

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ


Направление: 03.03.02 Физика

Профиль: Физика

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ
КИСЛОТЫ С МОДЕЛЬНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕМБРАНОЙ
МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Студент 4 курса группы 06-811


«22» июня 2022 г.

 (Закирова Р.Р.)

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент


«22» июня 2022 г.

 (Халиуллина А.В.)

Научный консультант

д.ф.-м.н., профессор

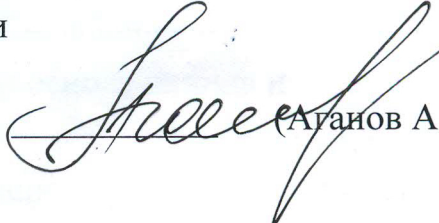
«22» июня 2022 г.

 (Филиппов А.В.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

«22» июня 2022 г.

 (Аганов А.В.)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	5
1.1.1. Биологическая мембрана	5
1.1.2. Липосомы	6
1.1.3. Глицерризиновая кислота.....	8
1.1.4. Комплексы «гость-хозяин».....	10
1.1.5. Взаимодействие глицерризиновой кислоты с биологической мембраной	12
1.2.1. Ядерный магнитный резонанс	14
1.2.2. ^{31}P ЯМР.....	17
1.2.3. ^2H ЯМР	23
1.2.4. Понятие самодиффузии	26
2. ОБОРУДОВАНИЕ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
2.1. Характеристики измерения ЯМР на ядрах ^1H , ^2H и ^{31}P	28
2.2. Основные принципы измерения T_2	29
2.3. Основные принципы измерения коэффициентов самодиффузии методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля	29
2.4. Объекты исследования	31
2.5. Методика приготовления образцов.....	32
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	34
3.1. Исследование фазового поведения систем на основе липидов и глицерризиновой кислоты по данным ^{31}P ЯМР спектроскопии.....	34
3.2. Исследование систем на основе липидов и глицерризиновой по данным ^2H ЯМР спектроскопии.....	37
3.3. ^1H ЯМР спектроскопия в исследовании систем на основе липидов и глицерризиновой кислоты	39
3.4. Диффузионные затухания в системах на основе липида и глицерризиновой кислоты.....	41
3.5. Исследование поперечной ЯМР релаксации на ядрах ^1H для систем из липидов и глицерризиновой кислоты.....	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	48
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	49

ВВЕДЕНИЕ

Перспективным подходом к увеличению проницаемости мембран для молекул лекарств является использование системы доставки лекарств. В настоящее время это широко развивающаяся область фармакологии. Использование систем доставки лекарств позволяет повысить эффективность лекарств, снизить их токсичность и терапевтическую дозу. Системы доставки могут улучшать биодоступность лекарств, повышая растворимость и проницаемость лекарств.

Одним из таких систем является глицирризиновая кислота или глицирризин. Глицирризиновая кислота – вещество, содержащееся в корнях солодки. Данное соединение нашло широкое применение в медицине, благодаря своим противовирусным [1-5], противоязвенным [6], противогриппозным [7] и другим свойствам. Также большим плюсом является растительное происхождение глицирризиновой кислоты.

В результате исследований обнаружили, что глицирризин способен образовывать водорастворимые супрамолекулярные комплексы включения со множеством лекарственных препаратов [8-12]. Такие комплексы характеризуются повышенной растворимостью и биодоступностью, что помогает снизить дозу основного лекарства [13-15] и снижает его токсичность.

Объектами исследования в данной работе являлись глицирризиновая кислота и модель биологической мембраны из фосфолипидов (димиристоилфосфатидилхолина и лецитина). Методом ядерного магнитного резонанса мы исследуем взаимодействие глицирризиновой кислоты с биологической мембраной, роль которой играют фосфолипиды.

Целью данной работы является исследование взаимодействия глицирризиновой кислоты с модельной биологической мембраной методом ядерного магнитного резонанса на ядрах ^1H , ^2H и ^{31}P при варьировании температуры и концентрации глицирризиновой кислоты.

Задачи работы:

1. Исследовать особенности фазового состояния фосфолипидов в присутствии глицирризиновой кислоты (2,5; 4,5; 5 и 10% моль) при различных температурах от 293 до 318 К методом ^{31}P ЯМР;
2. Исследовать эффект глицирризиновой кислоты на динамику углеводородных цепей липидов в мультиламеллярных везикулах по данным ^2H ЯМР спектроскопии.
3. Исследовать молекулярную подвижность компонент систем на основе фосфолипида и глицирризиновой кислоты при различных концентрациях методом ^1H ЯМР релаксометрии;
4. Исследовать трансляционную подвижность систем на основе фосфолипида методом ^1H ЯМР диффузометрии в присутствии глицирризиновой кислоты различной концентрации.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1.1. Биологическая мембрана

Биологическая мембрана – это молекулярная функциональная структура, толщиной 10 нм, ограничивающее внутриклеточные структуры. На рисунке 1 представлена модель клеточной биологической мембраны.

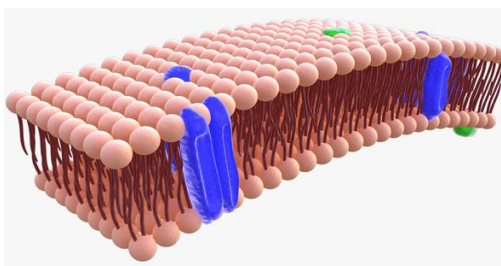


Рисунок 1 – Биологическая мембрана

Клеточные мембраны имеют в своем составе белки, углеводы и липиды. Липиды – это соединения, состоящие из неполярной углеводородной цепи и полярной головки (рисунок 2а). Для них характерны амфифильные свойства, то есть одновременно являются и гидрофильными, и гидрофобными молекулами. В биологической мембране липиды создают бислои (рисунок 2б), где гидрофильные головки обращены к внешней среде, а гидрофобные хвосты обращены друг к другу.

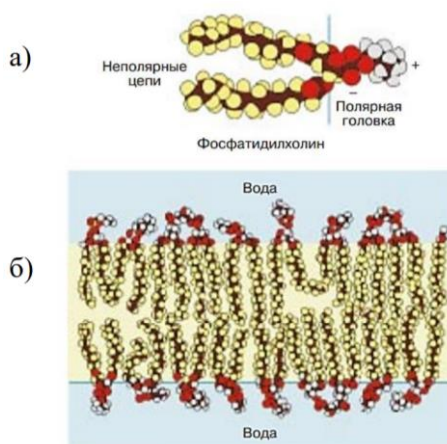


Рисунок 2 а) – молекула фосфатидилохолина;

б) – бислой из молекул липидов (фосфатидилохолин) [16]

Биологические мембраны играют важную роль в жизни клеток и обладают множеством функций.

Функции биологических мембран [17]:

- Барьерная функция. Благодаря данному свойству биомембрана обеспечивает регулируемый обмен с окружающей ее средой.
- Транспортная функция. Одна из важнейших функций, обеспечивающая транспорт веществ в клетку и из нее. Это свойство помогает при доставке питательных веществ, при удалении продуктов обмена, при доставке лекарственных средств.
- Матричная функция. Данная функция нужна для того, чтобы обеспечить определенное местоположение органоидов относительно друг друга и фиксировать данное расположение.
- Механическая функция. Обеспечивает правильное соединение с другими клетками и устойчивость к деформациям.
- Энергетическая функция. Мембраны могут выступать в качестве систем переноса энергии.

1.1.2. Липосомы

Липосомы – это сферические везикулы, имеющие в составе фосфолипиды и состоят из липидных бислоев. Есть два вида липосом – моноламеллярные везикулы с оболочкой из одного бислоя и диаметром от 20 нм и мультламеллярные везикулы, оболочка которых имеет несколько бислоев, а диаметр доходит до 10-50 мкм (рисунок 3).

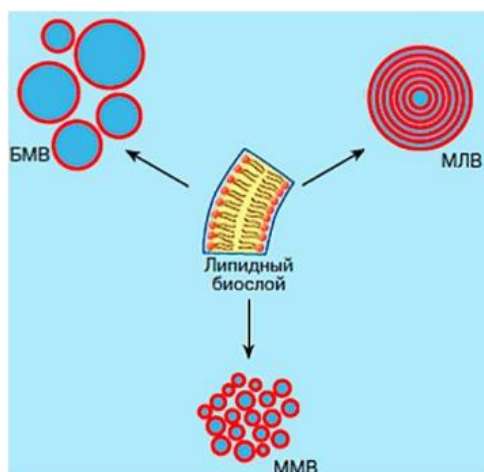


Рисунок 3 – Классификация бислоев

Для больших моноламеллярных везикул (БМВ) характерна оболочка с одним липидным бислоем (диаметр от 100 нм). Мультиламеллярные везикулы имеют диаметр ≈ 50 нм. Они состоят из бислоев, число которых может варьироваться от нескольких десятков до сотен. Липосомы, состоящие из одного бислоя и диаметр которых примерно 20 нм, называются малыми моноламеллярными везикулами (ММВ).

В зависимости от температуры для бислоев характерны ламеллярная гель-фаза и ламеллярная жидкокристаллическая фаза. При температуре ниже фазового перехода (ФП) бислою соответствует гель-фаза, а при температуре выше ФП - жидкокристаллическая. На рисунке 4 представлены типы ламеллярных липидных фаз.

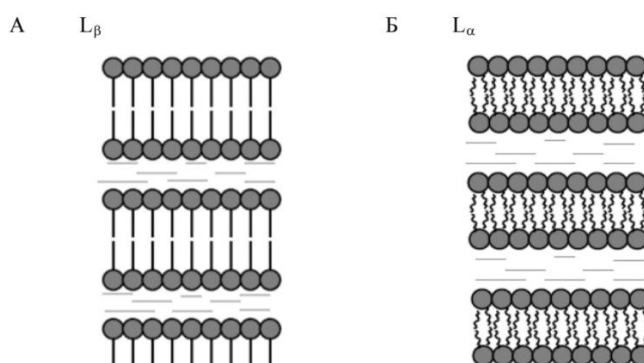


Рисунок 4 – Типы ламеллярных липидных фаз: А – ламеллярная гель-фаза;
Б – ламеллярная жидкокристаллическая фаза

Для жидкокристаллической L_{α} -фазы характерно то, что хвосты липидов становятся подвижными. В данной фазе слоистые структуры расположены упорядоченно, а ацильные цепи – значительно неупорядоченно.

Гель-фаза (L_{β}) характеризуется более плотной упаковкой молекул, упорядоченностью ацильных цепей. Толщина бислоя в L_{β} -фазе выше, чем в жидкокристаллической, так как цепи в гель-фазе максимально вытянуты. Для липидов с объемными полярными головками характерен наклон ацильных цепей, это обозначается штрихом - L_{β}' .

1.1.3. Глицрризиновая кислота

В современном мире широко распространены лекарства на растительной основе. Одним из таких растений является солодка. Солодка гладкая – растение из семейства бобовых (*Fabaceae*). Солодка широко применяется в пищевой и в фармацевтической промышленности. На рисунке 5 представлена солодка:



Рисунок 5 – Солодка

Корень солодки - один из самых древних лекарственных растений, издавна использовавшийся в традиционной китайской, тибетской и индийской медицине для лечения заболеваний легких и воспалительных процессов. Экстракты корня солодки использовались китайскими и тибетскими врачами как противоядия и средства для обезвреживания ядов. Экстракты корня солодки добавляли в лекарства для улучшения их вкусовых качеств и усиления их действия.

В корнях солодки содержится глицирризиновая кислота, которая входит в лекарственные препараты, также используется в качестве подсластителя. Химическая формула глицирризиновой кислоты: $C_{42}H_{62}O_{16}$. На рисунке 6 представлена структура глицирризиновой кислоты.

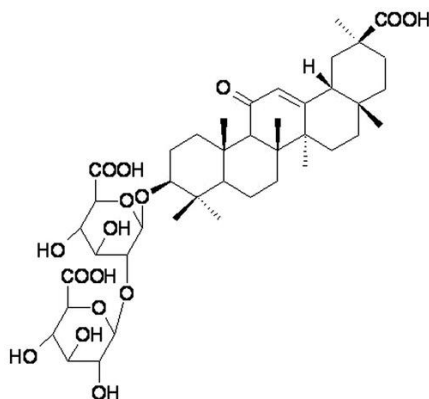


Рисунок 6 – Структура глицирризиновой кислоты

Глицирризин или глицирризиновая кислота - тритерпеновый гликозид, получаемый из корня солодки, он представляет большую ценность для медицины, так как обладает широким спектром фармакологических свойств (противовирусные [1-5], противоязвенные [6], противогриппозные [7] и т.д.). Данное вещество широко используется для профилактики и лечения различных заболеваний: гриппа [7], язв желудка и двенадцатиперстной кишки [6], астмы [18], болезней печени [19] и т.д. Также установлено, что глицирризин активен в ингибировании репликации вируса, связанного с SARS [5]. Помимо ингибирования репликации вируса, глицирризин подавляет адсорбцию и проникновение вируса [3].

Кроме всего прочего, для глицирризиновой кислоты характерны ряд свойств, из-за которых она является перспективным объектом для использования в доставке лекарственных средств. Перспективность заключается в том, глицирризиновая кислота - это амфифильная молекула: гидрофобная - остаток глицирретиновой кислоты, гидрофильная часть - глюкозные кольца.

