

*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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН)

**Научный  
руководитель**

**Дзюба Сергей Андреевич**

д.х.м.н., профессор, заведующий лабораторией химии и физики свободных радикалов ИХКГ СО РАН.

**Официальные  
оппоненты**

**Володин Александр Михайлович**

д.х.н., с.н.с., ведущий научный сотрудник отдела материаловедения и функциональных материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук»;

**Зарипов Руслан Булатович**

к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории спиновой физики и спиновой химии Казанского физико-технического института им. Е.К. Завойского - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»;

**Ведущая  
организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук.

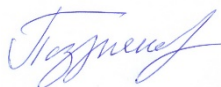
Защита диссертации состоится «23» апреля 2025 года в 15:00 на заседании Диссертационного совета 24.1.150.01 при ФГБУН Институте химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН) по адресу: 630090, Новосибирск, ул. Институтская, д. 3, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХКГ СО РАН и на сайте <http://kinetics.nsc.ru>. Текст автореферата размещён на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Отзывы на автореферат в 1-м экземпляре просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, 3, ИХКГ СО РАН, учёному секретарю диссертационного совета 24.1.150.01; e-mail: [ref\\_dissovet@kinetics.nsc.ru](mailto:ref_dissovet@kinetics.nsc.ru).

Автореферат разослан «        » \_\_\_\_\_ 2025 года

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



И. П. Поздняков

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

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.

### **Цели и задачи диссертационной работы**

**Цель работы** – изучение методом ДЭЭР и некоторыми другими методами (другие варианты ЭПР, метод ЯМР) 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 спектроскопии модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (ESEEM).
4. Определение локализации спин-меченых и немеченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельных биологических мембранах методом 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**

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 высветить 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 стерин. 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), DNPC (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 представленных в диссертационной работе результатов 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 (Конеп, Словения).

### **Личный вклад автора**

Постановка целей, задач, а также планирование экспериментов осуществлялось соискателем совместно с научным руководителем. Автором был проведен анализ результатов 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, 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» и п. 2 «структура и свойства вандерваальсовых молекул, комплексов, ритберговских молекул, кластеров, ассоциатов, пленок, адсорбционных слоев, интеркалятов, межфазных границ, мицелл, дефектов».

### **Структура и объем работы**

Диссертация изложена на 143 страницах и включает 83 рисунка. 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.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

Во **введении** обоснована актуальность темы, поставлена цель и определены задачи исследования, сформулированы научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы и положения, выносимые на защиту.

**Первая глава** диссертации посвящена обзору литературы и включает в себя восемь разделов. В первом разделе приводится описание строения, функций и свойств липидных мембран. Во втором разделе обсуждаются причины, по которым необходим поиск новых антибактериальных препаратов, а также перспективные кандидаты на замену традиционным антибиотикам – антимикробные пептиды (АМП). В третьем разделе представлена общая характеристика нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), механизмы их действия на мембрану; приводятся существующие исследования взаимодействия НПВП с биологическими мембранами. Четвертый раздел посвящен описанию строения, свойств и особенностей влияния холестерина на липидные бислои. Обсуждается жидкостно-мозаичная модель строения мембраны и ее недостатки. Рассматривается концепция липидных рафтов. В пятом разделе описывается метод спиновых меток и зондов: принцип данного подхода и цели, для которых он может использоваться. Приведено теоретическое описание стационарного метода ЭПР и области его применения. Описаны механизм формирования электронного спинового эха (ЭСЭ), а также импульсные методы ЭПР, которые основаны на данном эффекте: ESEEM, ДЭЭР. Шестой раздел посвящен биофизическому приложению метода ДЭЭР, обсуждаются новые возможности применения метода ДЭЭР. В седьмом разделе приведено теоретическое описание метода усиления парамагнитной релаксации в ЯМР. В восьмом разделе представлено краткое заключение к литературному обзору.

