

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»

**ИНСТИТУТ ФИЗИКИ**

Специальность: 010701.65 – «Физика»

«Медицинская физика»

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

(Дипломная работа)

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЯМР ИГМП БИЦЕЛЛЯРНЫХ СИСТЕМ  
В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАН

**Работа завершена:**

"4" июня 2015 г.

  
\_\_\_\_\_ (Э.Г. Бухарова)

**Работа допущена к защите:**

Научный руководитель:

к.ф.-м.н, доцент

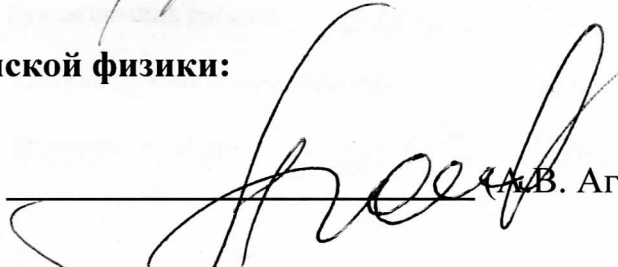
"5" июня 2015 г.

  
\_\_\_\_\_ (М.А. Рудакова)

**Заведующий кафедрой медицинской физики:**

д.х.н., профессор

"5" июня 2015 г.

  
\_\_\_\_\_ (А.В. Аганов)

Казань - 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |    |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ .....   | 3  |
| ЧАСТЬ 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....  | 5  |
| 1.1 Метод ЯМР-ИГМП .....   | 5  |
| 1.1.1 Основы метода ядерного магнитного резонанса .....                  | 5  |
| 1.1.2. Метод ЯМР - ИГМП для измерения самодиффузии.....                  | 9  |
| 1.2. Особенности строения и основные свойства бицеллярных систем .....   | 14 |
| 1.3 Применение $^{31}\text{P}$ спектроскопии в бицеллярных системах..... | 20 |
| 1.4 Особенности самодиффузии липидов в бицеллярных системах .....        | 23 |
| ЧАСТЬ 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИСЛЕДОВАНИЯ.....                               | 30 |
| 2.1 Метод исследования .....   | 30 |
| 2.2. Объекты исследования .....  | 31 |
| ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....                                   | 32 |
| ВЫВОДЫ .....   | 47 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А .....   | 48 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....  | 50 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....   | 51 |

## ВВЕДЕНИЕ

Исследования физических свойств биосистем на примере модельных объектов в течение последних десятилетий стало, по сути, самостоятельным направлением современной биофизики и биомедицины [1,2]. Потребность в модельных системах с одной стороны адекватно отражающих исследуемые характеристики биосистем, а с другой являющихся достаточно простыми с точки зрения строения и методики приготовления, возникла в связи с применением для изучения биосистем современных физических методов, таких как ЯМР. Если говорить о модельных биомембранах, то помимо простоты и адекватности, немаловажным критерием является наличие плоского участка липидного бислоя и возможность установления положения нормали к нему, что существенно улучшает качество получаемых ЯМР данных и облегчает процесс интерпретации [3]. Примером такой перспективной модельной системы являются бицеллярные системы или по-другому бицеллы, на примере которых при помощи ЯМР – спектроскопии уже был получен ряд оригинальных результатов, например, исследование структуры различных белков и пептидов, таких как грамицидин D, основной белок миелина,  $\beta$  – амилоид, убикитивин, мастопаран и т.д. [1,2].

Данная дискообразная модель мембраны, способная к спонтанной ориентации в магнитном поле, была применена в основном для структурных исследований белков, включенных в ее состав. Но группой ученых под руководством МакДональда была предложена методика изучения динамических характеристик липидного бислоя при помощи ЯМР ИГМП, а именно коэффициентов латеральной диффузии [4,5]. В основе этой методики лежит применение так называемых «диффузионных меток», позволяющих, по мнению авторов, регистрировать сигнал стимулированного эхо от молекул липидов несмотря на характерное для жидкокристаллического состояния липидного бислоя короткое время  $T_2$  релаксации [4,5]. Несмотря на привлекательность и перспективность предлагаемой методики,

публикуемые материалы содержат ряд противоречий в части трактовки зависимостей от времени диффузии. Также в работах недостаточно представлены данные о фазовом состоянии системы и степени влияния метки на получаемые при ЯМР ИГМП результаты. Указанные противоречия не позволяют сделать однозначного вывода о возможностях применения бицелярной системы в качестве нового класса модельных биомембран для исследования самодиффузии липидов. Поэтому исследования особенности трансляционной подвижности в бицелярных системах, являются целью данной работы.

# ЧАСТЬ 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1 Метод ЯМР-ИГМП

### 1.1.1 Основы метода ядерного магнитного резонанса

Используя классическое определение явления ядерного магнитного резонанса (ЯМР) можно сказать, что ЯМР заключается в резонансном поглощении (или испускания) электромагнитной энергии системой спинов ядер, помещенных во внешнее магнитное поле [6].