1.1.4. Комплексы «гость-хозяин»

В современной медицине одна из важных проблем – низкая растворимость лекарственных соединений, причем эта проблема снижает эффективность перорального приема лекарственных средств. Один из способов решения – системы доставки лекарств с помощью комплексов, содержащих хорошо растворимые соединения. Данные системы позволяют снизить дозы и сохранить биодоступность лекарственных препаратов.

Некоторые частицы при взаимодействии друг с другом могут образовывать супрамолекулярные комплексы. Эти частицы делятся на рецепторы («хозяин») и субстраты («гости»). Данные соединения могут использоваться в качестве систем доставки лекарственных препаратов [20].

Молекула «хозяин» часто обладает «полостью», в которую может встраиваться другая молекула «гость». Для данных молекул характерно связывание между собой с помощью водородной связи, гидрофобным взаимодействием или силами Ван-дер-Ваальса. Минусом этих комплексов включения является то, что они могут легко диссоциироваться.

Чаще всего в качестве «хозяев» для доставки лекарств выступают молекулы циклодекстринов. Данные молекулы представляют из себя тороидную форму с гидрофобной полостью и гидрофильной внешней поверхностью (рисунок 7). Для данных молекул характерно образование комплексов включения с большим количеством молекул-«гостей» [20].

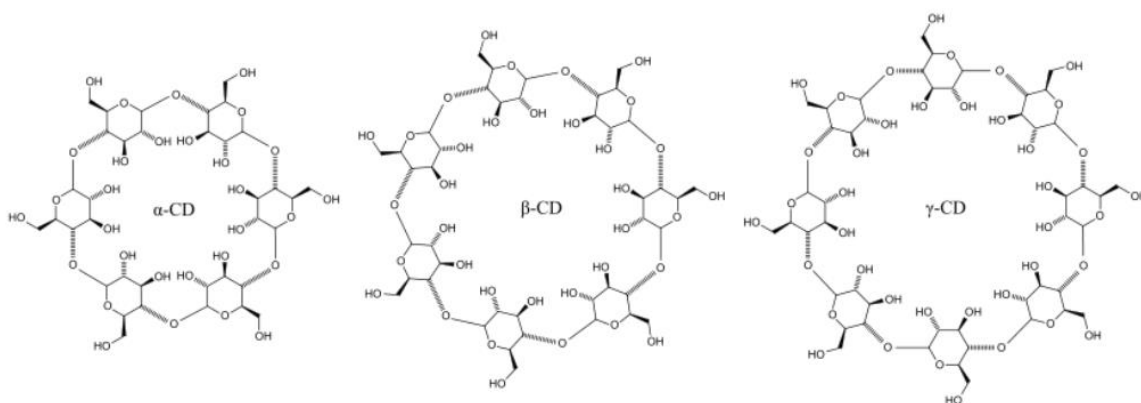


Рисунок 7 – Основные циклодекстрины [20]

Установлено, что циклодекстрины выступают в качестве переносчиков лекарственных препаратов, благодаря чему повышают растворимость гидрофобных молекул. Кроме того, циклодекстрины усиливают проницаемость нерастворимых лекарственных средств, из-за этого лекарственные препараты становятся доступнее на поверхностях биобарьеров и благодаря этому попадают в мембрану, при этом не разрушая липидные слои. При использовании водорастворимых лекарств циклодекстрины так же повышают проницаемость благодаря прямому воздействию на мембрану и увеличивая абсорбацию и биодоступность лекарственного средства [20].

Глицирризиновая кислота также может выступать в качестве «хозяина», пример такого соединения показан на рисунке 8. В отличие от систем доставки на основе циклодекстринов, глицирризиновая кислота образует комплексы не только в водной среде, но и в органических растворителях [20].

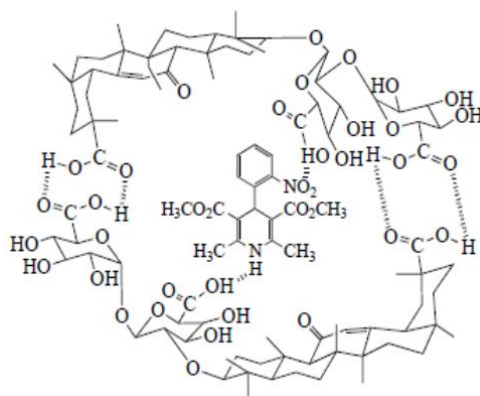


Рисунок 8 – Комплекс глицирризиновой кислоты с нифедипином [21]

Для многих лекарственных препаратов характерна низкая стабильность в растворах так как они являются фоточувствительными, подвержены к окислению и т.д. Супрамолекулярные комплексы, в составе которых глицирризиновая кислота, имеют свойство повышать стабильность лекарств, а также помогают защитит от внешних воздействий. В работах [8, 12]

установили влияние глицирризиновой кислоты на окислительную стойкость лекарств (лютеина и зеаксантина). Лютеин и зеаксантин являются низкорасторимыми молекулами, а также эффективность этих веществ снижаются за счет того, что они являются нестабильными, данные свойства являются большими минусами, так как лютеин и зеаксантин поступают с пищей и не производятся самим организмом. Комплексы зеаксантина и лютеина с глицирризиновой кислотой могут помочь в решении данной проблемы. Исследования показали, что комплексы лютеина и зеаксантина с полисахаридами увеличивают растворимость веществ более чем в 1000 раз [8, 12]. Исследование также показало, что комплексы лютеина и зеаксантина с глицирризиновой кислотой увеличивают окислительную стойкость веществ [8, 12].

1.1.5. Взаимодействие глицирризиновой кислоты с биологической мембраной

Помимо всего прочего глицирризиновая кислота улучшает активность гидрофобных молекул, для этого она встраивается в гидрофобный внутренний слой мембран и изменяет их свойства [20]. На рисунке 9 представлено встраивание глицирризиновой кислоты в липидный бислой.

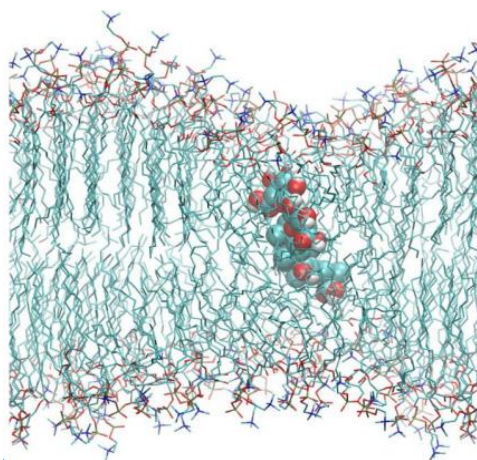


Рисунок 9 – Моделирование встраивания глицирризиновой кислоты в липидный бислой, образованный молекулами дипальмитоилфосфатидилхолина [20]

Ряд проведенных исследований показали возможность повышения растворимости лекарств в десятки раз при использовании комплексов глицирризиновой кислоты с низкорастворимыми лекарственными препаратами, в сравнении с чистым лекарственным соединением. Исследования показали, что соединение фенибута и глицирризиновой кислоты дают возможность снизить дозу лекарственного средства в 16 раз при аналогичном эффекте чистого препарата. Также исследуемое соединение показало повышение способности к запоминанию у животных и снижает сонливость и аллергические реакции из-за приема фенибута. Большим плюсом является снижение токсичности препарата в 1,7 раз [23]. Подобные эффекты наблюдаются и в комплексах глицирризиновой кислоты с нифедипином, эффект от лекарства проявлялся при снижении дозы в 10 раз [11, 23].

Работа [24] показала, что мицеллы глицирризиновой кислоты увеличивают примерно в 5 раз растворимость подофиллотоксина, лекарства для лечения папилломавируса человека. Изучение влияния глицирризиновой кислоты на доставку карведиола показало, что растворимость лекарственного препарата повышается в 59 раз при содержании 0,75% глицирризина. Более того присутствие глицирризиновой кислоты повышает проницаемость карведиола через кожу, чем при применении пропиленгликоливо-этанольной смеси. Однако проницаемость снижается при превышении критической концентрации мицеллообразования [25].

Также исследовалась возможность адресной доставки лекарственных веществ в клетки печени, поверхность гепатоцитов имеет рецепторы глицирризиновой кислоты, что дает возможность использовать ее для адресной доставки лекарств [26, 27].

1.2.1. Ядерный магнитный резонанс

Ядерный магнитный резонанс является одним из основных методов изучения липидного бислоя. В основном используются четыре ядра: ^1H , ^2H , ^{13}C и ^{31}P .

Ядерный магнитный резонанс – резонансное поглощение в сильном внешнем магнитном поле энергии электромагнитного радиочастотного поля ядрами, обладающими магнитными моментами [28]. Чтобы разобрать данное явление рассмотрим классическую модель, состоящую ядер с магнитным моментом μ_i и спином I_i в постоянном магнитном поле \mathbf{B}_0 . Введем лабораторную систему координат, направив вектор постоянного магнитного поля \mathbf{B}_0 в направлении по вертикальной оси z (рисунок 10).

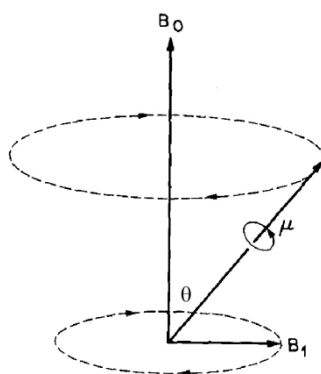


Рисунок 10 – Поля \mathbf{B}_0 и \mathbf{B}_1 в лабораторной системе координат и прецессия вектора μ_i в магнитном поле \mathbf{B}_0

При помещении системы спинов в магнитное поле, каждый спин может принимать одну из двух возможных ориентаций: либо с низкой энергией (направление μ_i вдоль поля \mathbf{B}_0), либо с высокой энергией (направление μ_i антипараллельно \mathbf{B}_0). Когда на данную систему воздействует радиочастотное поле \mathbf{B}_1 , вектор которого всегда находится в плоскости xy , энергией кванта которой $h\nu_0 = \Delta E$ (где ν_0 – частота резонанса, h – постоянная Планка, ΔE – разность энергий), когда происходит поглощение данного кванта – система переходит с низкого энергетического уровня на более высокий и существует

возможность регистрации этого поглощения. Это является основой ядерного магнитного резонанса [29].

Макроскопическая намагниченность M – величина, которая является суммой всех векторов намагниченности всех спинов [29]. При изменении длительности воздействия поля B_1 , M может быть отклонена на любой угол. При воздействии 90° -м радиочастотным импульсом M становится перпендикулярен к направлению B_0 . В этом случае в приемно-передающей катушке появляется сигнал свободной индукции, амплитуда которой равняется A_0 . Данная амплитуда является убывающей функции из-за того, что макроскопическая намагниченность M в конце концов релаксирует к своему первоначальному значению (рисунок 11).

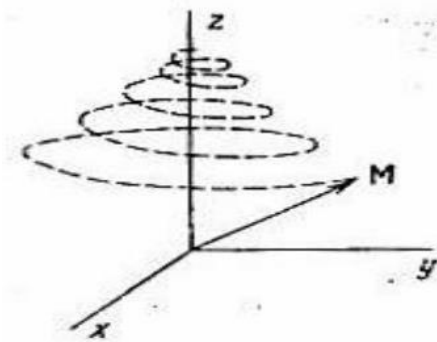


Рисунок 11 – Прецессия вектора M при релаксации

Выделяют два вида ЯМР релаксации [29] – это спин-решеточная с временной константой T_1 и спин-спиновая с временной константой T_2 . Спин-решеточная – это релаксация продольной составляющей M_z к равновесному значению M , в результате взаимодействия возбужденных ядерных спинов с его окружением (решеткой). Спин-спиновой релаксации характерно изменение поперечной составляющей M за время T_2 - это происходит благодаря необратимой потере фазовой когерентности между векторами магнитных моментов ядер [29].

Для того, чтобы измерить T_1 может быть использована последовательность 180° - τ - 90° с разными временами между двумя

последовательными импульсами τ . Благодаря этому возможно установить скорость спада M_z . Уравнения Блоха при $M_x = M_y = 0$ описывают спад:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{-(M_z - M_0)}{T_1} \quad (1)$$

где $M_0 = |M|$

При интегрировании с начальными условиями $M_z = -M_0$ при $t=0$, после чего получаем:

$$M_z = M_0 \times (1 - 2 \exp(-t/T_1)) \quad (2)$$

Однако на практике используют выражение:

$$A_\tau = A_\infty \times (1 - \exp(-t/T_1)) \quad (3)$$

$$\ln(A_\infty - A_\tau) = \ln 2A_\infty - t/T_1 \quad (4)$$

где A_∞ – предельное значение A_τ при очень длительном интервале между 180 и 90 импульсами, A_τ – начальная амплитуда индуцированного сигнала после 90-го импульса, приложенного в момент τ , время T_1 определяют по наклону графика зависимости $\ln(A_\infty - A_\tau)$ от τ [29].

