E. Teague, Jr., E. Lyman, K. Gawrisch, R. W. Pastor, Permeability of membranes in the liquid ordered and liquid disordered phases // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10, No. 1. – P. 5616.
216. A. S. Kashnik, D. S. Baranov, S. A. Dzuba, Spatial Arrangement of the Drug Ibuprofen in a Model Membrane in the Presence of Lipid Rafts // *J. Phys. Chem. B.* – 2024. – V. 128, No. 15. – P. 3652-3661.
217. M. N. Uvarov, L. V. Kulik, S. A. Dzuba, Assembly of galvinoxyl doped in polymer–fullerene photovoltaic blends // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2023. – V. 25, No. 38. – P. 26219-26224.

ПРИЛОЖЕНИЕ

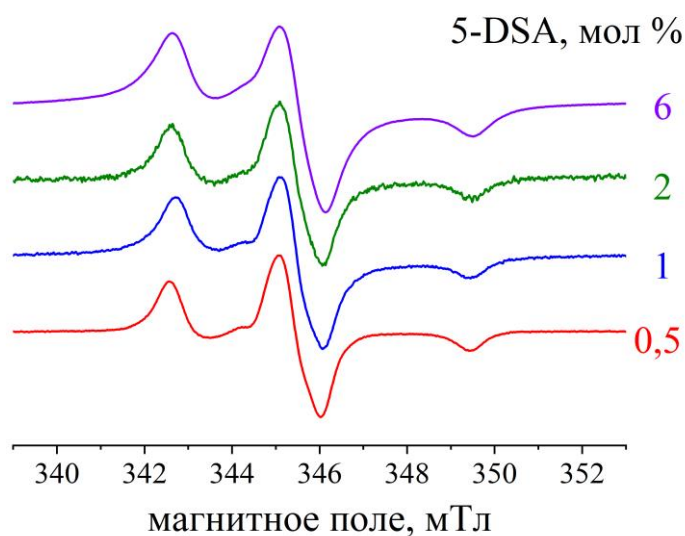


Рисунок П1. Спектры СВ ЭПР, полученные при 200 К, для 5-DSA в различных концентрациях в бислое POPC. Спектры нормированы интенсивность центральной компоненты и сдвинуты по вертикали

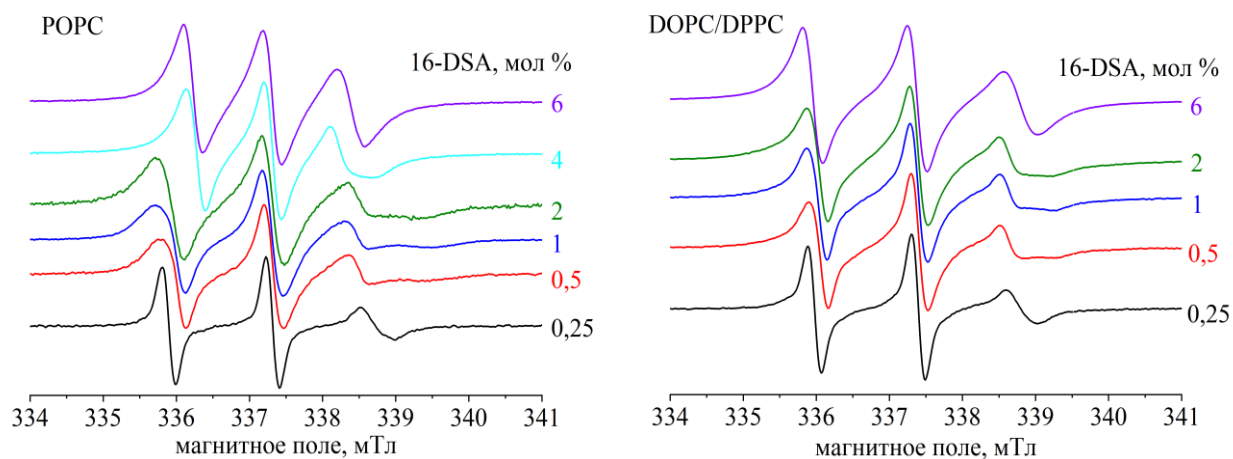


Рисунок П2. Спектры СВ ЭПР, полученные при комнатной температуре, для 16-DSA в различных концентрациях в бислое POPC или DOPC/DPPC. Спектры нормированы интенсивность центральной компоненты и сдвинуты по вертикали