Явление ЯМР наблюдается на ядрах, обладающих спином  $I$  ( $I \neq 0$ ), и, следовательно, магнитным моментом  $\mu$  [7]. Магнитный момент – эта та характеристика, благодаря которой осуществляется взаимодействие системы с магнитным полем и существует явление ЯМР, которое на сегодняшний день является основой для получения структурной и динамической информации широкого класса объектов. Для описания физических основ этого явления обратимся к квантовой механике.

Рассмотрим энергию взаимодействия изолированного ядра с магнитным моментом  $\mu$  во внешнем однородном магнитном поле  $\mathbf{B}_0$ . Энергия поля будет определяться выражением, предполагая, что  $\mathbf{B}_0$  направлено вдоль оси  $Z$  в лабораторной системе координат [7]:

$$E = -(\boldsymbol{\mu} * \mathbf{B}_0) = -\mu_z * B_0 \quad (1)$$

Согласно законам квантовой механики энергия должна принимать дискретные значения, поэтому её значения можно выразить через магнитное квантовое число  $m$ , которое характеризует проекцию спина и меняться в пределах от  $I, I-1, \dots, -I+1, -I$  [7]:

$$E = -\frac{m\mu B_0}{I} \quad (2)$$

По теории квантовых переходов возможны переходы только при условии, что  $\Delta m = \pm 1$ , т.е. возможны переходы между соседними энергетическими уровнями [7]:

$$\Delta E = |E_m - E_{m \pm 1}| = \left| -m\mu B_0 / I + (m \pm 1)\mu B_0 / I \right| = \mu B_0 / I \quad (3)$$

Из этого следует, что частота перехода, называемая также ларморовской частотой, равна [7]:

$$\omega_0 = \Delta E / \hbar = \mu B_0 / \hbar I = \gamma B_0 \quad (4)$$

Теперь рассмотрим систему спинов помещенных во внешнее однородное постоянное магнитное поле ( $\mathbf{B}_0 \parallel \mathbf{Z}$ ). Населенности энергетических состояний такой системы описываются формулой Больцмана:

$$n_i = A * \exp\left(- E_i / kT\right) \quad (5)$$

где  $n_i$  – количество частиц в состоянии с энергией  $E_i$ ,  $k$  – постоянная Больцмана;  $T$  – абсолютная температура;  $A$  – нормировочный коэффициент. Соответствии с выражением (5), населённости уровней оказываются не одинаковыми, поэтому вещество оказывается намагниченным, причём количество ядер, ориентированных вдоль вектора поля, больше, чем против. Это позволяет ввести ненулевую макроскопическую намагниченность  $\mathbf{M}$ , как сумму магнитных моментов:

$$\mathbf{M} = \sum \mu_i \quad (6)$$

В отсутствие внешних воздействий ядерная макроскопическая намагниченность будет стремиться ориентироваться вдоль направления вектора  $\mathbf{B}_0$ , принимая значение  $M$ . Если теперь приложить некоторое переменное электромагнитное поле  $\mathbf{B}_1$  с частотой  $\omega$ , совпадающей с ларморовской частотой  $\omega_0$ , наблюдается переходы между энергетическими уровнями при условии резонанса. При этом происходит резонансное поглощение (испускание) электромагнитной энергии ядрами, что и представляет собой явление ЯМР. Следует также отметить тот факт, что вектор намагниченности «поворачивается» на угол  $\theta$ , определяемый гирромагнитным соотношением  $\gamma$ , значением переменного магнитного поля  $B_1$  и временем действия радиочастотного поля  $t$ :

$$\theta = \gamma B_1 t \quad (7)$$

Импульс, «поворачивающий» вектор  $\mathbf{M}$  на угол  $90^\circ$  градусов, принято называть  $90^\circ$  - градусным, «поворачивающий» на угол  $180^\circ$  градусов –  $180^\circ$  - градусным [14].

В качестве демонстрации метода ЯМР представим следующую ситуацию. Пусть система спинов помещена в поле  $\mathbf{B}_0$  ( $\mathbf{B}_0 \parallel \mathbf{Z}$ ) и после этого был подан  $90^\circ$  - градусный импульс  $\mathbf{B}_1$ . Вектор  $\mathbf{M}$  «повернется» на  $90^\circ$  окажется в плоскости  $XOY$ . От этой системы можно зарегистрировать сигнал, называемый спадом свободной индукции, с амплитудой  $A(0)$  пропорциональный  $M$ , так как со временем макроскопическая намагниченность стремится вернуться в равновесное положение. Данный процесс называют ядерной магнитной релаксацией [6,7]. Здесь имеют места два сходных, но разных по механизму процесса. Первый процесс связан с неизбежной потерей фазовой когерентности прецессии магнитных импульсов, связанный с обменом энергии между ними. Вторым процесс будет, наоборот, стремиться возратить компоненту, параллельную магнитному полю  $\mathbf{B}_0$ , вектора  $\mathbf{M}$  к первоначальному состоянию, за счет

обмена энергии ядерных спинов с их окружением – «решеткой». Таким образом, подбирая определённые комбинации импульсов, называемых последовательностями, можно узнать параметры релаксации и с помощью них узнавать свойства системы.