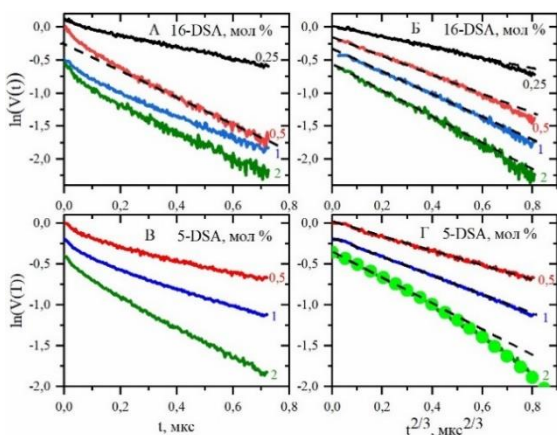
Во **второй главе** приведён перечень используемых в работе материалов и оборудования. Приведены структуры липидов, НПВП и спин-меченых НПВП, стеариновых кислот, спин-меченых меткой DOXYL. Представлена аминокислотная последовательность АМП хальципорина, а также ее спин-меченого аналога. Описаны условия выполнения экспериментов CW ЭПР, ДЭЭР, ESEEM, ЯМР  $^1\text{H}$ , NOESY.

**Третья глава** посвящена исследованию влияния АМП хальципорина А на наноразмерное пространственное распределение и кластеризацию спин-меченых в 5-м или 16-м положении стеариновых кислот в модельных фосфолипидных мембранах с помощью метода ДЭЭР. Описана процедура приготовления образцов. Первый тип образцов содержал липид POPC либо эквимольярную смесь липидов DOPC/DPPC с добавлением 5- или 16-DSA. Второй, помимо липида и

спин-меченой стеариновой кислоты, содержал хальципорин. Третий тип образцов состоял из липида и спин-меченого хальципорина.

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. Основные результаты этой части работы приведены *разделе 3.3.1.*

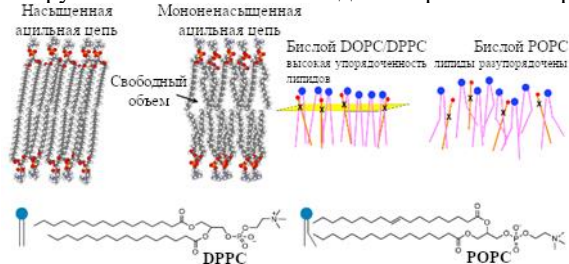
Поскольку большое дипольное уширение вызывает быстрое затухание сигнала ЭСЭ, эксперименты ДЭЭР проводились только для тех образцов, где нет зависимости спектров стационарного ЭПР от концентрации спиновых меток. На Рисунке 1 показаны некоторые временные спады сигнала ДЭЭР для 16-DSA и 5-DSA в бислое DOPC/DPPC, построенные в зависимости от временной задержки  $t$  или  $t^{2/3}$  в полулогарифмических координатах. Сигнал ДЭЭР  $V(t)$  нормируется на амплитуду сигнала ЭСЭ в отсутствие импульса как  $V(0)$ . Наблюдается корреляция между полученными экспериментальными данными и линейной зависимостью от  $t^{2/3}$ , за исключением случая 2 мол % 5-DSA (Рисунок 1 Г), что обсуждается ниже. Таким образом, экспериментальная временная зависимость  $V(t)$  может быть описана теоретической функцией для двумерного пространственного распределения  $V_{2D}(t)$ . 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.



**Рисунок 1.** 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). Для удобства представления данные сдвинуты по вертикали (из работы [1] представленного выше списка)

В бислое POPC для 5- и 16-DSA наблюдается противоположная бислою DOPC/DPPC ситуация – полученные данные имеют линейную зависимость от  $t$ . Такое различие может означать, что в бислое POPC спиновые метки расположены более диффузно, чем в бислое DOPC/DPPC. Таким образом, они образуют квази-трехмерное распределение.

Различие в расположении стеариновых кислот в бислоях DOPC/DPPC и POPC можно объяснить более жесткой структурой бислоя DOPC/DPPC: в гелевой фазе молекула DPPC приобретает вытянутую транс-конформацию, то же самое предполагается и для бислоя DOPC, который, хотя и содержит две двойные связи, тем не менее, может располагаться упорядоченно. 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 2.