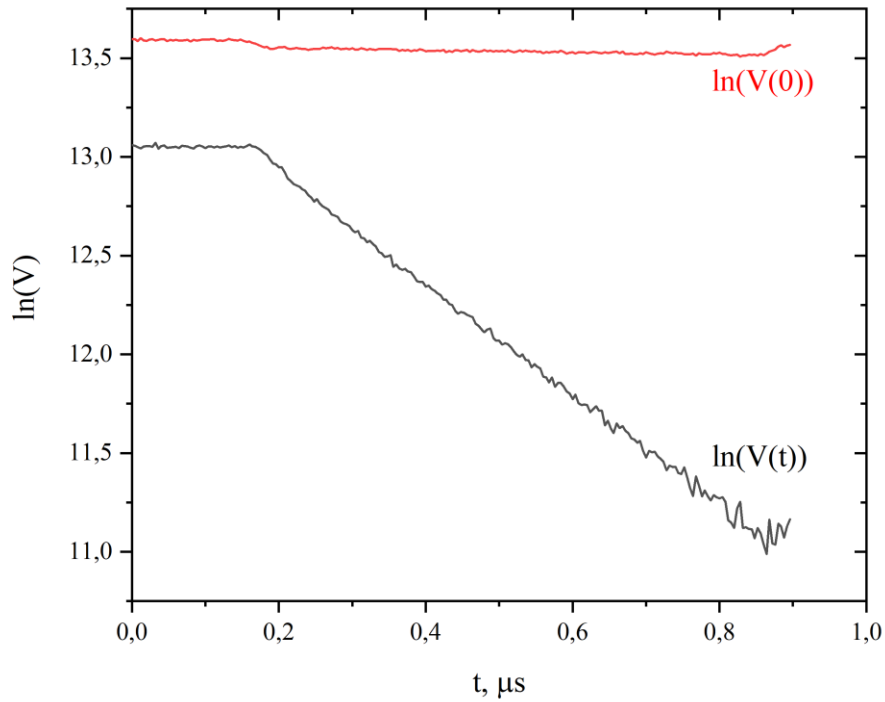


Рисунок П3. Логарифм сигнала ДЭЭР $\ln(V(t))$ и логарифм амплитуды сигнала ЭСЭ в отсутствие импульса накачки $\ln(V(0))$.

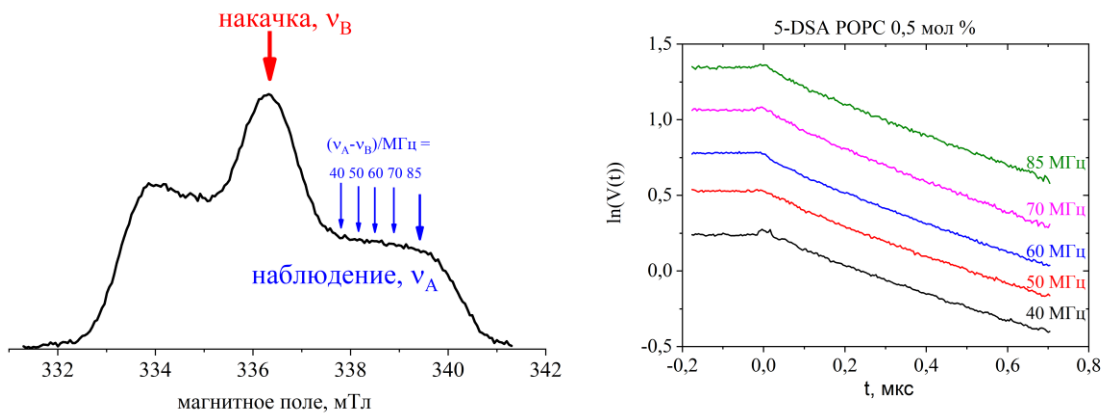


Рисунок П4. Справа – эхо-детектированный ЭПР-спектр, полученный при сканирующем магнитном поле и фиксированной временной задержке τ (120 нс) между двумя микроволновыми импульсами. Последовательность импульсов $(\pi/2)_{\nu_A} - \tau - \pi_{\nu_A} - \text{эхо}$. Стрелками показаны положения поля для наблюдения на микроволновой частоте ν_A и накачки на микроволновой частоте ν_B . Образец – 0,5 мол % 5-DSA в бислое РОРС, температура 80 К. Слева – спады сигнала ДЭЭР для различных частотных смещений $\nu_A - \nu_B$