### 1.1.2. Метод ЯМР - ИГМП для измерения самодиффузии

Прежде чем говорить о методах исследования самодиффузии, необходимо дать понятие самому методу.

Самодиффузия – это хаотическое поступательное (или Броуновское) движение молекул в термодинамической равновесной среде за счет внутренней тепловой энергии [6,8]. Не следует путать самодиффузию с другим, отличным по смыслу, явлением – взаимной диффузией. Взаимная диффузия – это процесс выравнивания концентрации в многокомпонентных системах при постоянном давлении [6], т.е. она может быть лишь вследствие наличия в системе градиента концентрации [6]. Взаимная диффузия устраняет неравновесность системы, а ее основная причина – градиент химического потенциала, а самодиффузия молекул происходит в равновесных, как одно-, так и многокомпонентных, системах, а основная ее причина, как уже было сказано выше, - тепловое движение молекул. В этом и состоит принципиальное отличие этих двух явлений.

Самодиффузия носит вероятностный характер [6]. Для сферической частицы гидродинамический радиус  $R_H$  в изотропной среде со средней вязкостью  $\eta$  связан с коэффициентом самодиффузии  $D$  уравнением Стокса-Эйнштейна:

$$D = k_B T / 6\pi\eta R_H \quad (8)$$

где  $k_B$  - это константа Больцмана,  $T$  – абсолютное значение температуры. Обычно коэффициент самодиффузии меняется от  $10^{-9}$  м<sup>2</sup>/с для низкомолекулярных веществ, например, для воды и до  $10^{-12}$  м<sup>2</sup>/с для полимеров.

Вернемся теперь к рассмотрению принципов ЯМР-метода исследования явления самодиффузии. В данной работе используется метод импульсного градиента магнитного поля (ИГМП).

Метод ЯМР ИГМП основан на том, что затухание сигнала, как результат расфазировки спинов, происходит за счет трансляционной подвижности молекул [8]. Использование градиента позволяет определить положение поперечной намагниченности спинов, как функции их пространственного положения.

Рассмотрим метод ЯМР ИГМП на примере линейного градиента и последовательности Хана (Рисунок 1). Фазовый эффект градиента  $g$ , продолжительности  $\delta$  для спина с радиус-вектором  $r$  равен:

$$\phi = \gamma \delta (g * r) \quad (9)$$

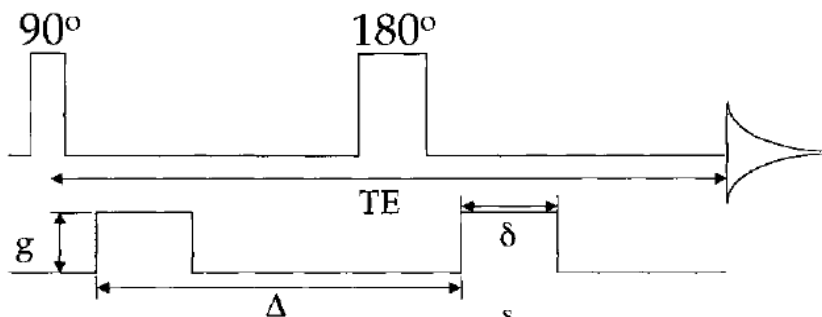


Рисунок 1- Последовательность Хана. Обозначения: TE – время эха,  $g$ - амплитуда градиента,  $\delta$  – длительность импульса градиента,  $\Delta$  – время между двумя градиентными импульсами [8].

Так как изменение фазы будет только вдоль направления, совпадающего с направлением градиента, в уравнении (9) возникает скалярное произведение. Следует отметить, что в уравнении (9) не учитывается перемещение во время градиентного импульса. Если теперь мы рассмотрим смещение из позиции спина  $r_0$  (во время первого импульса) и в позицию  $r_1$  (во время второго импульса), то разность фазы  $\Delta\phi$  будет равна:

$$\Delta\phi = \gamma \delta (g * (r_1 - r_0)) \quad (10)$$

В отсутствии самодиффузии разность фаз равна нулю, так как два одинаковых градиентных импульса изменяют фазу на одинаковое абсолютное значение. Фазовый эффект от градиентных импульсов компенсируется потому,  $180^{\circ}$  импульсов в спин-эхо последовательности, меняет знак фазового угла. Это приводит к тому, что спины расфазированные после  $90^{\circ}$  импульса, снова становятся в одной фазе, что и дает максимальный эхо-сигнал.