При измерении спин-спиновой релаксации T_2 используют последовательность спинового эха. В данном методе вектор M поворачивается относительно B_0 при воздействии 90-м радиочастотного импульса на 90 градусов, при этом его проекция $M_{xy} = 0$. После чего вектор суммарной намагниченности становится расфазированным [29]. Далее при увеличении времени также увеличивается и фазовая разница m_i векторов намагниченности. Когда время становится равной τ прикладывается 180-й импульс – происходит принудительная фазировка m_i к моменту времени 2τ . В это же время нарастает сигнал свободной индукции до максимального значения. Однако все m_i будут спадать в течение времени 2τ с временным коэффициентом T_2 происходит это из-за процессов поперечной релаксации, начальное значение поперечной намагниченности будет изменяться по закону [29, 30]:

$$M_{xy} = M_{xy0} \times \exp(-t/T_2) \quad (5)$$

При записи ЯМР спектра в спектрометрах используют Фурье-преобразование спада сигнала свободно прецессирующих магнитных моментов ядер, после того, как они возбуждаются радиочастотным импульсом. Фурье-преобразование – это операция в математике, предоставляющая возможность переходить от одной вещественной переменной к другой [30]. На рисунке 12 было приведено схематичное изображение Фурье-преобразования.

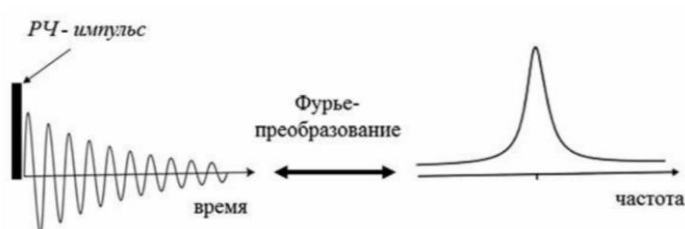


Рисунок 12 – Фурье-преобразование

1.2.2. ^{31}P ЯМР

Химический сдвиг. Анизотропия химического сдвига

Химический сдвиг – это сдвиг резонансной частоты в зависимости от химического состава, созданное внешним магнитным полем B_0 с помощью электронов атомов [31].

Введем локальное поле \vec{B}_{loc} , определяемое выражением:

$$\vec{B}_{loc} = \vec{B}_0 \times (1 - \sigma) \quad (6)$$

где σ – константа экранирования. Можем описать гамильтониан химического сдвига формулой:

$$H_{cs} = -\gamma \vec{B}_0 \vec{\sigma} \hat{I} \quad (7)$$

где γ – гиромагнитное соотношение ядра, \hat{I} – спиновый оператор, $\vec{\sigma}$ – тензор анизотропии химического сдвига (АХС).

Анизотропия химического сдвига - это анизотропное взаимодействие, характеризующееся тензором экранирования $\vec{\sigma}$ [31]:

$$\vec{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (8)$$

где x, y, z – некоторый неопределенный базис.

Когда приложенное магнитное поле B_0 направлено вдоль z , гамильтониан экранирующего взаимодействия может быть описан формулой:

$$H_{CS} = -\gamma \vec{B}_0 \sigma_{zz}^{lab} \hat{I}_z \quad (9)$$

где z – ось в лабораторной системе координат.

Тензор АХС можно диагонализировать, введя для это систему координат главных осей (PAS - Principle Axis System). Диагонализированный тензор АХС имеет вид:

$$\sigma_{PAS} = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix} \quad (10)$$

где $\sigma_{xx}, \sigma_{yy}, \sigma_{zz}$ – главные компоненты тензора АХС. При этом $\sigma_{11} \leq \sigma_{22} \leq \sigma_{33}$ (то есть σ_{11} - наименее экранированный компонент, а σ_{33} – наиболее экранированный компонент).

На рисунке 13 диагонализированный тензор изображен графически в виде эллипсоида.

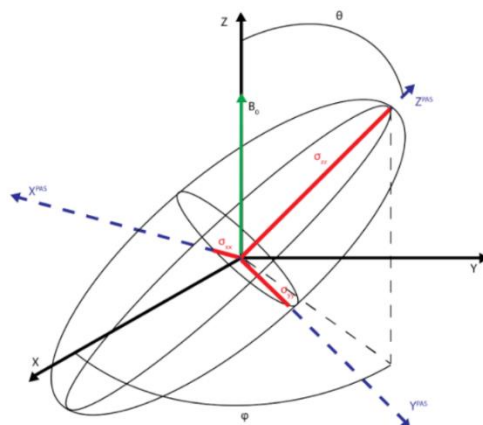


Рисунок 13 – Графическое изображение диагонализированного тензора в виде эллипсоида

Учитывая тот факт, что для оператора углового момента не является существенным преобразование координат, может быть получен химический сдвиг частоты лармора спина ядра:

$$\omega_{CS} = \gamma B_0 \sigma_{zz}^{lab} = -\omega_0 \sigma_{zz}^{lab} \quad (11)$$

где ω_0 – это частота лармора для ядра, находящемся в магнитном поле B_0 .

Значение σ_{zz}^{lab} в PAS определяется:

$$\sigma_{zz}^{lab} = \vec{b}_0^{PAS} \sigma_{zz}^{PAS} \vec{b}_0^{PAS} \quad (12)$$

Вектор \vec{b}_0^{PAS} представим в полярных координатах, определив углы φ и θ по рисунку 10. Тогда уравнение (1.12) примет вид:

$$\omega_{CS} = \langle \omega_0 \sigma_{xx}^{PAS} \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + \sigma_{yy}^{PAS} \cos^2 \theta \sin^2 \varphi + \sigma_{zz}^{PAS} \cos^2 \theta \rangle \quad (13)$$

Химический сдвиг частоты лармора можно представить суммой двух составляющих: изотропной и анизотропной частей:

$$\omega_{CS} = -\sigma_{iso} \omega_0 + \delta / 2 (3 \cos^2 \theta - 1 - \eta \sin^2 \theta \cos(2\varphi)) \quad (14)$$

где η – параметр асимметрии, σ_{iso} – это изотропное значение химического сдвига, δ – химический сдвиг. Кроме этого спектр АХС также характеризуется параметром анизотропии и полной анизотропии тензора.

1. Изотропное значение химического сдвига:

$$\sigma_{iso} = (\sigma_{xx}^{PAS} + \sigma_{yy}^{PAS} + \sigma_{zz}^{PAS}) / 3 \quad (15)$$

2. Параметр асимметрии тензора АХС:

$$\eta = \frac{(\sigma_{xx}^{PAS} - \sigma_{yy}^{PAS})}{\sigma_{zz}^{PAS}} \quad (16)$$

3. Химический сдвиг:

$$\delta = -\omega_0 \sigma_{zz}^{PAS} \quad (17)$$

4. Параметр анизотропии:

$$\Delta = (\sigma_{zz}^{PAS} - \sigma_{iso}) \quad (18)$$

5. Полная анизотропия тензора АХС:

$$\Omega = (\sigma_{zz}^{PAS} - \sigma_{xx}^{PAS}) \quad (19)$$

^{31}P ЯМР

Для всех фосфолипидов характерно наличие как минимум одного атома фосфора. На химический сдвиг влияет не только состав полярной части молекулы, но и число водородных связей. Для атома фосфора характерно высокое естественное содержание и большое гироманнитное отношение ($1,083 \times 10^8$ рад/Тл \times с), что дает возможность получения высокого отношения сигнал/шум. Данные свойства делают метод резонанса на ядрах фосфора наиболее удобным для исследования липидов [32].

Рисунок 14а соответствует широкому спектру ^{31}P ЯМР для порошковых фосфолипидов, которые имеют все возможные ориентации тензора экранирования σ_{xx} , σ_{yy} , σ_{zz} . В водной среде молекулы фосфолипидов самоорганизуются в плоские двухслойные мембраны. В мембранах в жидкокристаллическом фазовом состоянии (L_a), для молекул фосфолипидов характерно претерпевание быстрых осесимметричных переориентаций вокруг своей оси, данный факт приводит к тому, что тензор экранирования частично усредняется. Этот усредненный тензор экранирования является аксиально-симметричным относительно основной оси z, откуда следует $\sigma_x = \sigma_y = \sigma_{\perp}$ и $\sigma_z = \sigma_{\parallel}$. В аксиально-симметричном тензоре экранирования параметр асимметрии равен нулю, это упрощает уравнение (14), поэтому усреднение должно быть выполнено только для угла. Далее, раскачивание

головной группы позволяет дополнительно усреднить движение в мембранах и типичная ширина тензора экранирования имеет параметры $\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \approx 45 - 50 \text{ ppm}$. На рисунке 14б была представлена типичная форма линии ЯМР ^{31}P для многослойных везикул в жидкокристаллическом фазовом состоянии [32].

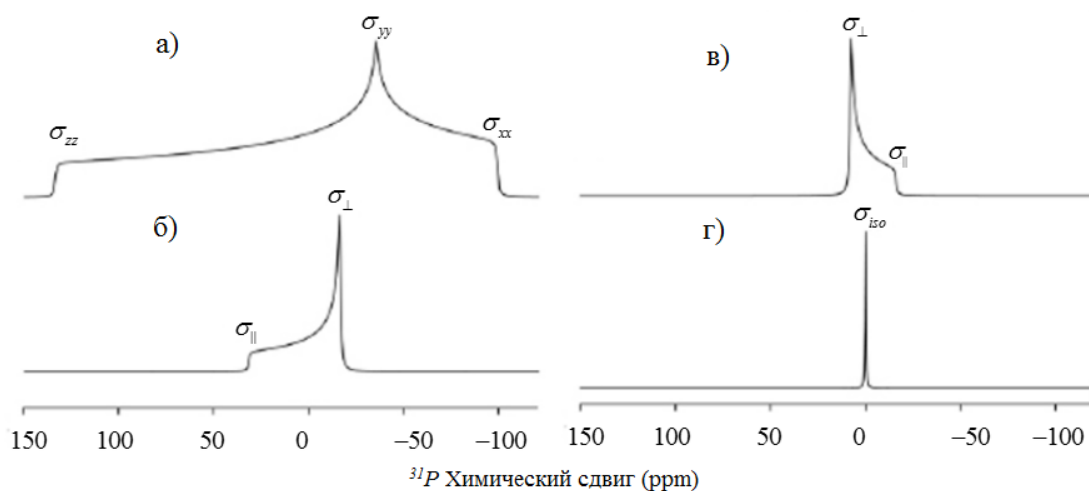


Рисунок 14 – Типичные формы ^{31}P ЯМР спектров [32]

Для фосфатидилэтаноламинов в зависимости от температуры характерна возможность образования перевернутых гексагональных фаз (H_{II}). При такой фазе молекулы фосфолипидов располагаются в цилиндрах с головной группой лицом к внутренней части цилиндра, куда помещена вода. Также существует быстрое закручивание фосфолипида вокруг оси цилиндра. Откуда может быть заключено, что существует осевая симметрия по отношению к нормали поверхности цилиндра, кроме этого и относительно оси цилиндра, это дает дополнительный коэффициент масштабирования $-1/2$. Из вышесказанного следует, что линия ^{31}P ЯМР фазы H_{II} является инвертированной, а также имеет половину ширины в сравнении с L_{α} (рисунок 14в).

Усреднение анизотропной части тензора экранирования происходит за счет быстрых изотропных движений вокруг одной из осей, что приводит к тому, что сигнал ЯМР ^{31}P становится чисто изотропным (рисунок 14г). Эти

изотропные движения являются характерными для молекул фосфолипидов в мицеллах детергента или органических растворителей.

1.2.3. ^2H ЯМР

ЯМР твердого тела квадрупольных ядер

В отличие от ядер со спином $1/2$, квадрупольные ядра имеют спин $>1/2$ и асимметричное распределение нуклонов, приводящее к несферическому положительному распределению электрического заряда. На рисунке 15 изображено графическое представление распределения электрического заряда для квадрупольных ядер.

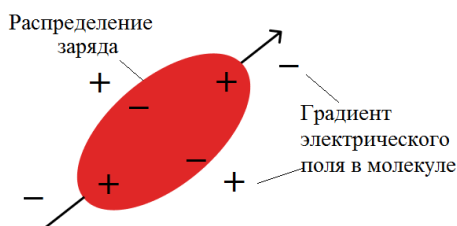


Рисунок 15 – Распределение электрического заряда для квадрупольных ядер

Распределение заряда в ядре описывается выражением, зависящим от ядерного электрического квадрупольного момента – eQ (где e – заряд электрона, Q – величина внешнего электрического квадрупольного момента ядер), его значение не зависит от окружающей среды. Для растянутого ядра значение eQ положительное, а для сплющенного ядра eQ – отрицательно.

Квадрупольные ядра взаимодействуют с градиентами электрического поля (ГЭП) в молекуле: ГЭП – это пространственные изменения электрического поля в молекуле. Квадрупольное взаимодействие зависит от распределения точечных электрических зарядов в молекуле. ГЭП квадрупольного ядра можно описать симметричным тензором:

$$V = \begin{pmatrix} V_{xx} & V_{xy} & V_{xz} \\ V_{yx} & V_{yy} & V_{yz} \\ V_{zx} & V_{zy} & V_{zz} \end{pmatrix} \quad (20)$$

Который также можно диагонализировать:

$$V = \begin{pmatrix} V_{11} & 0 & 0 \\ 0 & V_{22} & 0 \\ 0 & 0 & V_{33} \end{pmatrix} \quad (21)$$

На рисунке 16 тензор ГЭП изображен графически в виде эллипсоида.

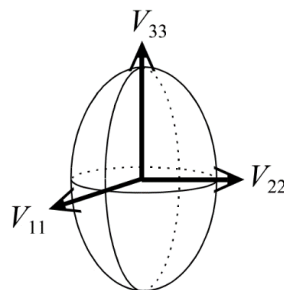


Рисунок 16 – Графическое изображение тензора ГЭП в виде эллипсоида

Главные компоненты тензора ГЭП определяются так, что $|V_{11}| \leq |V_{22}| \leq |V_{33}|$.