Калибровочный эксперимент для определения p_B для 5- и 16-DSA. Образцы представляют собой 5 мМ 16-DSA и 5 мМ 5-DSA в стеклующейся смеси этанол/метанол (95:5 w/w). Временные спады сигнала ДЭЭР для 5 мМ 16-DSA (слева) и 5-DSA (справа) в смеси этанол/метанол при 80 К представлены на Рисунке П5. Пунктирные прямые линии представляют собой линейные аппроксимации. Используя формулу для равномерного трехмерного распределения 26, из наклона касательных получаем $p_B = 0,049$ для 16-DSA и 0,068 для 5-DSA, соответственно.

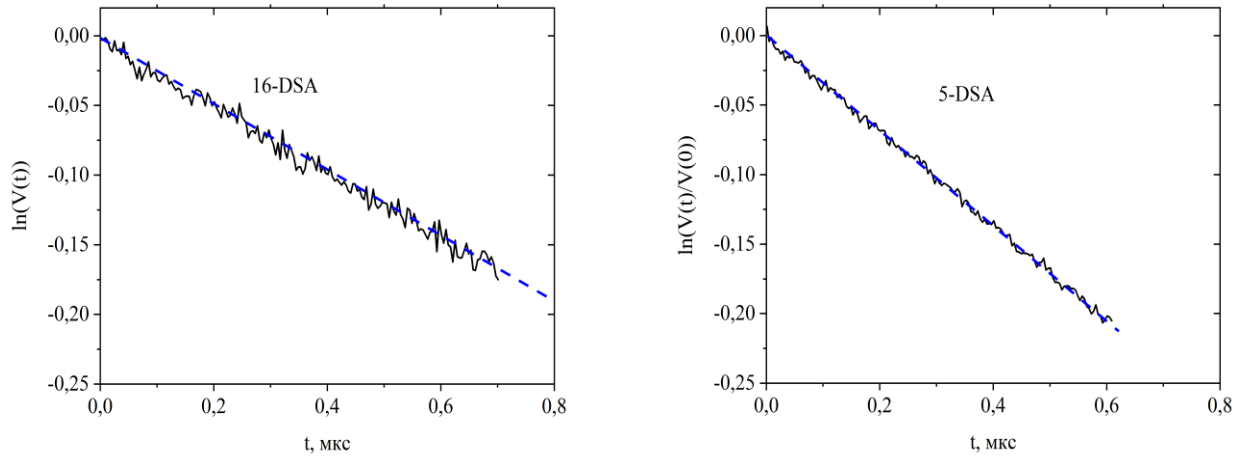


Рисунок П5. Временные спады сигнала ДЭЭР для 5 мМ 16-DSA (слева) и 5-DSA (справа) в смеси этанол/метанол (95:5), полученные при 80 К. Пунктирные прямые линии представляют собой линейные аппроксимации