Из уравнений (9) и (10) ясно, что разность фаз зависит от гиромагнитного соотношения  $\gamma$  (т.е. от типа ядра), амплитуды  $g$  и длительности  $\delta$  градиентного импульса, и от среднеквадратичного смещения спина вдоль направления градиента. Не смотря на то, что в уравнениях (9) и (10) предлагается градиент с постоянной амплитудой, градиент сам по себе может быть функцией времени. Традиционно [6,8], градиент подается в виде прямоугольных импульсов, причем, площадь градиентного импульса, а не его амплитуда, определяет эффект расфазировки [8].

Так как перемещение спинов определяется большим количеством взаимодействий между соседними молекулами, и носят случайный характер, наиболее подходящей математической функцией для описания этого процесса, является функция пропагатор (функция Грина) [6,8]. При временах, много больших времен корреляций пространственных степеней свободы молекул, он принимает простейший вид и определяется только одним параметром  $D$ [6,8]:

$$P(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}, t) = (4\pi Dt)^{-3/2} \exp\left(-(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)^2 / 4Dt\right) \quad (11)$$

Так как в спин-эхо сигнал вклад дает ансамбль спинов, интенсивность сигнала будет определяться интегралом [8]:

$$S(\mathbf{g})/S(0) = \iint P(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_1, t) * \exp(i\gamma\delta(\mathbf{g} * (\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_0))) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_0 \quad (12)$$

где  $S(\mathbf{g})$  – показывает интенсивность эха с  $g \neq 0$  и  $S(0)$  – интенсивность эха с  $g=0$ . Подставив выражение (11) в выражение (12) можно получить для случая, если  $\mathbf{g}=\text{const}$ :

$$S(\mathbf{g})/S(0) = \exp(-\gamma^2 \mathbf{g}^2 \delta^2 D \Delta) \quad (13)$$

Это выражение верно для случая неограниченной, изотропной диффузии и в приближении, что за время подачи градиентного импульса молекула не успевает переместиться на значительное расстояние. На практике, связи с использованием прямоугольных импульсов, (13) должно быть изменено с учетом конечной ширины градиентного импульса:

$$S(\mathbf{g})/S(0) = \exp\left(-\gamma^2 \mathbf{g}^2 \delta^2 D \left(\Delta - \delta/3\right)\right) \quad (14)$$

Выражение  $(\Delta - \delta/3)$  обычно определяют, как время диффузии  $t_d$ . Выражения (13) и (14) также могут быть получены из макроскопических уравнений Блоха, изменённые с учетом диффузии.

В данной работе использована последовательность стимулированного эхо (Рисунок 2). Ее отличие от последовательности Хана на спиновую систему заключается в следующем. Первый 90-градусный импульс поворачивает макроскопический вектор намагниченности  $\mathbf{M}$  на 90 градус, т.е. этот вектор оказывается в плоскости  $XOY$  в лабораторной системе координат, так же как и у последовательности Хана.

Через промежуток времени  $\tau < T_2$  подается второй 90-градусный импульс (вместо 180 – градусного в последовательности Хана), в течение которого происходит тепловое движение исследуемого объекта, т.е. самодиффузия. Длительность промежутка составляет  $\tau_1$ . После временного промежутка  $\tau + \tau_1$  от начала воздействия подается третий 90-градусный импульс, который инвертирует вектор  $M$  относительно его положения после первого 90-градусного импульса. Вследствие этого через время  $\tau$  после третьего импульса часть спинов совпадут по фазе и можно зафиксировать сигнал спинного эхо.

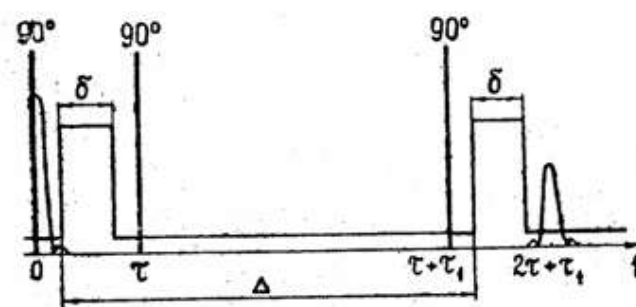


Рисунок 2 - Импульсная последовательность стимулированного спинного эхо.

$\Delta$  – интервал времени между импульсами градиента.  $\tau$  – временной промежуток между первым и вторым 90-градусным импульсом,  $\tau_1$  – между вторым и третьим [6].

Из всего этого следует, что в данной последовательности можно значительно расширить диапазон измеряемых коэффициентов самодиффузии в рамках метода ЯМР, так как появляется возможность значительно увеличить время диффузии по сравнению с той же последовательностью Хана, где есть ограничения как по длительности градиента  $\delta$ , так и, по времени релаксации  $T_2$  [6].