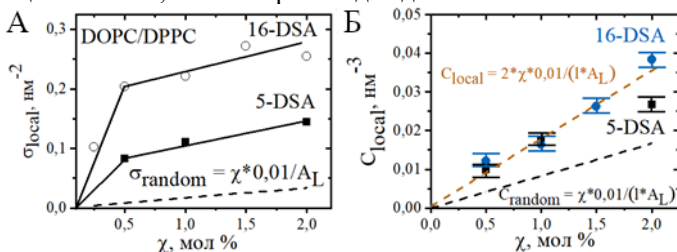


**Рисунок 2.**  
Схематическое представление наноразмерных пространственных распределений для бислоев DOPC/DPPC и POPC

Найденные локальные поверхностные концентрации  $\sigma_{local}$  для 16-DSA и 5-DSA в бислое DOPC/DPPC в единицах  $\text{нм}^{-2}$  приведены на Рисунке 3 А в зависимости от среднего молярного содержания спин-меченых стеариновых кислот  $\chi$ . Пунктирная линия представляет собой функцию  $\sigma_{random} = 0,01\chi/A_L$ , которая ожидается для случайного пространственного распределения, где  $A_L$  — площадь, приходящаяся на липид ( $\sim 0,60 \text{ нм}^2$ ). Из Рисунка 3 А следует, что значения  $\sigma_{local}$  значительно превышают значения  $\sigma_{random}$ . Это однозначно указывает на кластеризацию молекул стеариновых кислот в бислое. Кроме того, найденные значения локальных концентраций для 16-DSA, значительно превосходят таковые для 5-DSA.

Найденные локальные объемные концентрации  $C_{local}$  для 16-DSA и 5-DSA в бислое POPC в единицах  $\text{нм}^{-3}$  приведены на Рисунке 3 Б также в зависимости от  $\chi$ . 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 ( $\sim 2 \text{ нм}$ ). Из Рисунка 3 Б следует, что, во-первых, локальные концентрации  $C_{local}$  как

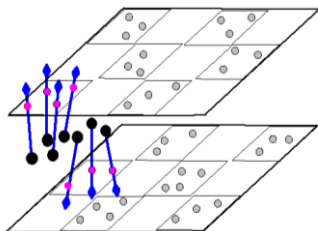
для 5-DSA, так и для 16-DSA превышают  $C_{random}$ . Это указывает на образование наноразмерных кластеров в бислое POPC. Во-вторых,  $C_{local}$  в два раза превышает функцию  $C_{random}$ . Также на Рисунке 3 Б наблюдается превышение локальной объемной концентрации для 16-DSA при  $\chi = 2$  мол % над 5-DSA. Кроме того, данные для 5-DSA на Рисунке 1 Г демонстрируют нелинейность затухания сигнала ДЭЭР при концентрации 2 мол %, чего не происходит для 16-DSA.



**Рисунок 3.** Полученные из данных ДЭЭР локальные концентрации 5-DSA (квадраты) и 16-DSA (кружки) в зависимости от их молярного содержания  $\chi$  в бислоях DOPC/DPPC (А) и POPC (Б). Сплошные линии проведены для удобства (рисунок взят из [1])

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 4. Данная модель была названа моделью «шахматной шкатулки». Чередование приведет к нелинейности спадов ДЭЭР, а также к превышению локальной концентрации над средней в два раза. Кроме того, отталкивание полярных головок 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. 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. Причиной такой чередующейся кластеризации может быть влияние молекул DSA, собранных в одном липидном листке, на противоположный липидный лист.

Также из полученных значений локальных концентраций можно оценить расстояние между спиновыми метками в кластере, оно составит около 2 нм. Если принять среднее расстояние между липидами равным 0,8 нм, то можно сделать вывод, что молекулы стеариновых кислот в кластере разделены примерно 2,6 молекулами липидов.

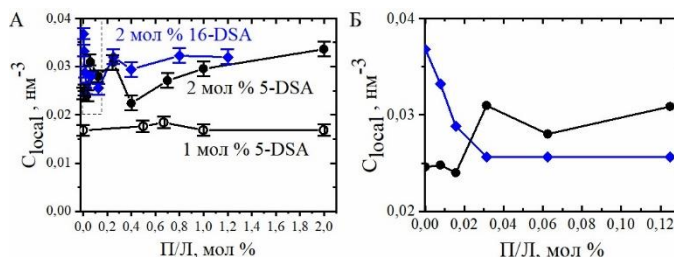


**Рисунок 4.** Схематическая модель кластеризации по типу «шахматная шкатулка». Черные кружки – спиновые метки в 16-DSA, розовые кружки – спиновые метки в 5-DSA

В разделе 3.3.2 рассматривается влияние АМП хальципорина на кластеризацию и наноразмерное пространственное распределение стеариновых кислот в модельных липидных мембранах.