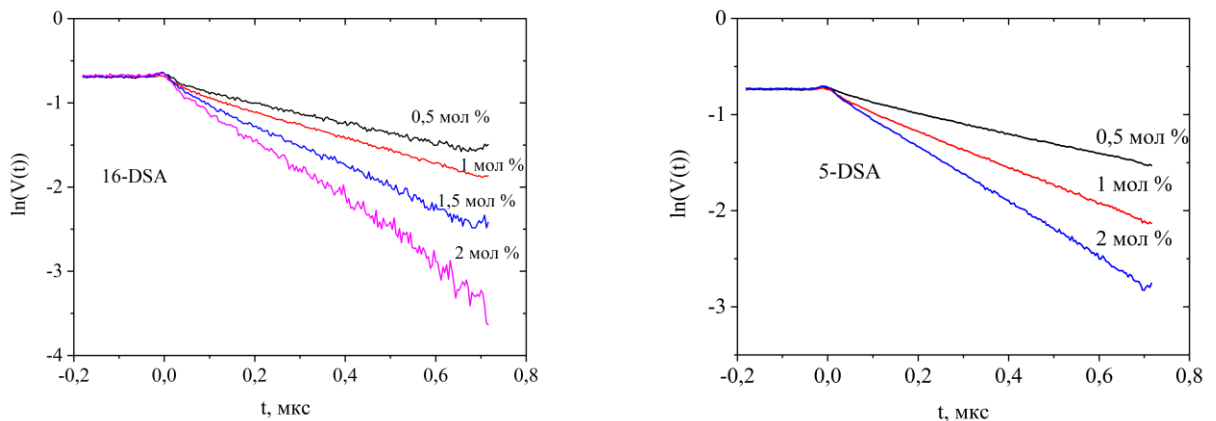


Рисунок П6. Исходные временные спады 3-импульсного ДЭЭР для 5(16)-DSA в бислое РОРС в отсутствие хальципорина А

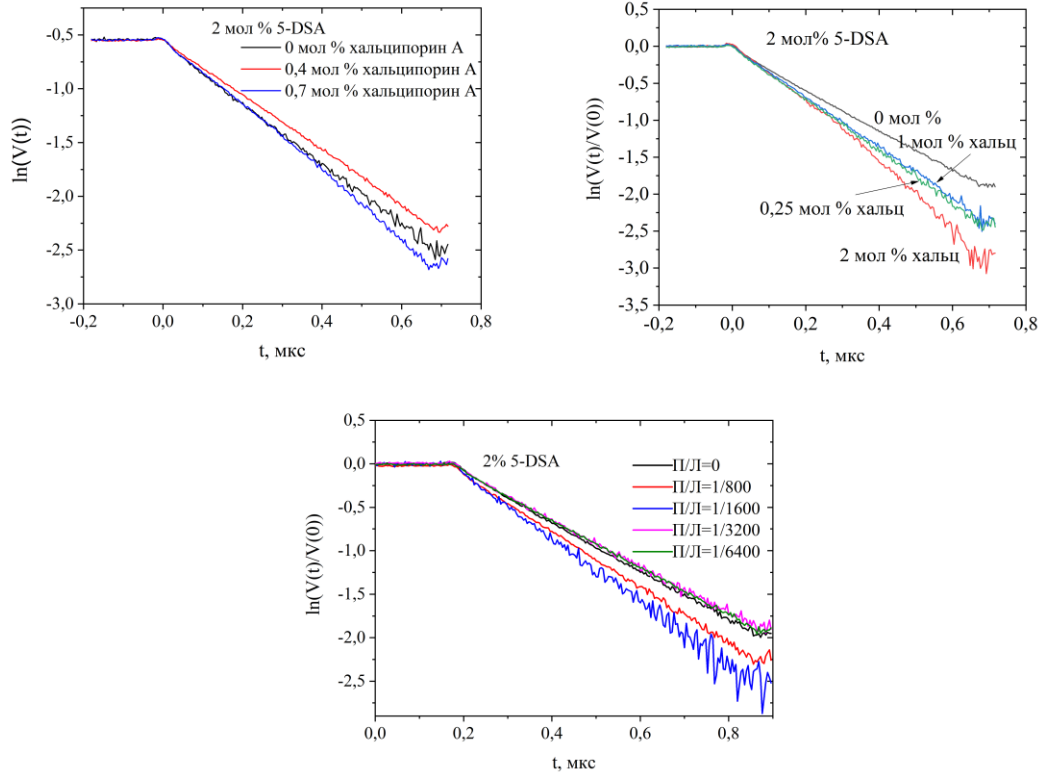


Рисунок П7. Исходные 3-импульсные временные спады ДЭЭР для 2 мол % 5-DSA в бислое РОРС в присутствии хальципорина А при различных соотношениях П/Л