Однако и у последовательности стимулированного эха есть и существенный минус. Это уменьшение амплитуды сигнала регистрируемого эха в два раза по сравнению с последовательностью Хана [6], что требует увеличение чувствительности используемого оборудования.

## 1.2. Особенности строения и основные свойства бицеллярных систем

Бицеллярные системы или бицеллы – это двухкомпонентная по составу, двухслойная по структуре дискообразная модель биомембраны, спонтанно ориентирующаяся в магнитном поле [2]. Бицеллы являются результатом самоорганизации амфифильных молекул (ПАВ, липиды и т.д.) в воде. Их свойства определяются температурой, содержанием воды в системе, а также строением и свойствами самих амфифильных молекул. Поскольку бицеллы, как уже говорилось, рассматриваются как модельные биомембраны, то основное внимание мы будем уделять липидным бицеллам [2]. Отметим, что липиды представляют собой сложные эфиры жирных кислот и глицерола, при этом обычно выделяют порядка 7 классов, но в целом номенклатура сложна и неоднозначна [9]. Липиды, состоящие из полярной, гидрофильной, «головки», содержащей многоатомный спирт, например, холин и отрицательно заряженный остаток фосфорной кислоты, и двух неполярных, гидрофобных, «хвостов», состоящих из двух остатков жирных кислот, называются фосфолипиды (Рисунок 3). Они являются основным компонентом биологических мембран [9,10].

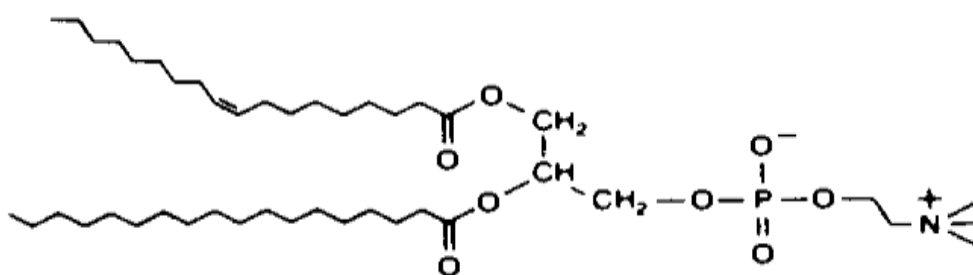


Рисунок 3 – Структурная формула фосфолипида [10].

В водных растворах, липидам<sup>1</sup>, в силу амфифильной природы, энергетически выгоднее образовать устойчивую структуру с минимальной площадью взаимодействия неполярных «хвостов» с водой [11]. Связано это с

<sup>1</sup> Здесь и далее по тексту под липидами понимаются фосфолипиды

тем, что контакт гидрофобной части с водой уменьшает значение энтропии системы, что энергетически невыгодно. Поэтому фосфолипиды в воде стремятся самоорганизоваться в такое состояние, при котором гидрофобная часть агрегирована между собой, а гидрофильная часть контактирует с водой [10]. Очевидно, что существуют различные варианты таких структур, свойства, и морфология которых будет управляться термодинамическими параметрами и природой фосфолипидов. Это явление известно как полиморфизм липидов [10]. В зависимости от типа фосфолипидов, количества липидных составляющих системы, концентрации, температуры, ионной силы и pH раствора структура липидных образований может быть различной (Рисунок 4).

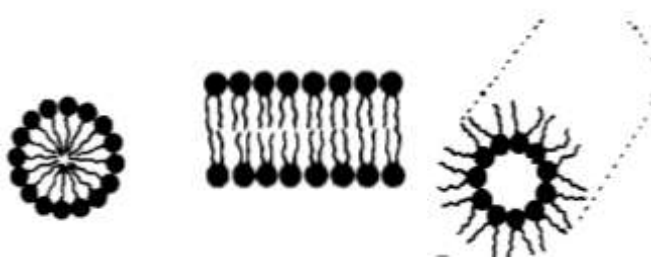


Рисунок 4 –Схематический рисунок различных липидных образований. Слева направо: мицелярное образование, бислоя, гексагональное образование [10].

Именно эти качества фосфолипидных систем используются для построения адекватных модельных биомембран. Например, существует связь между длиной углеводородных остатков жирных кислот липидов и их способностью организовывать плоские бислои [10], что используется при создании ориентированных липидных бислоев. Применение смеси двух типов липидов, у которых имеется значительное различие (в 8-10 углеводов) в длине неполярных «хвостов», приводит к тому, что липид с более длинным «хвостом» образует плоский бислоя, а липид с более коротким – замыкает бислоя по ободу, тем самым образуя дискообразную структуру бицелл [2,12]. Классическим примером бицеллярной системы могут быть соединения 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДМФХ), с длиной «хвоста» в 14 углеродов и 1,2-дигексанол-*sn*-глицеро-глицеро-3-

фосфатидилхолина (ДФХ) с длиной в 6 углеродов, позволяет образовать вышеописанную дискообразную структуру (Рисунок 5). Используя метод электронной микроскопии, было показано, что «классические» бицеллы обычно имеют линейный размер равный приблизительно 300-500 Å и толщину порядка 60 Å, что соответствует толщине бислоя биомембраны [13].