Величина квадрупольного взаимодействия определяется выражением:

$$C_Q = \frac{eQ \times V_{33}}{h} \quad (22)$$

где e – заряд электрона, Q – величина внешнего электрического квадрупольного момента ядер, h – постоянная Планка.

^2H ЯМР

^2H ЯМР – подходящий метод для измерения степени упорядоченности липидных систем и единственный метод, позволяющий количественно охарактеризовать анизотропию движения липидных молекул в бислое. Данный метод удобен для изучения структуры, из-за того, что любая метиленовая или метильная группа в молекуле может быть заменена на дейтерированную, не изменяя упаковку и характер движения молекул в бислое. Однако недостатком данного метода является низкая чувствительность, из-за чего необходима высокая концентрация исследуемых веществ [33].

В отличие от ядер ^1H , ^{13}C , ^{19}F и ^{31}P , ^2H имеет целый спин, который равен единице, и обладают квадрупольным моментом, который взаимодействует с электрическим градиентом поля химической связи, из-за чего такое ядро в магнитном поле имеет три проекции на направление внешнего поля H_0 и три уровня энергии. Переход происходит только между соседними уровнями, причем резонансные частоты одинаковые. Энергию квадрупольного взаимодействия можно рассмотреть как мало возмущение «магнитной» энергии, по-разному сдвигающее средний и крайние уровни, из-за чего частоты перехода между уровнями становятся разными.

Градиент электрического поля описывают симметричным диагональным тензором (21), причем ось z связана с наибольшим градиентом поля. Если приложенное магнитное поле B_0 параллельно оси z тензора, то величина квадрупольного расщепления описывается уравнением 1.23 [33]:

$$\Delta\nu_Q(B_0 \parallel z) = \frac{3}{2} \frac{eQ}{h} V_{zz} = \frac{3}{2} \frac{e^2 qQ}{h} \quad (23)$$

где $V_{zz} = eq$ – градиент электрического поля, h – постоянная Планка, eQ – квадрупольный момент ядра.

Для тензора градиента электрического поля связей C-D или O-D характерна аксиальная симметричность, и максимальное значение V_{zz} совпадает с направлением связи, а $V_{xx} = V_{yy}$. В данном случае квадрупольное расщепление для любой другой ориентации поля относительно оси z описывается следующим уравнением:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} \frac{e^2 qQ}{h} (3\cos^2 \theta - 1) S_{CD} \quad (24)$$

где $(e^2 qQ/h)$ – константа статического квадрупольного расщепления для связи C–D (~ 167 кГц), q – заряд ядра, θ – угол между нормалью бислюа и направлением внешнего магнитного поля B_0 , параметр порядка S_{CD} – это усредненная по времени функция. Для связей C–D липидов, S_{CD} рассчитывается с использованием следующего уравнения:

$$S_{CD} = \frac{1}{2} 3 \cos^2 \varphi - 1 \quad (25)$$

где φ - угол между нормалью к мембране и связью C–D.

Увеличение (уменьшение) значения S_{CD} для связи C–D в липидной бислоидной системе с осевой симметрией связана с транс-гошевскими вращательными изомеризациями мицильных групп, молекулярными движениями и упорядочением липидов в системе.

1.2.4. Понятие самодиффузии

Процесс самодиффузии – это пространственное движение молекул в материальной среде, находящегося в состоянии термодинамического равновесия из-за теплового движения [34].

Математическое описание для данного рода движений используется пропагатор $P(\vec{r} - \vec{r}_0, t)$. Эта функция - плотность условной вероятности обнаружения центра тяжести рассматриваемой молекулы в точке с радиусом \vec{r} в момент времени t при условии, что в начальный момент времени он находился в точке с радиусом \vec{r}_0 .

При достижении $t \gg \tau_{max}$, где τ_{max} – наибольшее время корреляции, которые связаны с пространственными степенями свободы данной молекулы, пропагатор будет описываться формулой [34]:

$$P(\vec{r} - \vec{r}_0, t) = \frac{1}{(4\pi D_s t)^{3/2}} \exp\left(-\frac{|\vec{r} - \vec{r}_0|^2}{4D_s t}\right) \quad (26)$$

Режим, при котором достигается условие $t \gg \tau_{max}$ - диффузионный, а относящиеся к данному условию перемещения молекул – самодиффузия. Параметр D_s – это коэффициент самодиффузии (КСД).

С помощью пропагатора рассчитывают среднеквадратичное смещение молекулы за время t , для этого используют уравнение Эйнштейна:

$$\left\langle \left[\vec{r}(t) - \vec{r}_0 \right]^2 \right\rangle = 6D_s t \quad (27)$$

Алгоритма для расчета в нетривиальных случаях τ_{max} и D_s нет, однако существует связь с автокорреляционной функцией скорости молекулы $\langle \vec{v}(t) \times \vec{v}(0) \rangle$, где \vec{v} - вектор скорости центра масс. Для этого рассмотрим:

$$\vec{r}(t) - \vec{r}_0 = \int_0^t \vec{v}(\tau) d\tau \quad (28)$$

Возведем (28) в квадрат, далее статистически усредним, а также учтем стационарность корреляционной функции, после чего получим:

$$\left\langle \left[\vec{r}(t) - \vec{r}_0 \right]^2 \right\rangle = 2 \int_0^t (t - \tau) \langle \vec{v}(\tau) \times \vec{v}(0) \rangle d\tau \quad (29)$$

Когда наступает диффузионное движение ($t \gg \tau_{max}$), (1.29) преобразуется:

$$\left\langle \left[\vec{r}(t) - \vec{r}_0 \right]^2 \right\rangle = 2t \int_0^\infty \langle \vec{v}(\tau) \times \vec{v}(0) \rangle d\tau \quad (30)$$

Сравнивая выражения (30) и (27) и получили:

$$D_s = \frac{1}{3} \int_0^\infty \langle \vec{v}(\tau) \vec{v}(0) \rangle d\tau \quad (31)$$

Чтобы на практике определить коэффициент самодиффузии D_s , пользуются соотношением Эйнштейна-Стокса, являющегося следствием уравнения Ланжевена для классической теории броуновского движения. Это выражение связывает коэффициент трения f с D_s [34]:

$$D_s = \frac{kT}{f} \quad (32)$$

где k – константа Больцмана, T – температура.

Из выражения (1.32) можем получить Гидродинамическое уравнение Стокса-Эйнштейна для сферических частиц в жидкостях [34]:

$$D_s = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (33)$$

2. ОБОРУДОВАНИЕ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристики измерения ЯМР на ядрах ^1H , ^2H и ^{31}P

При измерении и регистрации ЯМР спектров на ядрах водорода (^1H), дейтерия (^2H) и фосфора (^{31}P) использовался импульсный спектрометр с Фурье-преобразователем Avance III 400 фирмы «Bruker», при варьировании температуры от 293 до 328 К с шагом 5-10 К, на кафедрах медицинской физики и молекулярных систем КФУ.

В данной работе для ядер дейтерия (^2H) была использована последовательность твердотельного эха, которая показана на рисунке 17. Измерения проводились на частоте резонанса 61,44 МГц.

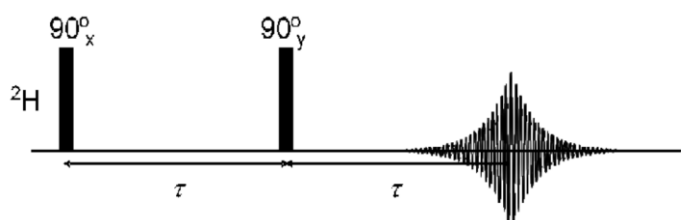


Рисунок 17 – Последовательность solid echo, использованная для получения ^2H спектров ЯМР

Для измерения и регистрации ЯМР спектров на ядрах водорода (^1H) и фосфора (^{31}P) использовалась простая одноимпульсная последовательность, которая представлена на рисунке 18. Измерения проводились на частотах резонанса 400,26 МГц (для водорода) и 162,03 МГц (для фосфора).

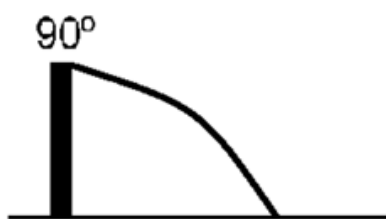


Рисунок 18 – Одноимпульсная последовательность, использованная для получения ^1H и ^{31}P спектров ЯМР

2.2. Основные принципы измерения T_2

Для установления времени спин-спиновой (T_2) релаксации может быть использован метод Карра-Парселла-Мейбума-Гилла (КПМГ): $90_x^0 - \tau - (180_y^0 - 2\tau(\text{эхо}))_n$. Для данной методики характерно снижение влияния диффузии на значение поперечной релаксации. На рисунке 19 была представлена эта последовательность:

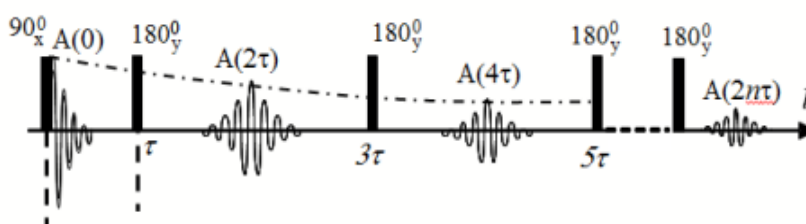


Рисунок 19 – Импульсная последовательность Карра-Парселла-Мейбума-Гилла

На рисунке 19 при $t=(2n\tau)$ изображен сигнал спинового эха, для которого значение амплитуды задается выражением:

$$A(t) = A(0) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (34)$$

2.3. Основные принципы измерения коэффициентов самодиффузии методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля

При установлении значения коэффициента самодиффузии (КСД) может быть использована зависимость сигнала спинового эха от величины постоянного градиента магнитного поля. Для этого использовали трехимпульсную последовательность (стимулированное эхо). Эта последовательность представлена на рисунке 20.

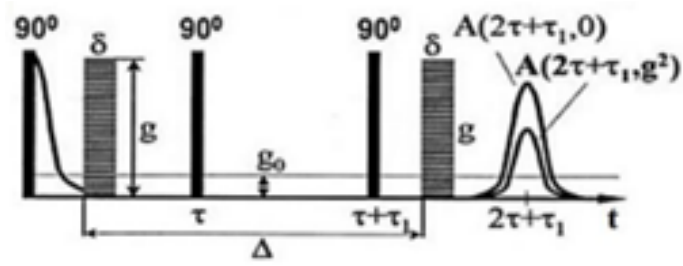


Рисунок 20 – Трехимпульсная последовательность (стимулированное эхо)

Функция для определения затуханий амплитуды сигнала эхо для последовательности стимулированного эхо:

$$A(2\tau, \tau_1, g^2) = \frac{A(0)}{2} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{\tau_1}{T_1}\right) \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_s D_s) \quad (34)$$

где τ – время между первыми двумя 90° -ыми импульсами, τ_1 – время между вторым и третьим 90° -ыми импульсами, T_1 – время спин-решеточной релаксации.

Выражение затухания амплитуды стимулированного эхо для систем с разными временами релаксации (T_{1i} и T_{2i}) и коэффициентами самодиффузии (D_i):

$$A(2\tau, \tau_1, g^2) = \frac{A(0)}{2} \sum_i p_i' \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_{si}),$$

$$p_i' = \frac{p_i \left(-\frac{2\tau}{T_{2i}} - \frac{\tau_1}{T_{1i}}\right)}{\sum_i p_i \exp\left(-\frac{2\tau}{T_{2i}} - \frac{\tau_1}{T_{1i}}\right)}, \quad (35)$$

где p_i – относительная доля i -ой компоненты, $\sum_i p_i' = 1$.

Результаты экспериментов были обработаны с помощью программ TopSpin (<https://www.bruker.com/protected/en/services/software-downloads/nmr.htm>), dmfit (<https://nmr.cemhti.cnrs-orleans.fr/dmfit>) и OriginPro 2022b (<https://www.originlab.com>).

2.4. Объекты исследования

Объектами исследования в данной работе являлись мультиламеллярные везикулы, в составы которых входили фосфолипиды – димиристоилфосфатидилхолина, дейтерированного димиристоилфосфатидилхолина, фосфатидилхолина и глицерризиновой кислоты.

Характеристики глицерризиновой кислоты и липидов:

1. ДМФХ (димиристоилфосфатидилхолин) - вещество с молекулярной формулой $C_{36}H_{72}NO_8P$ и молекулярной массой 677.93 г/моль, температура перехода из жидкокристаллического состояния в состояние гель фазы - $24^\circ C$. Приобретен в Sigma (St. Louis, MO). На рисунке 21 представлена структура ДМФХ.

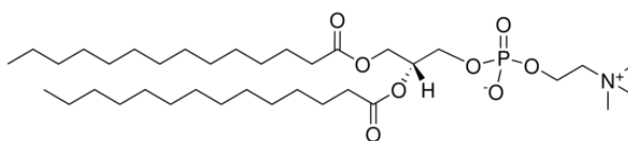


Рисунок 21 – Структура ДМФХ

2. ДМФХ-d54 (дейтерированный димиристоилфосфатидилхолин) - вещество с молекулярной формулой $C_{36}H_{72}NO_8PD_{54}$ и молекулярной массой 732.27 г/моль, температура перехода из жидкокристаллического состояния в состояние гель фазы - $24^\circ C$. Приобретен в Sigma (St. Louis, MO). На рисунке 22 представлена структура ДМФХ-d54.