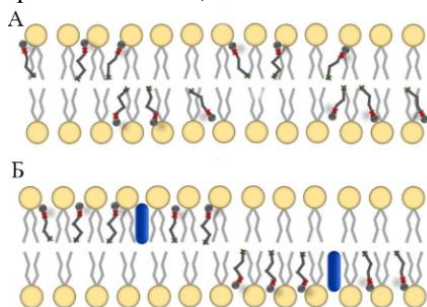
На Рисунке 5 представлены значения  $C_{local}$  для 5- и 16-DSA, полученные в зависимости от концентрации растворенного хальципорина, для двух концентраций 5(16)-DSA, 1 и 2 мол %.

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 Рисунку 3 Б. 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 (П/Л = 1/10 000). Между тем, для концентрации 5-DSA 1 мол % локальная концентрация не меняется при изменении П/Л, что соответствует аналогичным значениям для этой концентрации, показанным на Рисунке 3 Б.



**Рисунок 5.** А – локальные объемные концентрации спин-меченых стеариновых кислот в единицах нм<sup>-3</sup> для 5-DSA и 16-DSA в мембране POPC как функция соотношения пептида к липиду (П/Л). Б – увеличенная часть графика, обозначенного пунктирным прямоугольником (из [4])

Из данных, представленных на Рисунке 5, следует что присутствие хальципорина напрямую влияет на латеральное распределение стеариновых кислот. В отсутствие хальципорина локальная концентрация для 5-DSA ниже, чем концентрация 16-DSA (в мембране POPC наблюдается для  $\chi > 1$  мол % DSA – см. Рисунок 3 Б). 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 6 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 реорганизацию подкластеров стеариновых кислот, схематически показанную на Рисунке 6 Б.



**Рисунок 6.** 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

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 П/Л не наблюдается (Рисунок 5). Это можно объяснить равенством видимых значений  $C_{local}$  для 5-DSA и 16-DSA в отсутствие пептида, которое видно на Рисунке 3 Б. Это равенство означает, что чередующаяся кластеризация стеариновых кислот в двух противоположных листочках не влияет на значения  $C_{local}$  для данной концентрации DSA.

Возможным механизмом притяжения DSA к пептидным молекулам может быть модуляция расположения ацильных цепей липидов, которая сопровождается образованием локальных дефектов. 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. 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 объяснения обнаруженного эффекта необходимы дальнейшие исследования. Эти результаты, вероятно, помогут понять, как короткий пептид убивает бактерии в низких концентрациях, не образуя пор и не разрушая мембрану.

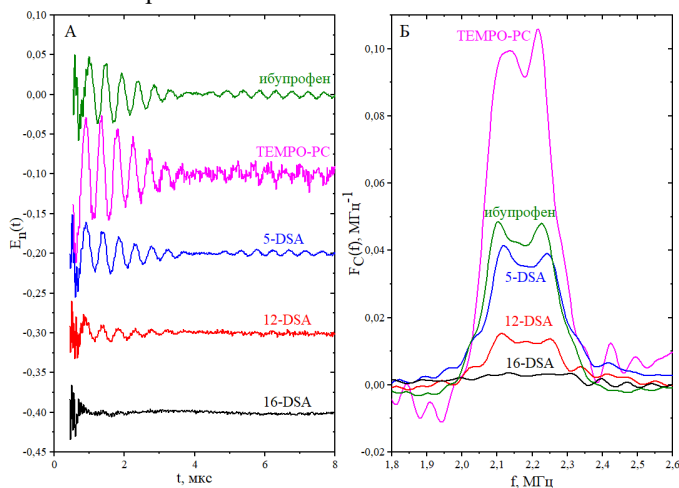
**Четвертая глава** посвящена исследованию локализации спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельных фосфолипидных мембранах разных типов. Здесь используется комбинация методов ESEEM и метода ядерного магнитного резонанса – с использованием эффекта ускорения спиновой релаксации в присутствии спин-меченых молекул. Сочетание этих двух методов может дать полное представление о локализации спиновых меток в мембране.