Рисунок 5 –Схематический рисунок дискообразной модели бицелл. Обозначения: синим цветом обозначены «головки» ДМФХ, зеленым – ДГФХ [13]

Однако, благодаря полиморфизму, дискообразная структура бицелл, не является единственной возможной в такой системе. Построенные на основе данных классического метода изучения полиморфизма липидов –  $^{31}\text{P}$  спектроскопии [1.3] фазовые диаграммы иллюстрируют наличие зависимости морфологии такой системы от температуры, концентрации и молярного соотношения между компонентами бицеллярной системы  $q$  (ДФХ/ДФХ). (Рисунок 6). Помимо этого, в исследованиях с использованием других методов встречаются и вовсе экзотические структуры. Например, с помощью малоуглового рассеивания нейтронов была показана возможность появления в бицеллярной системе двухслойных лентовидных агрегатов [14] (Рисунок 7). К сожалению, на сегодняшний момент, количества работ по изучению фазовых диаграмм недостаточно для построения четкой картины морфологии бицелл, поэтому при проведении исследований с использованием данной системы, необходимо контролировать её параметры [1].



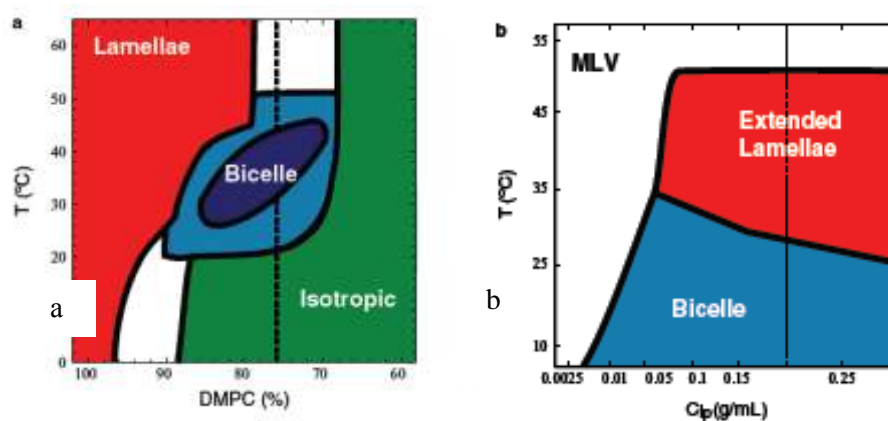


Рисунок 6 – (а) Фазовая диаграмма «классических» бицелл, построенная на основе данных  $^{31}\text{P}$  спектроскопии (красным цветом обозначена ламеллярная фаза, синим и голубым – бицеллы, зеленым – изотропная фаза), (б) Фазовая диаграмма «классических бицелл», построенная на основе данных малоуглового рассеивания нейтронов (красным цветом обозначена ламеллярная фаза, голубым – бицеллы, белым – мицеллярная фаза) [1].

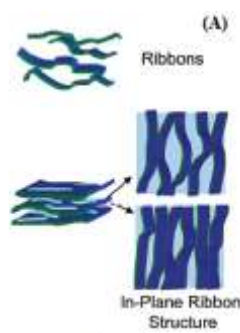


Рисунок 7 – Схематическое изображение фазы двухслойных лентовидных агрегатов [14]

Помимо выше описанных структурных особенностей, бицеллы обладают свойством, которое и обеспечило им популярность в ЯМР исследованиях – спонтанная ориентация в магнитном поле. Из-за вытянутости молекулы фосфолипида, значение магнитной восприимчивости  $\chi$  отличается по направлениям параллельно расположению жирных кислот и перпендикулярно [2,3]. Вследствие дискообразного строения бицелл их магнитная восприимчивость тоже отличается по направлениям. В этом случае выделяют параллельное и перпендикулярное направление относительно нормали бислоя  $\mathbf{n}$  [2,3]. Именно различие в магнитной восприимчивости и является «движущей силой», которое приводит к их

спонтанному ориентированию в магнитном поле. Для бицелл принято говорить о  $\Delta\chi$ , которая определяется на единицу объема и составляет сумму вкладов от отдельных липидов и вычисляется по формуле:  $\Delta\chi = \chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$ , где  $\chi_{\parallel}$  и  $\chi_{\perp}$  - это магнитная восприимчивость, относящаяся к параллельному и перпендикулярному направлению относительно нормали бислоя  $\mathbf{n}$  [2,3]. Магнитная часть свободной энергии на единицу объема бицеллы определяется с помощью свободной энергии Гельмгольца[2,3,15]:

$$F = -\frac{1}{2}\Delta\chi(\mathbf{n} * \mathbf{H})^2 = -\frac{1}{2}\Delta\chi B^2 \cos^2 \vartheta \quad (15)$$