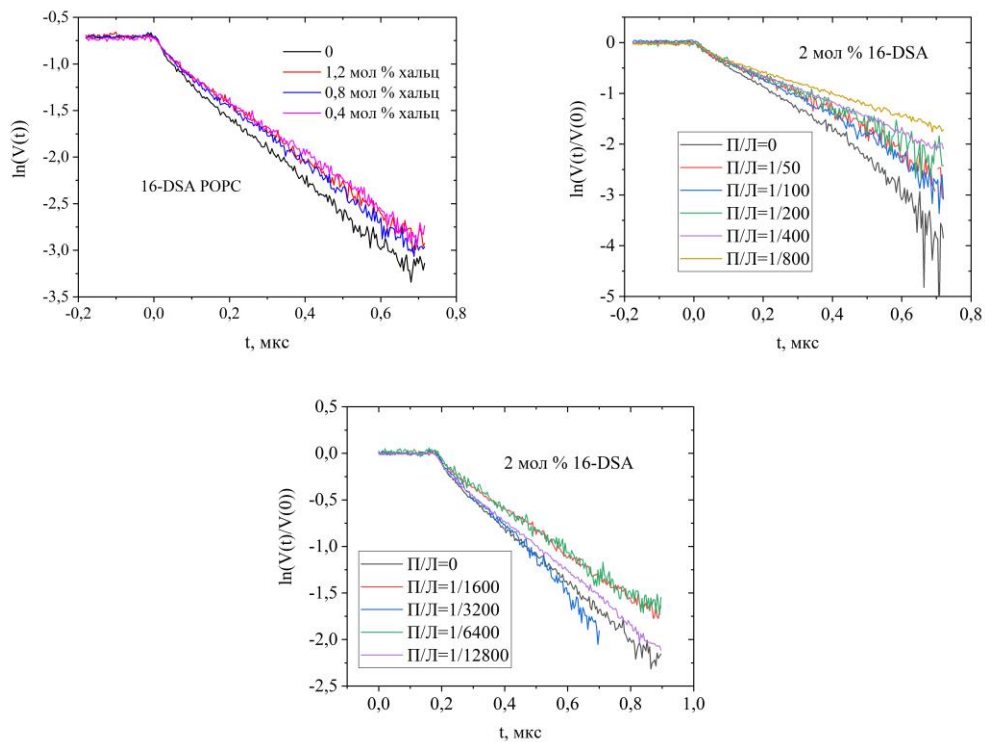


Рисунок П8. Исходные 3-импульсные временные спады ДЭЭР для 2 мол % 16-DSA в бислое РОРС в присутствии хальципорина А для разных соотношений П/Л

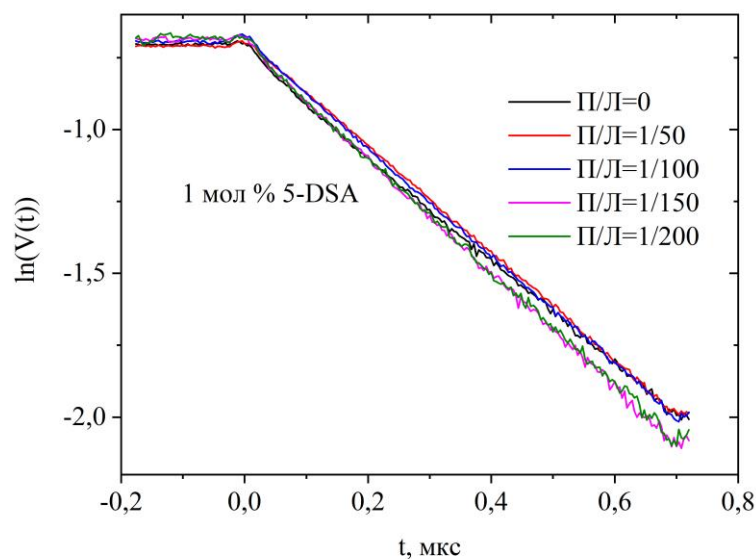


Рисунок П9. Исходные 3-импульсные временные спады ДЭЭР для 1 мол % 5-DSA в бислое РОРС в присутствии хальципорина А для различных соотношений П/Л

Таблица П1. Времена релаксации T_1 для протонов липида РОРС в виде однослойных липосом с различным химическим сдвигом в присутствии спин-меченого ибупрофена, либо немеченого ибупрофена

Химический сдвиг, м.д.	5,3	3,7	3,2	2,3	2,02	1,3	0,9
T_1 , мс							
РОРС (чистый липид)	670,2	515,0	489,0	573,4	606,3	657,3	875,8
РОРС + 0,25 мол % SL-ибупрофен	612,6	459,5	462,8	506,8	533,7	566,7	666,9
РОРС + 0,5 мол % SL-ибупрофен	494,1	418,4	414,9	426,0	470,1	515,8	664,8
РОРС + 0,5 мол % немеченый ибупрофен	645,0	493,4	467,6	579,2	614,3	662,4	837,9
РОРС + 2 мол % немеченый ибупрофен	623,8	491,0	468,0	548,0	595,0	652,0	834,0