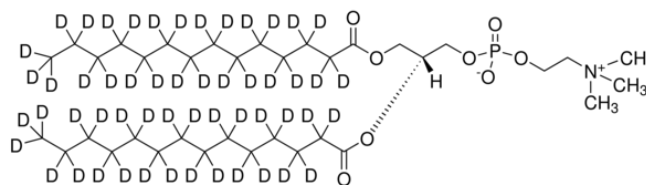


Рисунок 22 – Структура ДМФХ-d54

3. На рисунке 23 представлен соевый лецитин – липоид S100. В данной работе использовался соевый лецитин марки Липоид S100, который

содержит >94% фосфатидилхолина и имеет молекулярную массу 758,1 г/моль. Образец был приобретен в AVANTI Polar Lipids.

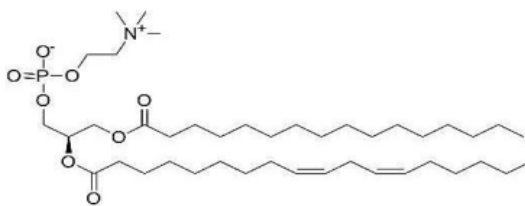


Рисунок 23 – Структура липоида S100

4. Глицирризиновая кислота (ГК) – вещество, имеющее молекулярную формулу $C_{42}H_{62}O_{16}$ молекулярной массой 822.94 г/моль. На рисунке 24 представлена структура ГК.

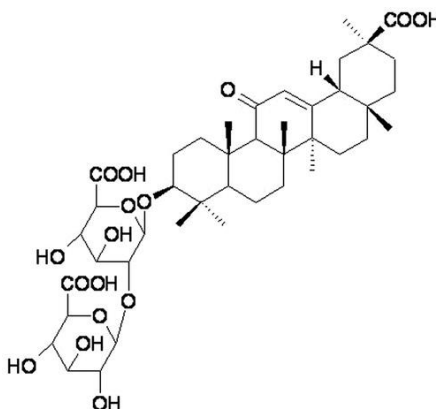


Рисунок 24 – Структура глицирризиновой кислоты

2.5. Методика приготовления образцов

Для приготовления мультиламеллярных везикул сначала смесь липидов и глицирризиновой кислоты растворили в этаноле. Затем произвели выпаривание растворов потоком инертного газа, далее поместили их в вакуум (лиофилизация) на 24 часа для полного высыхания образцов. Далее образцы гидратировались дейтерированной или дистиллированной водой в соотношении 50% на 50% по весу. После чего были подвергнуты 3-4 циклам заморозки при $T = -70^{\circ}C$ и оттаивания при $T \approx 40^{\circ}C$. Далее образцы были подвергнуты воздействию ультразвука в течение 20 минут.

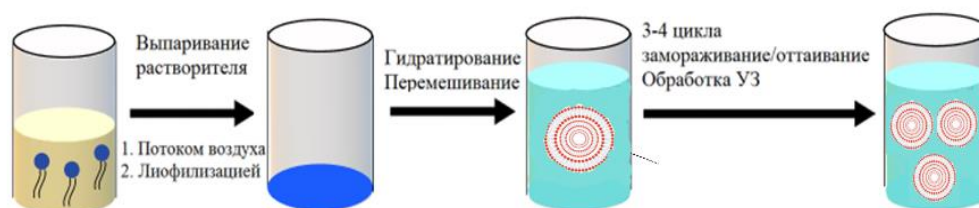


Рисунок 25 – Схематическое представление описанной выше методики приготовления образцов

Для проведения эксперимента приготовили следующие образцы:

- Суспензия липосом из димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) и дейтерированного димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ-d54) (15,3 вес %);
- Суспензия липосом из димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) и дейтерированного димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ-d54) с концентрацией глицирризиновой кислоты 5 и 10 моль % по отношению к липидам.
- Суспензия липосом из фосфатидилхолина.
- Суспензия липосом из фосфатидилхолина с концентрацией глицирризиновой кислоты 2,5 и 4,5 моль % по отношению к липидам.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Исследование фазового поведения систем на основе липидов и глицирризиновой кислоты по данным ^{31}P ЯМР спектроскопии

При анализе структурной организации и фазового поведения липидных бислоев применяется метод ЯМР спектроскопии на ядрах ^{31}P . Этот метод характеризуется высокой чувствительностью к молекулярной ориентации полярных частей фосфолипидов, а также к изменению структуры при добавлении различных соединений в липидный бислой.

Системы, которые были исследованы в данной работе, имеют аксиально-симметричную форму ^{31}P ЯМР спектров. На рисунке 26а был представлен ^{31}P ЯМР спектр для суспензии димиристоилфосфатидилхолина и дейтерированного димиристоилфосфатидилхолина при температуре 303 К.

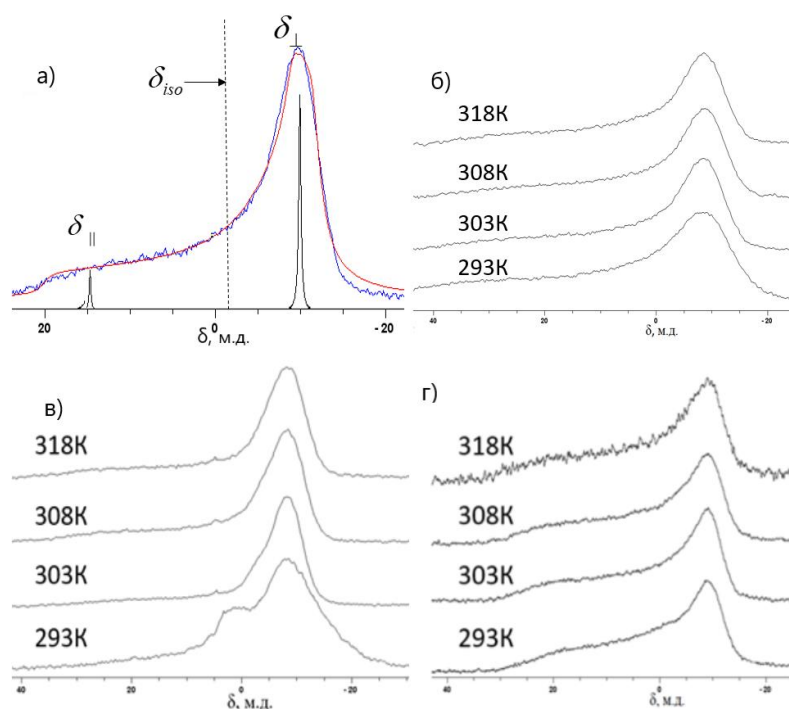


Рисунок 26 – а) ^{31}P ЯМР спектр суспензии из ДМФХ и ДМФХ-d54 при температуре 303 К. б) ^{31}P ЯМР спектры суспензии из ДМФХ и ДМФХ-d54 при нагревании $T=293\text{-}318$ К. в) ^{31}P ЯМР спектры суспензии из ДМФХ, ДМФХ-d54 и ГК (5 моль%) при нагревании $T=293\text{-}318$ К. г) ^{31}P ЯМР спектры суспензии из ДМФХ, ДМФХ-d54 и ГК (10 моль%) при нагревании $T=293\text{-}318$ К

Для данного спектра характерен высокий пик в области -10 м.д. (δ_{\perp} - компонента, которая направлена перпендикулярно магнитному полю), а также имеется широкое «плечо» в области 15 м.д. (δ_{\parallel} - компонента, которая направлена параллельно магнитному полю). Данная форма линии является аксиально-симметричной, что говорит о том, что суспензия из липосом из ДМФХ и ДМФХ-d54 (15,3 вес %) находятся в ламеллярной жидкокристаллической фазе L_{α} .

При добавлении глицирризиновой кислоты и варьировании температуры системы от 293 К до 318 К с шагом 5-10 К (рисунок 26 б, в, г) мы можем наблюдать сохранение форм линий спектров – это может свидетельствовать о том, что суспензии из ДМФХ и ДМФХ-d54 находятся в ламеллярной жидкокристаллической фазе для всего диапазона температур.

На рисунке 27 были представлены спектры ^{31}P ЯМР для суспензий из ДМФХ, ДМФХ-d54 и глицирризиновой кислоты (5 моль%) при температуре 308 К.

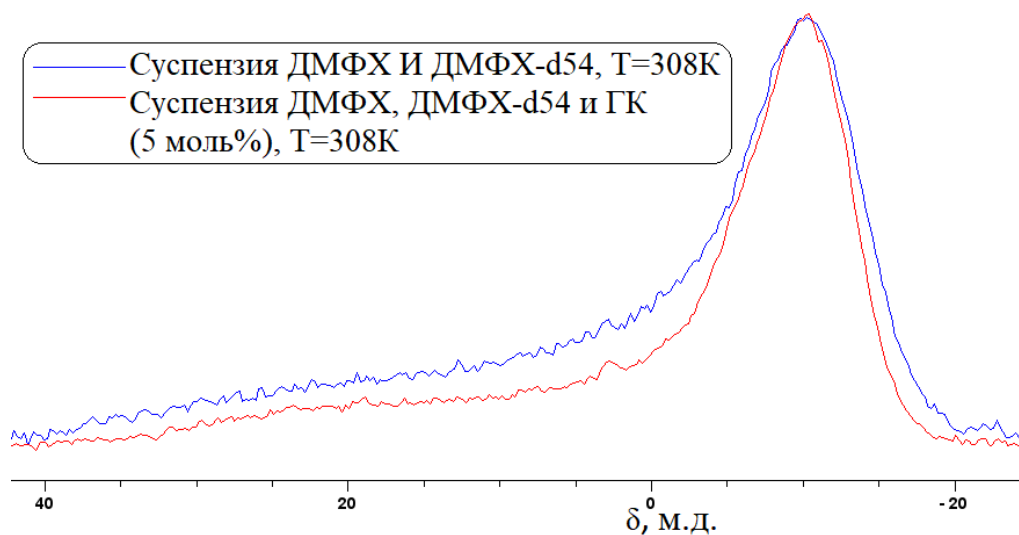


Рисунок 27 – ^{31}P ЯМР спектры суспензии из ДМФХ, ДМФХ-d54 и глицирризиновой кислоты (5 моль%) при температуре 308 К

Как можно установить из рисунка, добавление глицирризиновой кислоты в суспензию из липидов не изменяет форму линий спектров, откуда следует, что суспензия находится в ламеллярной жидкокристаллической

фазе. Кроме того, на рисунке 27 видно, что при добавлении глицирризиновой кислоты (5 моль%) приводит к сужению спектра, что может свидетельствовать о повышении подвижности фосфатной группы. Более того, заметно изменяются формы плеч спектров. Данный эффект отражает изменение упаковки липидов и геометрических параметров бислоя.

На рисунке 28 представлен ^{31}P ЯМР спектр для суспензии из фосфатдилхолина и глицирризиновой кислоты (2,5 и 4,5 моль%) при различных температурах ($T=293\text{-}318\text{K}$).

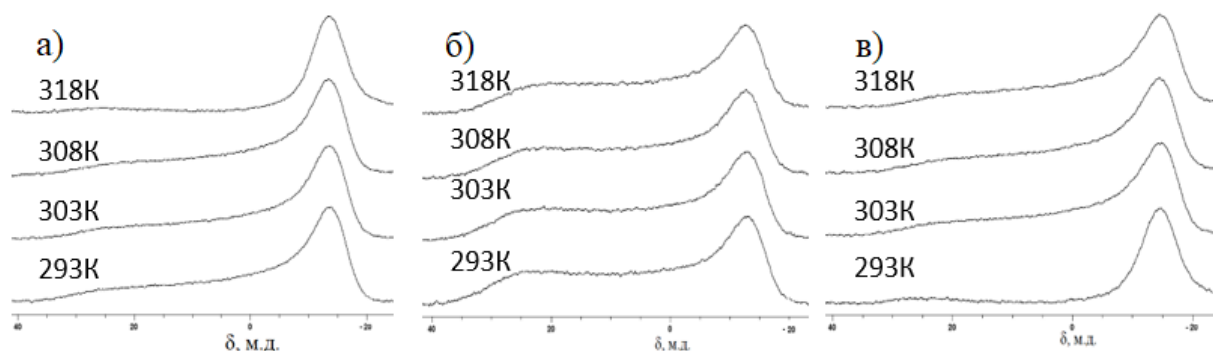


Рисунок 28 – ^{31}P ЯМР спектры для суспензии из: а) фосфатидилхолина; б) фосфатидилхолина и глицирризиновой кислоты (2,5 моль%); в) фосфатидилхолина и глицирризиновой кислоты (4,5 моль%)

Так же, как и суспензии из ДМФХ и ДМФХ-d54, системы из фосфатидилхолина и глицирризиновой кислоты имеют аксиально-симметричную форму и находятся в ламеллярной жидкокристаллической фазе для всего диапазона температур.

На рисунке 29 изображены ^{31}P ЯМР спектры для суспензий из лецитина и глицирризиновой кислоты (4,5 моль%) при температуре 308 К. Спектр для системы с концентрацией глицирризина 4,5 моль% и чистого фосфатидилхолина практически совпадают, что свидетельствует о том, что глицирризиновая кислота не оказывает влияния на поведение фосфатной группы.