Описана методика приготовления образцов. Для измерений ESEEM использовался образец, содержащий спин-меченый ибупрофен (спин-меченый диклофенак), в концентрации 1 мол % по отношению к липиду POPC в виде многослойных липосом. В ЯМР экспериментах для приготовления однослойных липосом использовались липиды POPC или DMPC (1,2-димеристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), холестерин, и либо спин-меченый ибупрофен (SL-диклофенак), либо немеченый ибупрофен (немеченый диклофенак). Бицеллы состояли из липидов DHPC (1,2-дигептаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин) и POPC (или DMPC), взятых в молярном соотношении 2:1, с добавлением SL-ибупрофена (или немеченого ибупрофена).

Данные ESEEM для спин-меченого ибупрофена в бислое POPC представлены на Рисунке 7 А. Здесь же приведены аналогично полученные справочные данные для спин-меченых в различных положениях стеариновых кислот и TEMPO-PC. На Рисунке 7 Б представлены Фурье-преобразования сигнала ESEEM. Спиновая метка TEMPO-PC находится непосредственно под воздействием водной оболочки. Таким образом, наибольшая амплитуда наблюдается для образца TEMPO-PC. Для спин-меченых стеариновых кислот, n-DSA



(где  $n$  – номер атома углерода в стеариновой кислоте, к которому присоединен нитроксильный радикал), амплитуда сигнала становится все меньше с увеличением  $n$ , что соответствует удалению от поверхности мембраны.



**Рисунок 7.** А – амплитуды сигнала ESEEM для SL-ибупрофена в бислое POPC, гидратированного  $D_2O$ . Для сравнения приведены аналогичные данные для TEMPO-PC и 5(12,16)-DSA. Б – Фурье-преобразования сигнала ESEEM (из [2])

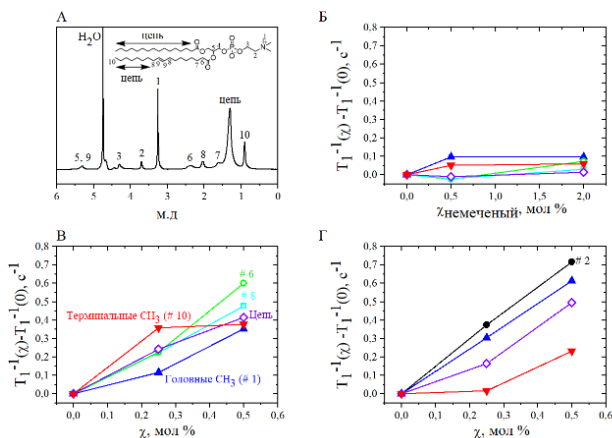
Для SL-ибупрофена амплитуда сигнала ESEEM демонстрирует близость к таковой для образца 5-DSA. Из этого можно сделать вывод, что спиновая метка в молекуле SL-ибупрофена располагается в гидрофобном ядре мембраны. Это согласуется с расчетами, полученными методом молекулярной динамики, для ибупрофена, встроенного в липидный бислой. Согласно литературным данным, ибупрофен преимущественно располагается в гидрофобной части мембраны.

Для спин-меченого диклофенака были выполнены аналогичные эксперименты. Было показано, что амплитуда ESEEM для SL-диклофенака близка к амплитуде 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.

На Рисушке 8 А представлен  $^1H$  ЯМР спектр однослойных липосом POPC с указанием химического сдвига. Спектр состоит из ряда хорошо разрешенных линий, что может позволить селективно исследовать различные положения в липидной цепи. На Рисушке 8 Б, В

и Г представлены данные сигналов ЯМР, которые можно считать наиболее информативными для целей настоящего исследования.

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 8 Б. Из полученных данных можно сделать вывод, что добавление немеченого ибупрофена не оказывает существенного влияния на времена релаксации. На Рисунке 8 В показаны различия в скорости релаксации протонов  $T_1^{-1}$  для SL-ибупрофена в РОРС по сравнению со случаем чистого липида РОРС (когда  $\chi = 0$  мол %). Поскольку наблюдаемые эффекты значительно выше, чем для немеченого ибупрофена (Рисунок 8 Б), эти различия могут быть объяснены влиянием спиновой метки.