POPC + 20 мол % холестерин	708,0	602,5	563,6	-	-	694,0	705,8
POPC + 0,25 мол % SL-ибупрофен + 20 мол % холестерин	572,4	491,3	480	-	-	622,2	696,8
POPC + 0,5 мол % SL- ибупрофен+ 20 мол % холестерин	477,7	420,7	418,6	-	-	516,2	606,4

Таблица П2. Времена релаксации T_1 для протонов липидов в бицеллах DHPC:POPC (2:1) с различным химическим сдвигом в присутствии SL-ибупрофена и немеченого ибупрофена

Химический сдвиг, м.д.	5,3	4,4	4,3	4,05	3,7	3,2	2,3	2,02	1,6	1,3	0,9
T_1 , мс											
DHPC:DMPC С (чистый липид)	632, 3	583, 1	725, 0	588, 2	692, 2	707, 2	818, 1	584, 3	815, 6	830, 5	1063, 0
+0,5 мол % SL- ибупрофен	514, 2	457, 8	583, 7	457, 9	565, 7	610, 4	540, 3	382, 7	581, 9	554, 7	856,8
+0,5 мол % немеченый ибупрофен	669, 3	643, 2	734, 9	628, 7	683, 4	712, 5	782, 6	597, 4	793, 3	826, 4	942,9

Таблица П3. Времена релаксации T_1 для протонов липидов в бицеллах DHPC:DMPC (2:1) с различными химическими сдвигами в присутствии SL-ибупрофена и немеченого ибупрофена

Химический сдвиг, м.д.	5,3	4,4	4,3	4,05	3,7	3,2	2,3	1,6	1,3	0,9
T_1 , мс										

ДНРС:DMPC (чистый липид)	737,7	545,2	709,4	561,5	704,0	722,0	817,2	865,4	1028,9	1241,9
+0,5 мол % SL- ибупрофен	473,4	390,1	530,5	396,0	486,5	497,1	486,1	536,5	562,9	640,0
+0,5 мол % немеченый ибупрофен	654,9	617,6	721,5	593,7	699,6	704,9	801,8	858,7	983,6	1084,5

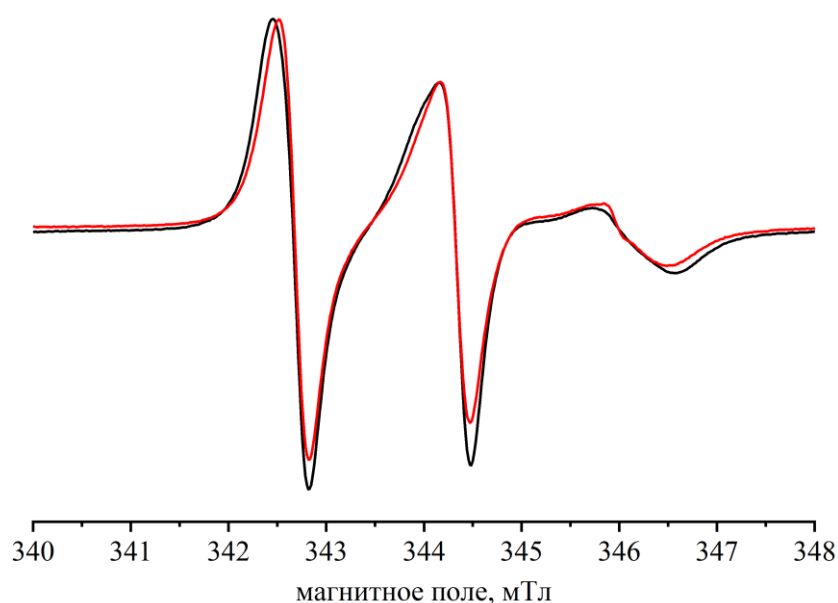


Рисунок П10. Стационарные спектры ЭПР при комнатной температуре для спин-меченого диклофенака в однослойных липосомах ПОРС. В первом случае липид и SL-диклофенак смешивались до приготовления липосом (черная линия), во втором случае раствор SL диклофенака в ДМСО добавлялся к приготовленным липосомам (красная линия)

Калибровочный эксперимент для определения r_B для SL-ибупрофена. Образцы представляют собой 5 мМ SL-ибупрофена в стеклующейся смеси этанол/метанол (95:5 w/w). Временные спады сигнала ДЭЭР для 5 мМ SL-ибупрофена в смеси этанол/метанол при 80 К представлены на Рисунке П11. Пунктирная прямая линия представляет собой линейную аппроксимацию. Используя формулу для равномерного трехмерного распределения (26), из наклона касательных получаем $r_B = 0,22$.