где  $\mathbf{H}$  – это напряженность магнитного поля, а угол  $\vartheta$  соответствует углу между направлением нормали бислоя и направлением магнитного поля. В состоянии теплового равновесия свободная энергия минимальна [16]. Следовательно, при  $\Delta\chi < 0$ , энергия Гельмгольца будет положительной и, следовательно, минимальное значение будет  $F = 0$ , что означает, что оптимальный с точки зрения минимума энергии угол  $\vartheta$  будет равен  $90^{\circ}$ . Такой порядок ориентирования называется «отрицательным» (Рисунок 7А).

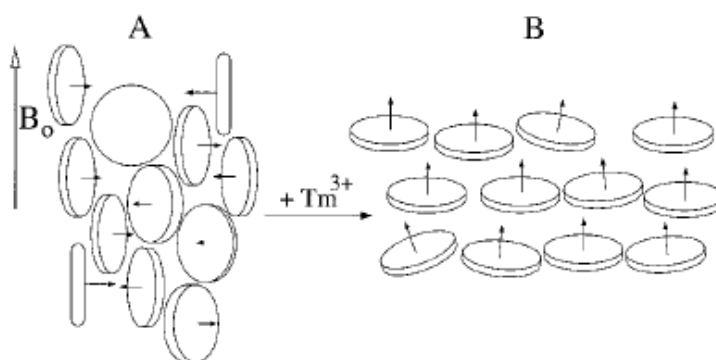


Рисунок 7- Ориентация бицелл ДМФХ/ДГФХ в магнитном поле

(А) «Отрицательная» ориентация ( $\Delta\chi < 0$ ), (В) «Положительная» ориентация ( $\Delta\chi > 0$ ). Стрелками указано направление нормали  $\mathbf{n}$ . После добавления ионов тулия ориентация изменилась с «отрицательной» на «положительную» [3].

Однако можно создать такую систему, где  $\Delta\chi > 0$ , и, соответственно, энергия Гельмгольца  $F < 0$  и, следовательно, минимум энергии будет достигаться при  $\vartheta = 0^0$ . Такой порядок ориентирования называется «положительным» (Рисунок 7В). Для создания «положительно» ориентированных бицелл к «отрицательной» ориентаций добавляются парамагнитные ионы лантаноидов ( $Tm^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ,  $Er^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ), которые связываются с «головками» фосфолипидов и создают положительную  $\Delta\chi$  [3].

Все выше описанные свойства бицелярной системе дают ей несомненное преимущество перед другими модельными биомембранами. Во-первых, наличие плоского бислоя приближает данную модельную биомембрану к реальной мембране клетки [2]. Во-вторых, благодаря всё тому же плоскому бислою уменьшаются искажения в структурных исследованиях белков, пептидов, ферментов и т.д. [2]. В – третьих, благодаря тому, что эта система спонтанно ориентируется, можно получать более разрешенные ЯМР – спектры в структурных исследованиях, так как мы точно знаем направление нормали к поверхности бислоя по отношению магнитному полю [3]. Все выше указанные свойства также позволяют проводить динамические исследования, в частности получить коэффициент латеральной диффузии (КЛД) липидов в данной модели биомембраны [4,5].

### 1.3 Применение $^{31}\text{P}$ спектроскопии в бицеллярных системах

Как говорилось в [1.2] ЯМР метод является одним из основных физических методов исследования бицеллярных систем. При этом при изучении их фазового состояния основное предпочтение отдается ЯМР  $^{31}\text{P}$ - спектроскопии, так как фосфор обладает полуцелым спином ( $I=1/2$ ) и входит в состав полярной части фосфолипидов [1.2], причем на каждую молекулу приходится по 1 спину, и таким образом каждый фосфолипид оказывается им «помеченным». В высоких магнитных полях, где анизотропия химического сдвига является доминирующим вкладом в гамильтониан, резонансная частота  $\nu$  для спина ядра  $^{31}\text{P}$  будет определяться формулой [17]:

$$\nu = \frac{2}{3} \Delta\nu_0 (3 * \cos^2\theta - 1)/2 + \nu_0 \quad (16)$$

где  $\nu_0$  - это среднее положение сигнала,  $\Delta\nu_0$  – анизотропия химического сдвига, а  $\theta$  – угол между осью симметрии тензора химического сдвига и направлением постоянного магнитного поля  $H_0$ .