При малых концентрациях, когда  $\chi = 0,25$  мол %, наиболее сильный эффект наблюдается для протонов терминальных  $\text{CH}_3$ -групп липидов – см. Рисунок 8 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 8 А) эффект заметно сильнее, чем для метильных протонов полярной головки (группы  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ). Это означает, что спин-меченый ибупрофен проникает в липидный бислой, располагаясь в глубине мембраны. Этот результат согласуется с результатами многочисленных исследований по мембранной локализации ибупрофена, включая исследование ESEEM,

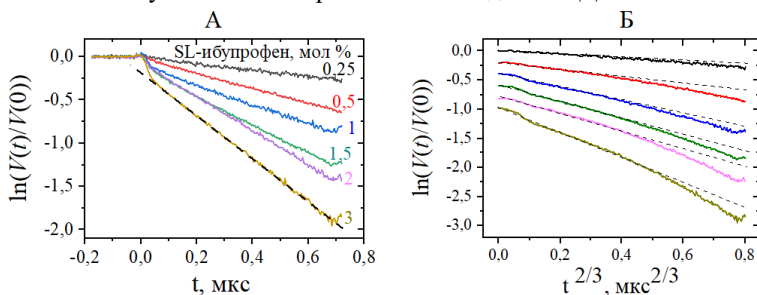
проведенное в данной работе. Из данных на Рисунке 8 В следует, что для  $\chi = 0,5$  мол % распределение SL-ибупрофена в гидрофобной части бислоя становится более равномерным.

На Рисунке 8 Г показана скорость релаксации протонов  $T_1^{-1}$  для спин-меченого ибупрофена в бислое POPC, содержащем 20 мол % холестерина. В данном случае наиболее сильное влияние спиновой метки наблюдается для протонов в полярной головке (в группе  $N^+(CH_3)_3$  и во 2-й позиции – см. Рисунок 8 А), в то время как для терминальных  $CH_3$ -групп липидов влияние оказывается самым низким. Отсюда можно сделать вывод, что добавление холестерина перемещает SL-ибупрофен из гидрофобной области бислоя в область, расположенную 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. 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. Этот результат был подтвержден для немеченого ибупрофена в эксперименте NOESY в данной работе.

Аналогичные эксперименты были проведены для ибупрофена в бицеллах, состоящих из смеси DNPC:POPC (2:1) либо DNPC:DMPC (2:1). Из данных, полученных в первом случае, можно заключить, что спин-меченый ибупрофен локализован в узком диапазоне глубин, расположенном значительно ниже полярной поверхности бислоя, но определенно за пределами центра бислоя. 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.

**Пятая глава** посвящена исследованию наноразмерного пространственного распределения и кластеризации спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельной мембране. Описана методика приготовления образцов. Многослойные липосомы состояли из липида POPC и спин-меченого ибупрофена (диклофенака).

Полученные спады сигнала ДЭЭР показаны на Рисунке 9 в полулогарифмических координатах с двумя различными осями абсцисс:  $t$  на Рисунке 9 А и  $t^{2/3}$  на Рисунке 9 Б. Можно предположить, что линейность данных на Рисунке 9 А согласуется с теоретическим уравнением для трехмерного пространственного распределения, если пренебречь быстрым падением в начале. Но это уравнение не обеспечивает количественного описания экспериментальных данных. Таким образом, можно прийти к выводу, что трехмерное пространственное распределение не может быть применено для описания полученных экспериментальных данных ДЭЭР.