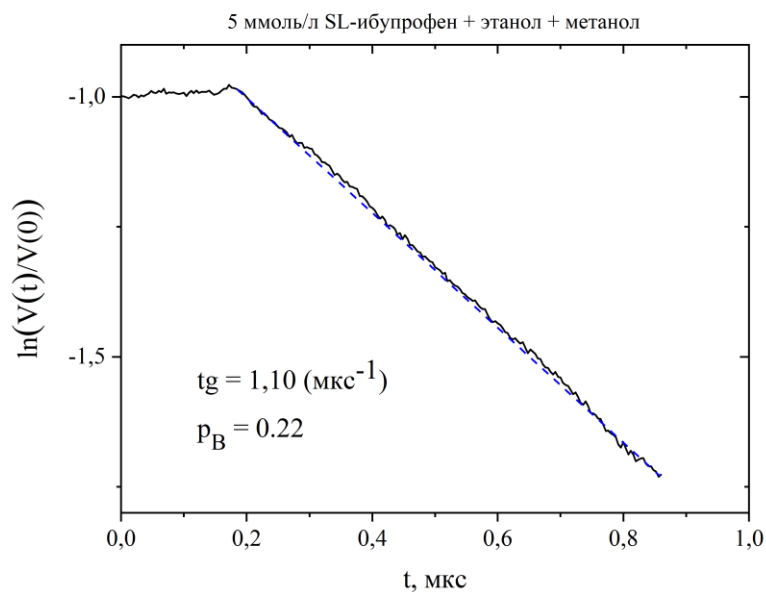


Рисунок П11. Временные спады сигнала ДЭЭР для 5 мМ SL-ибупрофена в смеси этанол/метанол (95:5), полученные при 80 К. +Пунктирная прямая линия представляет собой линейную аппроксимацию

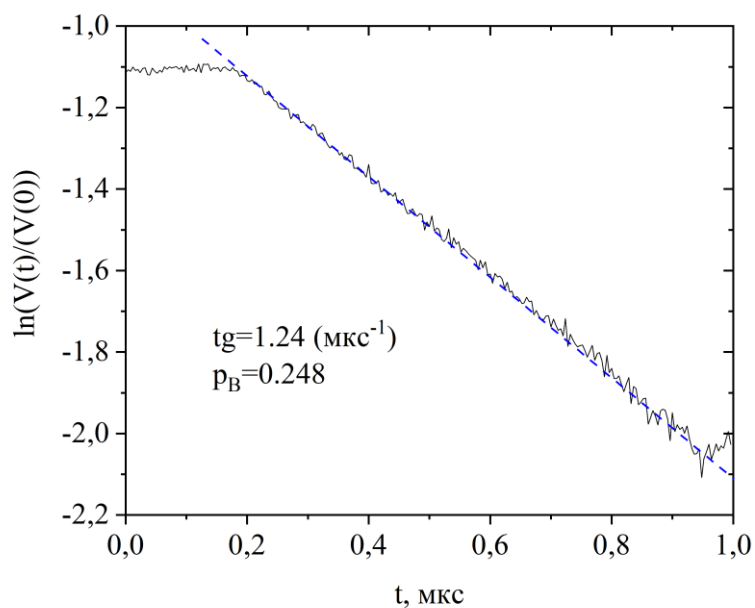


Рисунок П12. Временные спады сигнала ДЭЭР для 5 мМ SL-диклофенака в смеси этанол/метанол (95:5), полученные при 80 К. Пунктирная прямая линия представляет собой линейную аппроксимацию