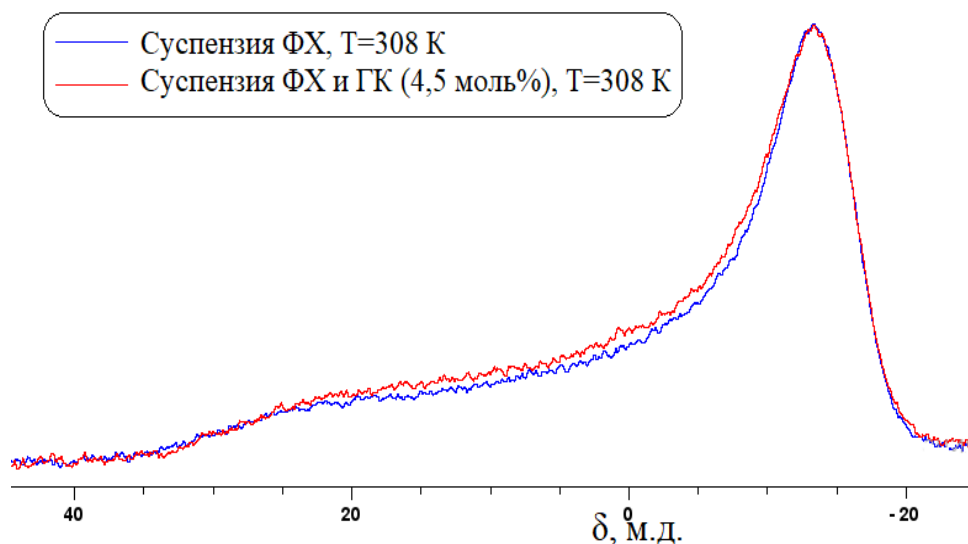


Рисунок 29 – ^{31}P ЯМР спектры для систем из фосфатидилхолина и глицирризиновой кислоты (4,5 моль%) при температуре 308 К

Исходя из вышеперечисленного можно заключить, что анализ ^{31}P ЯМР спектров исследуемых образцов показал, что системы находятся в ламеллярной жидкокристаллической фазе (область формирования липосом).

3.2. Исследование систем на основе липидов и глицирризиновой по данным ^2H ЯМР спектроскопии

На рисунке 30 представлены спектры ^2H ЯМР суспензии из ДМФХ и ДМФХ-d54 при температуре T=308 К без глицирризиновой кислоты и с различными ее концентрациями.

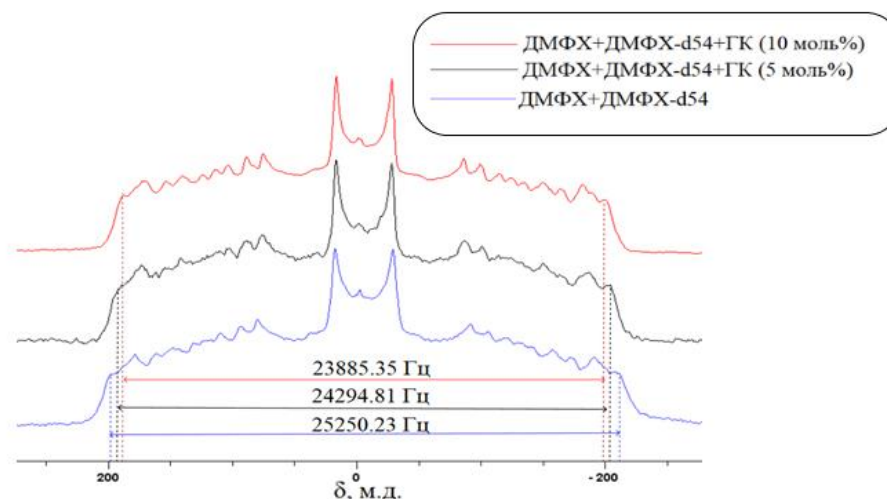


Рисунок 30 – ^2H ЯМР спектры суспензии из ДМФХ и ДМФХ-d54 при температуре $T=308\text{ K}$ в отсутствии и в присутствии глицирризиновой кислоты

В центре ^2H ЯМР спектра наблюдаются три резонансные линии. Центральная линия соответствует дейтронам воды. Вблизи нее расположены две симметричные линии, относящиеся к CD_3 группам липидов. Остальные резонансные линии с большим расщеплением соответствуют CD_2 группам в хвостовой части.

На рисунке 31 представлено приближение к трем центральным резонансным линиям ^2H ЯМР спектров при температуре $T=308\text{ K}$ в отсутствии и в присутствии глицирризиновой кислоты.

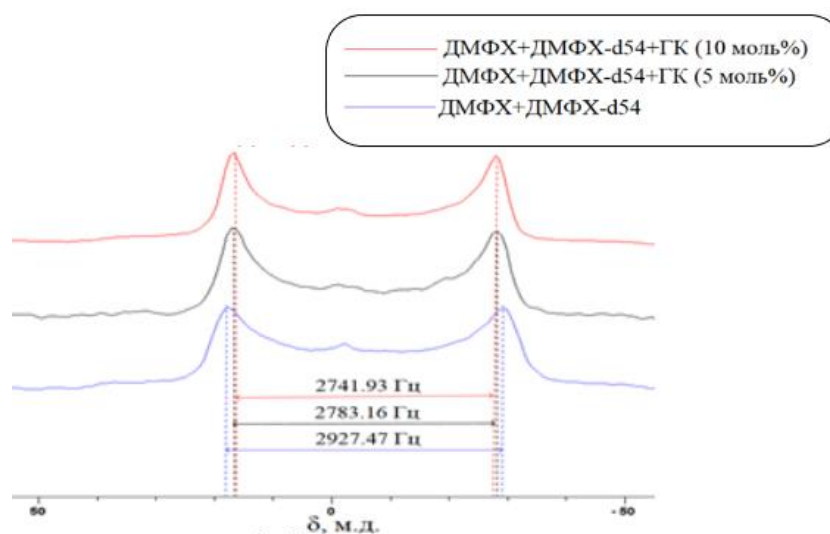


Рисунок 31 – Три центральные резонансные линии ^2H ЯМР спектров при температуре $T=308\text{ K}$ в отсутствии и в присутствии глицирризиновой кислоты

В таблице 1 представлены значения квадрупольных расщеплений для образцов с ДМФХ и ДМФХ-d54 без глицирризиновой кислоты и с различными ее концентрациями.

Таблица 1 – значения квадрупольных расщеплений

	ДМФХ+ДМФХ-d54	ДМФХ+ДМФХ-d54+ГК (5%моль)	ДМФХ+ДМФХ-d54+ГК (10%моль)
$\Delta\nu_Q$	25,2 кГц	24,3 кГц	23,9 кГц
$\Delta\nu_Q^{CD3}$	2,9 кГц	2,8 кГц	2,7 кГц

При добавлении глицирризиновой кислоты мы наблюдаем сужение спектральных линий и уменьшение квадрупольного расщепления, что говорит об уменьшении упорядоченности цепи.

3.3. ^1H ЯМР спектроскопия в исследовании систем на основе липидов и глицирризиновой кислоты

На рисунке 32 представлены ^1H ЯМР спектры суспензий липосом из лецитина, суспензий из лецитина и глицирризиновой кислоты с концентрацией глицирризиновой кислоты 2,5 моль% и 4,5 моль% при температуре 308 К. Для того, чтобы идентифицировать полученные сигналы от протонов фосфатидилхолина и глицирризиновой кислоты, снятые спектры были соотнесены со спектрами, полученными с помощью программы EasySpin.

Рассмотрим ^1H ЯМР спектр фосфатидилхолина. На нем наблюдаются три высокие резонансные линии. В области 1-0,8 м.д. наблюдаются сигналы соответствующие концевым CH_3 группам углеводородной цепи фосфатидилхолина, а вблизи 1,8 м.д. наблюдаются пики от $(\text{CH}_2)_n$ групп

«хвоста» фосфолипида. Полярной «головке» липида соответствует резонансная линия вблизи 5 м.д.

На ^1H ЯМР спектре водного фосфатидилхолина наблюдаются сигналы в области 3-1 м.д., которые относятся к ядрам водорода $\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{C}$, $(\text{CH}_2)_n$ и CH_3 групп углеводородной цепи липида, в диапазоне 5,5-3 м.д. получены сигналы от «головок» фосфолипидов, к которым относятся POCH_2 , CH_2N и $\text{N}(\text{CH}_3)$ группы.

Формы линий ^1H ЯМР спектров суспензии фосфатидилхолина и суспензии фосфатидилхолина и глицирризиновой кислоты (2,5 и 4,5 моль%) схожи. При добавлении глицирризиновой кислоты спектральные линии уширяются, что может быть связано с образованием агрегатов [35].

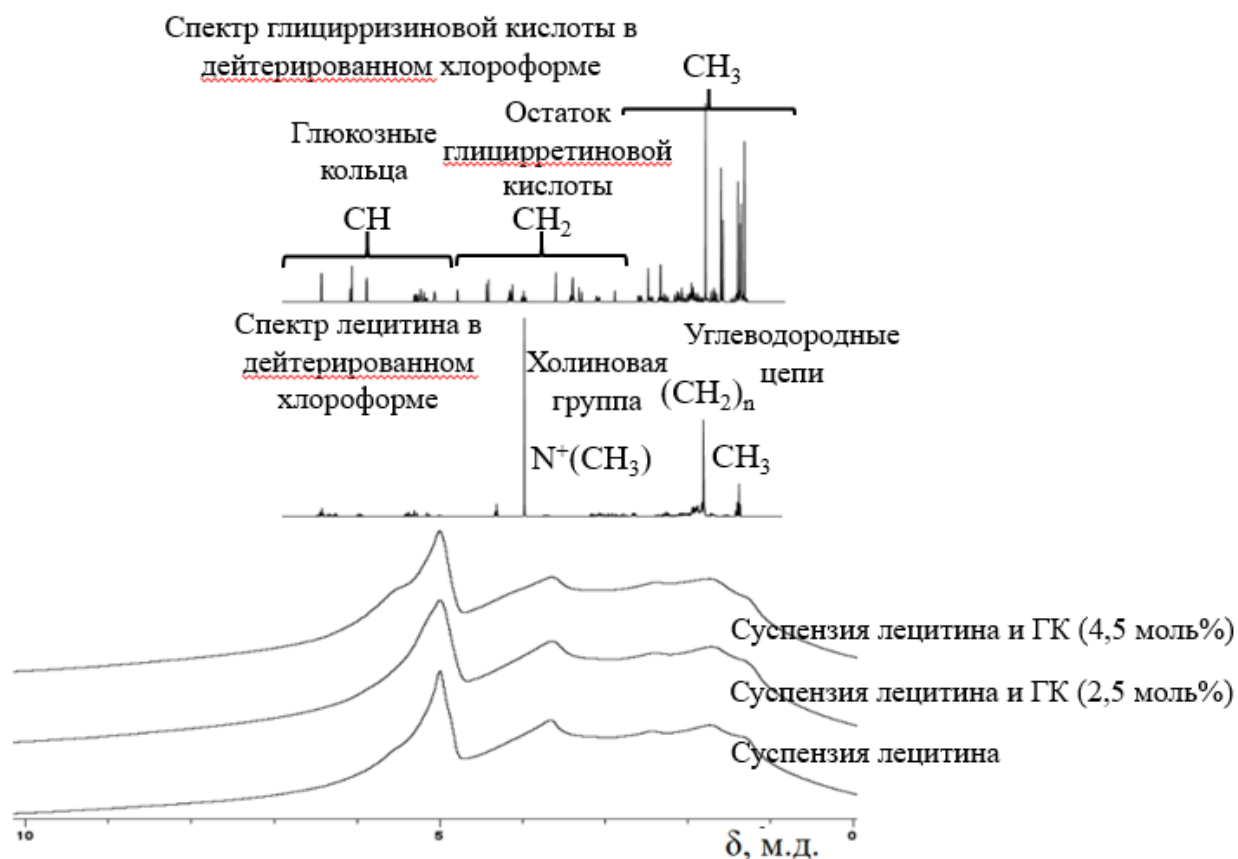


Рисунок 32 – ^1H ЯМР спектры для фосфатидилхолина, глицирризиновой кислоты, суспензии фосфатидилхолина, суспензии из фосфатидилхолина и глицирризиновой кислоты при различных концентрациях глицирризина при $T=308\text{K}$

3.4. Диффузионные затухания в системах на основе липида и глицерризиновой кислоты

Для анализа ЯМР данных диффузионных затуханий исследовали две спектральные области в диапазонах химических сдвигов: 8,5-0,5 м.д. (область 1) и 2,5-0,5 м.д. (область 2).

Типичный вид диффузионного затухания для первой области суспензии лецитина и суспензии лецитина с глицерризиновой кислотой (2,5 и 4,5 моль%) при температуре 308К был представлен на рисунке 33.