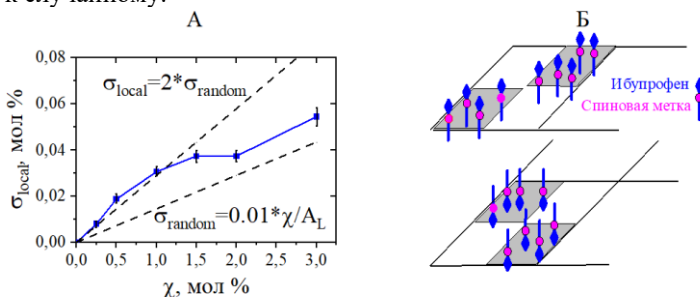


**Рисунок 9.** Спад сигналов ДЭЭР для SL-ибупрофена в бислюе РОРС, полученные для различных молярных концентраций  $\chi$ . А – данные представлены в зависимости от  $t$ ; Б – те же данные в зависимости от  $t^{2/3}$ . Прямые пунктирные линии представляют линейные аппроксимации (из [3])

Данные на Рисунке 9 Б демонстрируют исчезновение быстрого начального спада, наблюдавшегося на Рисунке 9 А. Однако экспериментальные кривые нелинейны, поэтому уравнение для двумерного пространственного распределения не может быть применено напрямую. В данном случае необходимо учитывать межплоскостное взаимодействие между спиновыми метками в двух противоположных листках бислюа, которое, вероятно, приводит к нелинейности. Моделирование для межплоскостного взаимодействия предсказывает нулевой наклон при малых временных задержках для временной зависимости сигнала ДЭЭР, поэтому линейная аппроксимация начального наклона на Рисунке 9 Б может быть непосредственно использована для применения уравнения для двумерного пространственного распределения. На Рисунке 9 Б эти начальные линейные зависимости показаны пунктирными линиями.

На Рисунке 10 А показаны значения  $\sigma_{local}$ , полученные из начальных наклонов данных на Рисунке 9 Б в зависимости от содержания спин-меченого ибупрофена  $\chi$ . Данные приведены в

единицах  $\text{нм}^2$ . Пунктирная линия представляет собой функцию  $\sigma_{\text{random}} = 0,01\chi/A_L$ , которая ожидается для случайного пространственного распределения, где  $A_L$  — площадь, приходящаяся на липид ( $\sim 0,60 \text{ нм}^2$ ). Из данных, приведенных на Рисунке 10 А можно сделать вывод, что во всех случаях  $\sigma_{\text{local}} \geq \sigma_{\text{random}}$ , соответственно, модель двумерного случайного распределения спинов не противоречит экспериментальным данным. Также для  $\chi < 1$  мол %  $\sigma_{\text{local}}$  в два раза больше, чем  $\sigma_{\text{random}}$ . Это превышение свидетельствует о неоднородности пространственного распределения молекул спин-меченого ибупрофена. При  $\chi > 2$  мол % достигается примерное равенство  $\sigma_{\text{local}}$  и  $\sigma_{\text{random}}$ , то есть пространственное распределение SL-ибупрофена в бислое становится ближе к случайному.



**Рисунок 10.** А – локальная поверхностная концентрация SL-ибупрофена  $\sigma_{\text{local}}$  в бислое РОРС как функция молярной концентрации  $\chi$  (синие квадраты). Данные приведены в  $\text{нм}^2$ . Пунктирная линия представляет функцию  $\sigma_{\text{random}} = 0,01\chi/A_L$ . Б – схематическая модель кластеризации спин-меченого ибупрофена «шахматная шкатулка» (из [3])

Выявленная концентрационная зависимость может быть объяснена следующей моделью. При  $\chi < 1$  мол % молекулы SL-ибупрофена преимущественно собираются только в одном листке бислоя, образуя большие кластеры, которые появляются поочередно в двух противоположных листках. Схематически это пространственное распределение напоминает шахматную шкатулку, как показано на Рисунке 10 Б. Тогда в каждом листке бислоя локальная поверхностная концентрация  $\sigma_{\text{local}}$  действительно должна стать в два раза выше. 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 РОРС.