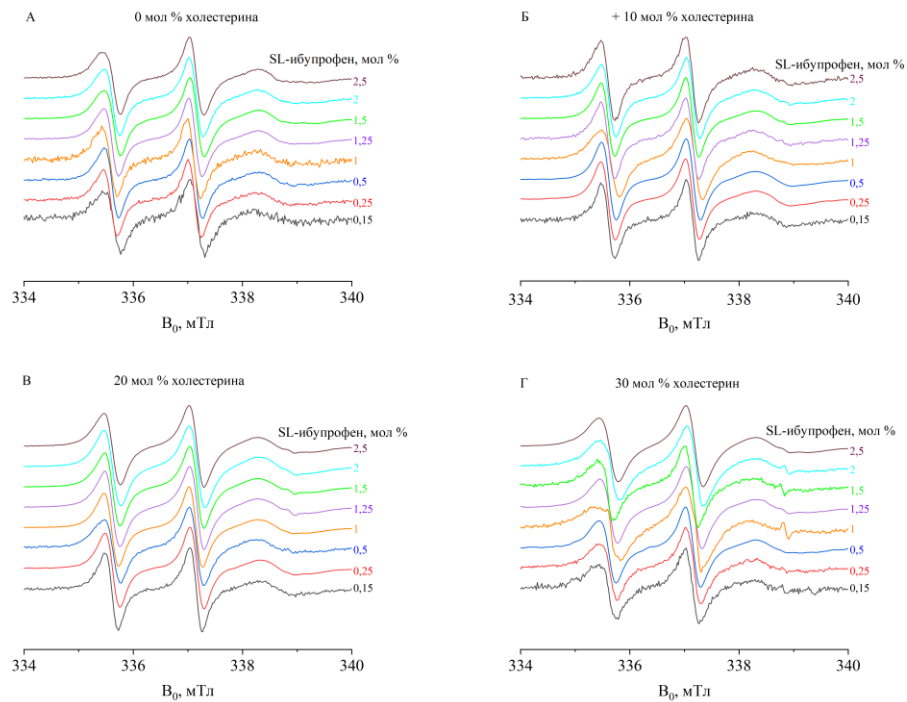


Рисунок П13. Спектры СВ ЭПР, полученные при комнатной температуре, для спин-меченого ибупрофена в различных концентрациях в бислое DOPC/DPPC. А – без добавления холестерина, Б – с добавлением 10 мол % холестерина, В – с добавлением 20 мол % холестерина, Г – с добавлением 30 мол % холестерина. Спектры нормированы интенсивность центральной компоненты и сдвинуты по вертикали

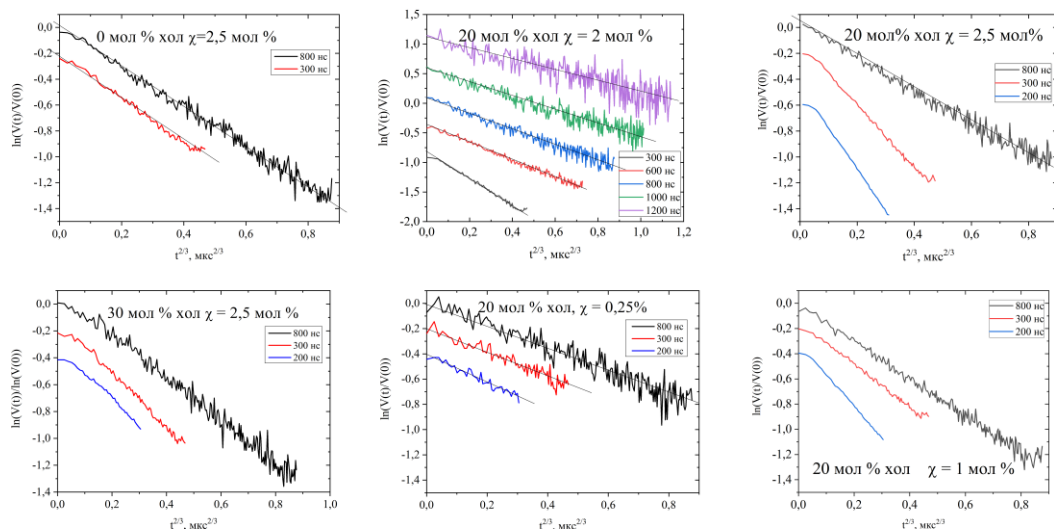


Рисунок П14. Сигналы ДЭЭР для различных концентраций спин-меченого ибупрофена с добавлением холестерина (0, 20 или 30 мол %), полученные при различных временных задержках τ