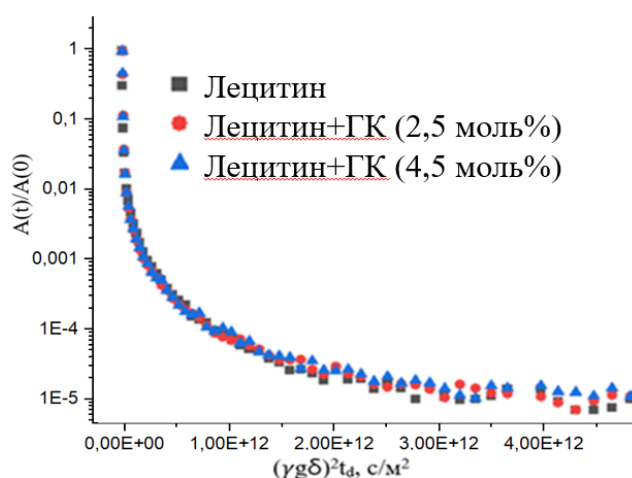


Рисунок 33 – ДЗ для суспензии лецитина и суспензии лецитина с глицерризиновой кислотой (2,5 и 4,5 моль%) при температуре 308 К

Для дальнейшего исследования полученных диффузионных затуханий мы их разделили на несколько компонент. Это связано с тем, что полученные данные имеют отклонения от экспоненциального вида, что в свою очередь указывает на то, что в системе система является сложной. На рисунке 34 представлены диффузионные затухание для фосфатидилхолина и системы фосфатидилхолина с различными концентрациями глицерризиновой кислоты при температуре 308 К и определены коэффициенты самодиффузии.

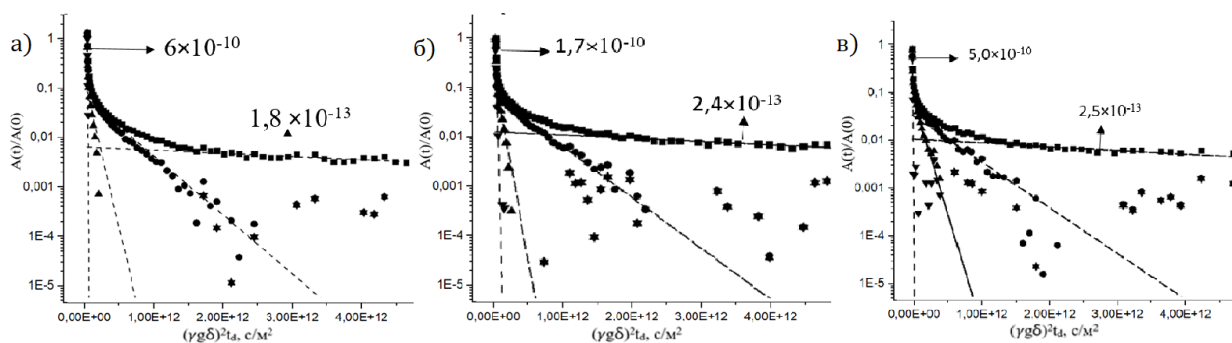


Рисунок 34 - ДЗ амплитуды сигнала: а) для лецитина при $T=308$ К; б) для системы лецитина с концентрацией глицирризиновой кислоты 2,5 моль% при $T=308$ К; в) для системы лецитина с концентрацией глицирризиновой кислоты 4,5 моль% при $T=308$ К

Для полученных в результате эксперимента диффузионных затуханий мы получили 4 компоненты. Затухание амплитуды описывается выражением:

$$A(g)/A(0) = \sum_i p_i \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 t D_i) \quad (36)$$

где $A(0)$ – амплитуда сигнала в начальный момент времени, γ – гиромагнитное отношение протонов, g – амплитуда импульсов градиента, δ – длительность импульсов градиента, p_i – коэффициент i -ой компоненты.

Диффузионные затухания суспензии из лецитина и глицирризиновой кислоты различной концентрации имеют многоэкспоненциальный вид, что говорит о сложности системы. Быстрозатухающая компонента диффузионного затухания порядка 5×10^{-10} м²/с может относиться к молекулам воды, которые «связаны» с молекулами лецитина (с населенностью $\sim 0,70$). Компонента диффузионного затухания порядка 2×10^{-13} м²/с для больших значений градиента может быть связана с наблюдаемым движением диффундирующих липосом (с населенностью 0,01). При добавлении ГК КСД «медленной» компоненты в пределах ошибки не меняется.

Для «медленной» компоненты ДЗ со значением КСД порядка 10^{-13} был оценен гидродинамический радиус, для этого мы использовали уравнение Стокса-Эйнштейна. Для установленного КСД при $T=308$ К и $\eta=0,01$ Пас было получено гидродинамический радиус $(1,0 \pm 0,1)$ мкм. Полученное

значение соответствует литературному размеру липосом [37]. Следовательно, данная компонента может быть связана с медленным движением наблюдаемых мультислойных липосом.

Далее рассмотрим диффузионные затухания для второй спектральной области. Типичные виды диффузионных затуханий суспензии фосфатидилхолина с глицерризиновой кислоты (2,5 и 4,5 моль%) при температуре 308К были представлены на рисунке 35.

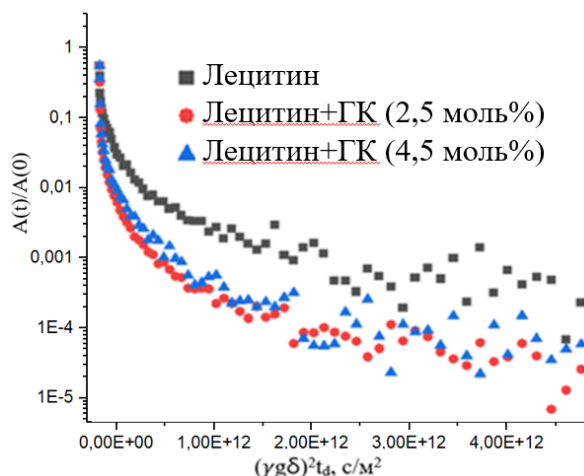


Рисунок 35 – Типичный вид диффузионного затухания для второй спектральной области

Для данных затуханий так же рассмотрели несколько составляющих диффузионных затуханий. Диффузионные затухания третьей области имеют шумы в области от 2×10^{12} до 4×10^{12} с/м^2 . На рисунке 36 представлены диффузионные затухание отдельно для второй и третьей спектральных областей суспензии фосфатидилхолина и системы фосфатидилхолина с различными концентрациями глицерризиновой кислоты при температуре 308 К и установлены коэффициенты самодиффузии.

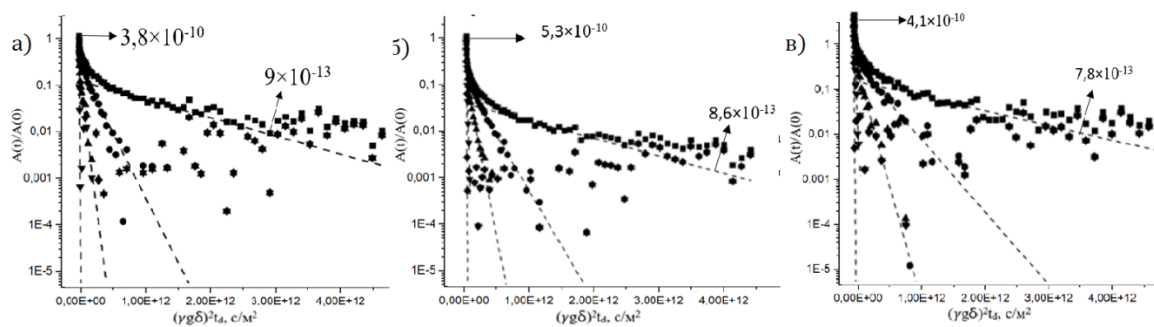


Рисунок 36 – Диффузионные затухания амплитуды сигналов при T=308 К

«Медленная» компонента диффузионного затухания суспензии из лецитина и глицирризиновой кислоты различной концентрации, полученного для спектральной линии области спектра, соответствующей группам СН₂ и СН₃ углеводородных цепей лецитина, аппроксимируется экспоненциальным законом с коэффициентами самодиффузии в диапазоне $(8,9 - 7,9) \times 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$, которые значительно меньше, чем КСД, относимые к движению целых липосом $2 \times 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$. Такие отличия могут быть связаны с влиянием локальной подвижности углеводородных цепей. При добавлении глицирризиновой кислоты наблюдается уменьшение КСД для наблюдаемой спектральной области, что отражает влияние ГК на подвижности углеводородных цепей и согласуется с данными ²Н ЯМР.

3.5. Исследование поперечной ЯМР релаксации на ядрах ¹Н для систем из липидов и глицирризиновой кислоты

Для того, чтобы проанализировать данные ЯМР релаксометрии мы исследовали две спектральные области для диапазонов химических сдвигов: 8,5-0,5 м.д. (область 1) и 2,5-0,5 м.д. (область 2).

Параметры ЯМР-релаксации дают возможность анализировать подвижность отдельных частей молекул иначе говоря позволяет получить информацию про динамические процессы в системах с мультиламеллярными

везикулами. Все исследования спадов сигнала поперечной намагниченности ^1H ЯМР были проведены при температуре $T=308$ К при использовании импульсной последовательности КПМГ.

На рисунке 37 приведены типичные спады поперечной намагниченности для лецитина и глицерризиновой кислоты различной концентрации, полученные по исследуемой спектральной области 1.

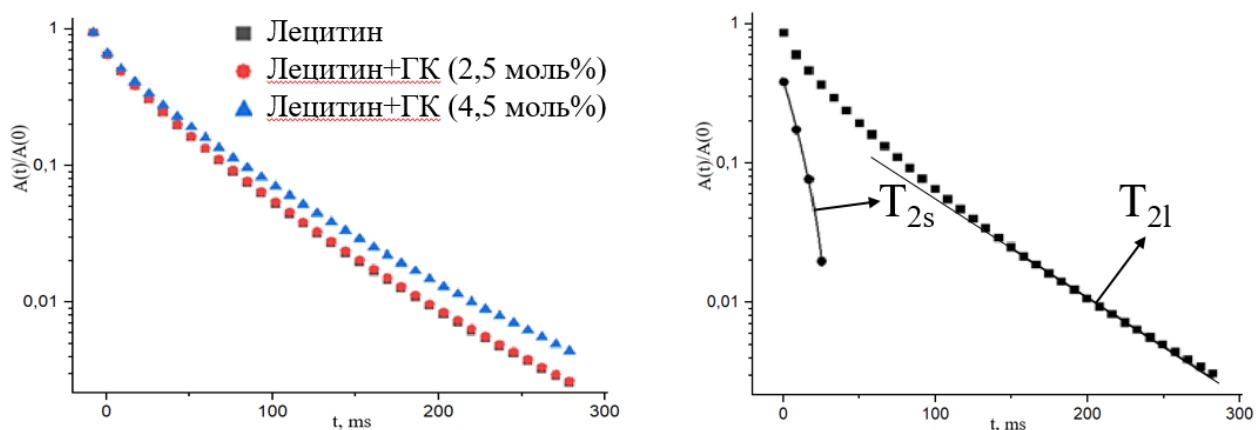


Рисунок 37 – Спады поперечной намагниченности для лецитина и глицерризиновой кислоты при различных концентрациях, которые были получены для исследуемой спектральной области 1

Затухания амплитуд спиновых эхо являются многоэкспоненциальными. Для нашего случая затухания амплитуд можно представить суммой Лоренцевой и Гауссовой форм:

$$\frac{A(t)}{A(0)} = p_s \exp\left(-\frac{1}{2} \times \left(\frac{t}{T_{2s}}\right)^2\right) + p_l \exp\left(-\frac{t}{T_{2l}}\right) \quad (37)$$

где $A(t)$ – функция, описывающая релаксационное затухание, $A(0)$ – амплитуда в начальный момент времени, p_s и T_{2s} – населенность и время поперечной релаксации Гауссовой компоненты, p_l и T_{2l} – населенность и время поперечной релаксации Лоренцевой компоненты.

В таблице 2 приведены времена Гауссовой и Лоренцевой компонент поперечной релаксации для первой исследуемой области спектра.

Таблица 2 – Времена Гауссовой и Лоренцевой компонент поперечной релаксации

	T_{21} , мс (p_1)	T_{2s} , мс (p_s)
Лецитин	78,1 (0,47)	18,5 (0,53)
Лецитин+ГК (2,5 моль%)	77,7 (0,48)	18,5 (0,52)
Лецитин+ГК (4,5 моль%)	85,9 (0,51)	20,4 (0,49)

Диффузионные затухания суспензии из лецитина и глицерризиновой кислоты различной концентрации имеют сложный вид. Быстрозатухающая компонента диффузионного затухания порядка 5×10^{-10} м²/с может относиться к молекулам воды, которые «связаны» с молекулами лецитина. Компонента диффузионного затухания порядка 2×10^{-13} м²/с для больших значений градиента может быть связана с движением липидов в системе.

На рисунке 38 приведены типичные спады поперечной намагниченности для лецитина и глицерризиновой кислоты различной концентрации, полученные по спектральной области 2.