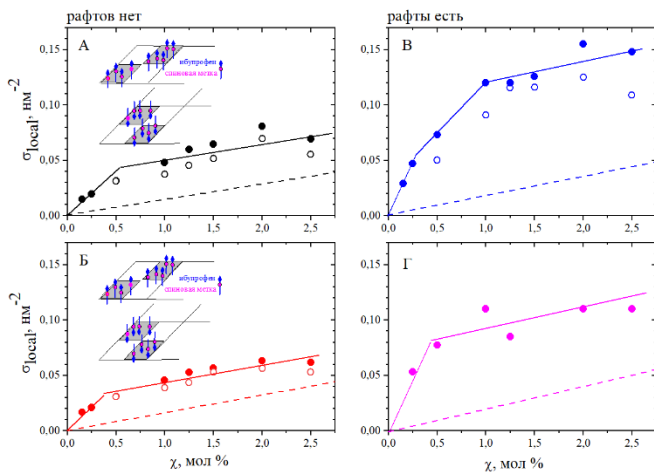
В предыдущей главе было описано, что при малых концентрациях спин-меченого ибупрофена в мембране РОРС, когда  $\chi =$

0,25 мол %, наиболее сильный эффект наблюдается для протонов терминальных  $\text{CH}_3$ -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.

Для спин-меченого диклофенака в бислое POPC были выполнены аналогичные эксперименты и получен аналогичный результат: была предложена модель распределения по типу «шахматной шкатулки».

**Шестая глава** посвящена исследованию влияния липидных рафтов на наноразмерное пространственное распределение и кластеризацию спин-меченых молекул ибупрофена и диклофенака в модельных фосфолипидных мембранах методом ДЭЭР. Описана методика приготовления образцов. 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. К этим липидам добавляли либо спин-меченый ибупрофен, либо диклофенак.

Было обнаружено, что при концентрациях  $\chi > 0,1$  мол % SL-ибупрофена в бислое DOPC/DPPC/холестерин, его локальная поверхностная концентрация, найденная из данных ДЭЭР, оказалась заметно больше, чем это ожидается при случайном пространственном распределении, что свидетельствует о кластеризации. В отсутствие холестерина и при низком содержании холестерина  $x_{\text{chol}} = 10$  мол % найденные локальные значения  $\sigma$  примерно вдвое превышают  $0,01\chi/A_L$  (при  $\chi < 2$  мол%) – см. Рисунок 11 А, Б. Этот результат согласуется с тем, что ранее было обнаружено для SL-ибупрофена в бислое POPC, что было объяснено альтернативной сборкой молекул в двух двухслойных листках (модель «шахматной шкатулки»). При  $\chi > 2$  мол % это чередование, по-видимому, нарушается, что также согласуется с данными для бислоя POPC. Для бислоев состава DOPC/DPPC/холестерин, где концентрация холестерина составляла 20 и 30 мол %, при малых  $\chi$  безразмерная поверхностная концентрация заметно превышала значение  $2\chi$  – см. Рисунок 11 В, Г.



**Рисунок 11.** Локальные поверхностные концентрации SL-ибупрофена в бислоях DPPC/DOPC/холестерин в зависимости от молярной концентрации  $\chi$  при различном содержании холестерина в мол %: 0 (А), 10 (Б), 20 (В) и 30 (Г). Закрашенные кружки – данные ДЭЭР, пустые – данные CW ЭПР, сплошные линии даны для наглядности. Пунктирные линии – функции  $0,01\chi/A_L$  для случайного пространственного распределения (из [7])

Таким образом, кластеризация здесь, кроме возможного чередования в двух листках бислоя, включает в себя еще и сборку молекул в пучки с некоторым разделением между ними. Моделирование спектров CW ЭПР и ДЭЭР показывает, что молекулы внутри кластеров распределены случайным образом на взаимном расстоянии в несколько нанометров. Таким образом, кластеризация опосредована липидами. Также для молекул SL-ибупрофена в мембране DPPC/DPPC характерно двумерное пространственное распределение. Результаты также показывают, что в присутствии холестерина при его концентрации  $\chi_{\text{chol}} \geq 20$  мол % молекулы SL-ибупрофена имеют квазирегулярное латеральное распределение с параметром «сверхрешетки»  $\sim 3,0$  нм. Эту закономерность можно объяснить захватом молекул SL-ибупрофена липидными рафтами. Известно, что липидные рафты могут существовать в системе, состоящей из высокоплавкого и низкоплавкого липида и холестерина. Также делается дополнительное предположение, что липидные рафты имеют наноразмерную субструктуру.

Подобную квазирегулярность можно объяснить, если предположить, что холестерин 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.

Для спин-меченого диклофенака были выполнены аналогичные эксперименты и были получены результаты, подтверждающие сделанные в данной главе предположения.

### **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 (~ 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.