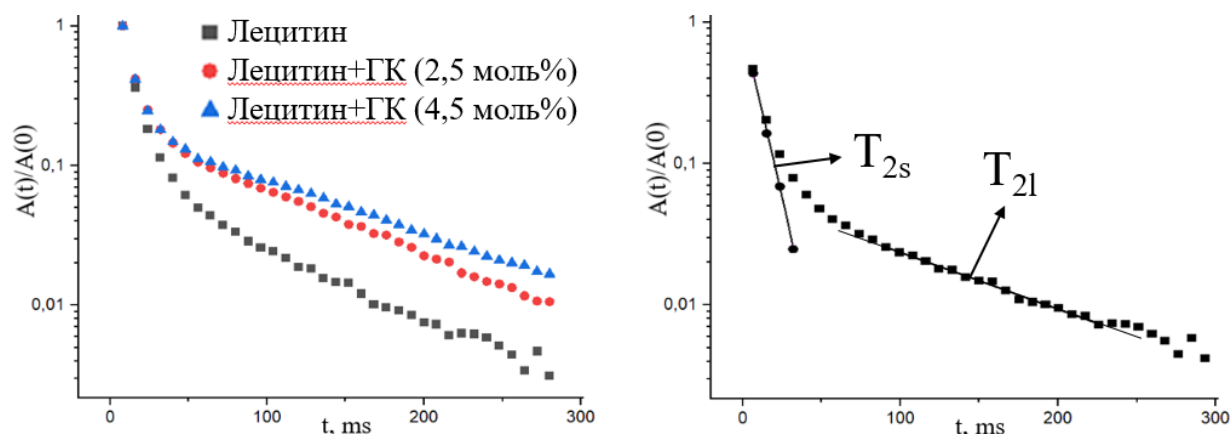


Рисунок 38 – Спады поперечной намагниченности для лецитина и глицерризиновой кислоты различной концентрации, полученные по спектральной области 2

В таблице 3 приведены времена «медленной» и «быстрой» компонент поперечной релаксации для второй исследуемой области спектра.

Таблица 3 – Времена Гауссовой и Лоренцевой компонент поперечной релаксации

	T_{21} , мс (p_1)	T_{2s} , мс (p_s)
Лецитин	81,2 (0,08)	6,8 (0,92)
Лецитин+ГК (2,5 моль%)	96,5 (0,18)	6,4 (0,82)
Лецитин+ГК (4,5 моль%)	116,9 (0,19)	6,3 (0,81)

«Медленная» компонента диффузионного затухания суспензии из лецитина и глицирризиновой кислоты различной концентрации, полученного для спектральной линии области спектра, соответствующей группам СН₂ и СН₃ углеводородных цепей лецитина, аппроксимируется экспоненциальным законом с коэффициентами самодиффузии в диапазоне $(7,9 - 8,9) \times 10^{-13}$ м²/с. При добавлении глицирризиновой кислоты наблюдается уменьшение КСД для наблюдаемой спектральной области, что отражает влияние ГК на подвижности углеводородных цепей и согласуется с данными ²Н ЯМР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ ^{31}P ЯМР спектров показал, что суспензия липидов в отсутствие глицерризиновой кислоты находится в ламеллярной жидкокристаллической фазе во всем исследуемом диапазоне температур. Добавление глицерризиновой кислоты не влияет на фазовое состояние системы.
2. По данным ^2H ЯМР добавление глицерризиновой кислоты различной концентрации приводит к сужению спектральных линий, что может свидетельствовать о взаимодействии глицерризиновой кислоты с углеводородными цепями фосфолипидов и об уменьшении упорядоченности цепи.
3. При увеличении концентрации глицерризиновой кислоты наблюдается увеличение времени поперечной релаксации для экспоненциальной компоненты релаксационного спада, что может свидетельствовать об увеличении молекулярной подвижности воды «связанной» с углеводородными цепями фосфолипидов.
4. По данным ЯМР диффузометрии на ядрах ^1H при добавлении глицерризиновой кислоты наблюдается уменьшение КСД, относящегося к липидам, что может свидетельствовать о встраивании ГК в структуру липосом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Современные принципы диагностики и лечения папилломавирусной инфекции аногенитальной области у детей и подростков / О. С. Бычкова, А. В. Картелишев, В. Ф. Коколина, И. Н. Кузетченко. – Текст : непосредственный // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского. – 2011. – С. 55-61.
2. Research Progress of Glycyrrhizic Acid on Antiviral Activity / Z. G. Sun, T. T. Zhao, N. Lu [и др.]. – Текст : непосредственный // Mini reviews in medicinal chemistry. – 2019. – V.9. - С. 826-832.
3. An active component of licorice roots, and its replication of SARS-associated coronavirus / J. Cinatl, B. Morgenstern, G. Bauer [и др.]. – Текст : непосредственный // The Lancet. – 2003. - С. 2045-2046.
4. Antiviral Activity of Glycyrrhizic Acid Derivatives against SARS– Coronavirus / G. Hoever, L. Baltina, M. Michaelis [и др.]. – Текст : непосредственный // Journal of medicinal chemistry. - 2005. – V. 48, N.4. – С. 1256-1259.
5. Glycyrrhizin effectively neutralizes SARS-CoV-2 in vitro by inhibiting the viral main protease / M. Bormann, L. van de Sand, M. Alt [и др.]. – Текст : непосредственный // bioRxiv. – 2020.
6. Morgan, A. G. Maintenance therapy: a two year comparison between Caved-S and cimetidine treatment in the prevention of symptomatic gastric ulcer recurrence / A. G. Morgan, C. Pasoo, W. A. McAdam. - Текст : непосредственный // Gut : journal. — 1985. — V. 26, N. 6. — С. 599—602.
7. Зарубаев, В. В. Противовирусная активность глицерретовой и глицирризиновой кислот / В. В. Зарубаев, В. Б. Аникин, В. С. Смирнов. - Текст : непосредственный // Инфекция и иммунитет. – 2016. – №3 - С. 199-206.
8. Solubilization and stabilization of macular carotenoids by water soluble oligosaccharides and polysaccharides / I. E. Apanasenko, O. Yu. Selyutina, N. E.

- Polyakov [и др.]. – Текст : непосредственный // Archives of Biochemistry and Biophysics. - 2015. - V. 572. - С. 58-65.
9. Complex of Calcium Receptor Blocker Nifedipine with Glycyrrhizic Acid / N. E. Polyakov, V. K. Khan, M. B. Taraban, T. V. Leshina. – Текст : непосредственный // Journal of Physical Chemistry B. - 2008. - V. 112. - С. 4435-4440.
10. Tolstikova, T. G. The complexes of drugs with carbohydrate-containing plant metabolites as pharmacologically promising agents / T. G. Tolstikova, M. V. Khvostov, A. O. Bryzgalov. – Текст : непосредственный // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. - 2009. - V. 9. - С. 1317-132.
11. Polyakov, N. E. Glycyrrhizic Acid as a Novel Drug Delivery Vector. Synergy of Drug Transport and Efficacy / N. E. Polyakov, T. V. Leshina. – Текст : непосредственный // The Open Conference Proceedings Journal. - 2011. - V. 2. - С. 64-72.
12. Polyakov, N. E. Photochemical and optical properties of water-soluble xanthophyll antioxidants: aggregation vs complexation / N. E. Polyakov, A. Magyar, L. D. Kispert. – Текст : непосредственный // Journal of Physical Chemistry B. - 2013. - V. 117. - С. 10173-10182
13. Physicochemical properties and anti-opisthorchosis effect of mechanochemically synthesized solid compositions of praziquantel with glycyrrhizic acid disodium salt / E. S. Meteleva, Yu. S. Chistyachenko, L. P. Suntsova [и др.]. – Текст : непосредственный // Doklady Biochemistry and Biophysics – 2018. - V. 481. – С. 228–231.
14. Disodium salt of glycyrrhizic acid – a novel supramolecular delivery system for anthelmintic drug praziquantel / E. S. Meteleva, Yu. S. Chistyachenko, L. P. Suntsova [и др.]. – Текст : непосредственный // Drug Delivery Science and Technology - 2019. – V.50. – С. 66-77.
15. Glycyrrhizin-assisted transport of praziquantel anthelmintic drug through the lipid membrane: an experiment and MD simulation / A. V. Kim, E. A. Shelepova,

- О. Yu. Selyutina [и др.]. – Текст : непосредственный // *Molecular Pharmaceutics* – 2019. – С. 3188-3198.
16. Барсуков, Л.И. ЛИПОСОМЫ / Л.И. Барсуков. – Текст : непосредственный // *Соросовский образовательный журнал*. – 1998. – № 10. – С. 2-9.
17. Твердислов, В. А. Физика биологических мембран // Школьникам о современной физике. Акустика. Теория относительности. Биофизика. : учебник / В. А. Твердислов, Л. В. Яковенко – Москва : Просвещение, 1990. – 176 с. – Текст : непосредственный.
18. Моренко, М. А. Обоснование целесообразности использования препаратов глицирризиновой кислоты в комплексной терапии бронхиальной астмы у детей / М. А. Моренко. – Текст : непосредственный // *Медицина и экология*. – 2010. - №2. – С. 97-100.
19. Ткач, С. М. Эффективность и безопасность гепатопротекторов с точки зрения доказательной медицины / С. М. Ткач. – Текст : непосредственный // *Здоровье Украины XXI век*. — 2009. — № 6 – С. 7-10.
20. Селютина, О. Ю. Исследование влияния глицирризиновой кислоты на физические и функциональные свойства клеточных мембран : 01.04.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества : дис. ... канд. Физ.-мат. наук / Селютина Ольга Юрьевна. – Новосибирск, 2017. – 110 с. – Текст : непосредственный.
21. Толстикова, Т. Г. На пути к низкодозным лекарствам / Т. Г. Толстикова. А. Г. Толстикова, Г. А. Толстикова. – Текст : непосредственный // *Вестник Российской академии наук*. - 2007. - № 77. – С. 867-874.
22. Effect of glycyrrhizic acid on lappaconitine phototransformation / V. S. Kornievskaya, A. I. Kruppa, N. E. Polyakov, T. V. Leshina. – Текст : непосредственный // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2007. - V.111, N. 39. - С. 11447–11452.
23. Tolstikova, T.G. The complexes of drugs with carbohydrate-containing plant metabolites as pharmacologically promising agents / T. G. Tolstikova, M. V.

- Khvostov, A. O. Bryzgalov – Текст : непосредственный // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. - 2009. - V. 9. - С. 1317-132.
24. Wang, Y. Formulation and evaluation of novel glycyrrhizic acid micelles for transdermal delivery of podophyllotoxin / Y. Wang, B. Zhao, S. Wang [и др.]. – Текст : непосредственный // Drug Delivery. - 2016. - V. 23. - С. 1623-1635.
25. Sapra, B. Transdermal Delivery of Carvedilol Containing Glycyrrhizin and Chitosan as Permeation Enhancers: Biochemical, Biophysical, Microscopic and Pharmacodynamic Evaluation / B. Sapra, S. Jain, A. K. Tiwary – Текст : непосредственный // Drug delivery. - 2008. – V. 15. - С. 443-454.
26. Chen, Q. Novel glycyrrhetic acid conjugated pH-sensitive liposomes for the delivery of doxorubicin and its antitumor activities / Q. Chen, H. Ding, J. Zhou, [и др.]. – Текст : непосредственный // RSC Advances. - V. 6. - С. 17782-17791.
27. Cai, Y. Glycyrrhetic Acid Mediated Drug Delivery Carriers for Hepatocellular Carcinoma Therapy / Y. Cai, Y. Xu, H. F. Chan [и др.]. – Текст : непосредственный // Molecular pharmaceuticals. - 2016. - V. 13. - С. 699-709.
28. Ивков, В. Г. Липидный бислой биологических мембран [Текст]: Теоретическая и прикладная биофизика / В.Г. Ивков, Г.Н. Берестовский. – Москва: Наука, 1982. – 224 с. – Текст : непосредственный.
29. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения – Текст : электронный // ChemNet Россия : [сайт] – Москва, 2003 – URL: <http://www.chem.msu.ru/rus/teaching/ustyniuknmrlectures/Lecture1.pdf>. (дата обращения: 01.05.2021).
30. Хеберлен, У. ЯМР высокого разрешения в твердых телах : учебник / У. Хеберлен, М. Меринг. – Москва : Мир, 1980. – 504 с. – Текст : непосредственный.
31. Schiller, J. ³¹P NMR Spectroscopy of Phospholipids: From Micelles to Membranes [Text] / J. Schiller, M. Muller, B. Fuchs, et.al. – Текст : непосредственный // Current Analytical Chemistry. – 2007. – V. 3, N. 4. – P. 283-301.

32. Ивков, В. Г. Динамическая структура липидного бислоя / В. Г. Ивков, Г. Н. Берестовский. – Москва: Наука, 1981. – 296с. – Текст : непосредственный.
33. Маклаков, А.И. Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров : учебник / А.И. Маклаков, В.Д. Скирда, Н.Ф. Фаткуллин. – Казань : Издво КГУ, 1987. – 224 с. – Текст : непосредственный.
34. Биологические мембраны – Текст : электронный // ChemNet Россия : [сайт] – Москва, 2003 – URL: <http://www.chem.msu.ru/ru0s/books/ovchinnikov/p547-636.pdf>. (дата обращения: 25.05.22).
35. Филиппов, А.В. Ограниченная самодиффузия лецитина в системе лецитин-вода [Текст] / А.В. Филиппов, А.М. Хакимов, М.М. Дорогиницкий, В.Д. Скирда – Текст : непосредственный // Коллоидный журнал. – 2000. – Т. 62, N. 5. – С. 700-706.
36. Johnsson, M. Liposomes, Disks, and Spherical Micelles: Aggregate Structure in Mixtures of Gel Phase Phosphatidylcholines and Poly (Ethylene Glycol)-Phospholipids / M. Johnsson, K. Edwards – Текст : непосредственный // Biophysical Journal. – 2003. – V. 85, N. 6. – С. 3839-3847.
37. Johnsson, M. Liposomes, Disks, and Spherical Micelles: Aggregate Structure in Mixtures of Gel Phase Phosphatidylcholines and Poly (Ethylene Glycol)-Phospholipids [Text] / M. Johnsson, K. Edwards – Текст : непосредственный // Biophysical Journal. – 2003. – V. 85, N. 6. – P. 3839-3847.