Если молекула фосфолипида претерпевает изотропное движение (что имеет место в быстро вращающихся везикулах, приготовленных с помощью ультразвука), то первое слагаемое в выражении (16) за счёт усреднения обращается в ноль. В модельных биомембранах, например, липосомах изотропное вращение слишком медленное, чтобы данный эффект проявился [17]. Однако, если молекула фосфолипида претерпевает быстрое ограниченное движение в мембране выражение (16) можно переписать [17]:

$$\nu = \nu_0 + \frac{2}{3} * \langle \nu_{EFF} \rangle \left( 3\cos^2\theta - 1/2 \right), \quad (17)$$

где  $\langle v_{EFF} \rangle = \Delta v_0 \left( 3 \cos^2 \Delta(t) - 1/2 \right)$ , угол  $\theta$  – это угол между средним направлением оси симметрии тензора химического сдвига, а  $\Delta(t)$  – угол между направлением мгновенной оси и средним направлением. Угловые скобки означают усреднение по всем возможным мгновенным направлениям. В неориентированных мембранах значение угла  $\theta$  будут меняться от 0 до  $\pi$  и на спектре будет представлена широкой линией, как сумма всех возможных сдвигов [17]. При этом на спектре будет ассиметричный пик, который будет соответствовать углу  $\theta = \pi$ , и плеча соответствующего углу  $\theta = 0$ . Для ориентированных мембран спектр, как мы увидим на примере ниже, спектр будет зависеть от положения относительно магнитного поля системы.

Для того чтобы, показать как все выше сказанное применяется в бицеллярных системах рассмотрим  $^{31}\text{P}$  спектр неориентированных и ориентированных бицелл (Рисунок 8). При температуре, соответствующей температуре основного фазового перехода  $T_c$  (перехода гель в жидкокристаллическое состояние ) для ДМФХ ( $T \approx 25$  °C), бицеллы находятся в неориентированном состоянии, что определяется на спектре одной неразрешенной линией резонанса, ширина которой определяется как  $\Delta v = v_{\parallel} - v_{\perp}$ . Это выражение определяет размер анизотропии химического сдвига, как разницу между параллельной ( $v_{\parallel}$ ) и перпендикулярной ( $v_{\perp}$ ). Направление перпендикулярное и параллельное определяется относительно нормали бислоя. Таким образом угол  $\theta$  имеет множество значений от 0 до  $\pi$ . Также, считается, что ДГФХ за счёт нахождения в бицеллах в областях с большим радиусом кривизны (обод диска), её усредненное движение можно считать изотропным и, таким образом, в спектре проявляется как узкая спектральная линия.

Соответственно если бицеллы находятся в ориентированном состоянии [1.2], то  $^{31}\text{P}$  спектре ДМФХ будет выглядеть как узкая линия, а остаточный химический сдвиг будет определяться перпендикулярной или параллельной

составляющей  $\sigma_{\perp}$  или  $\sigma_{\parallel}$  (т.е. угол  $\theta$  будет представлен только одним значением), в зависимости от ориентирования «отрицательного» или «положительного» соответственно.

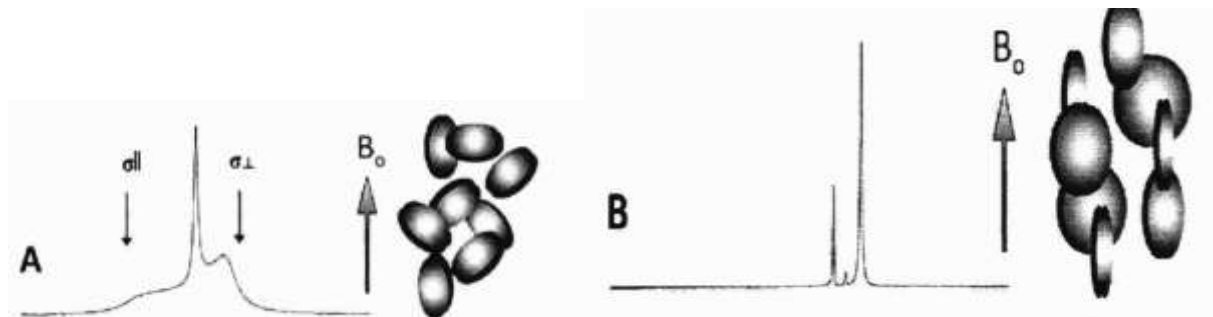


Рисунок 8 –  $^{31}\text{P}$  спектры, полученные для бицелл ДМФХ/ДГФХ (А) бицеллы находятся в неориентированной фазе (при температуре ниже фазового перехода ДМФХ), (В) бицеллы имеют «отрицательный» порядок ориентирования (температура выше температуры фазового перехода ДМФХ) [5].

Еще раз следует отметить, что именно способность спонтанно ориентироваться в магнитном поле, а также наличие плоского бислоя [1,2], сделала бицеллярную систему популярной в структурных исследованиях различных белков и пептидов [1,2]. Эти свойства также заинтересовали и исследователей динамических свойств мембран, в том числе молекулярной подвижности определяемой коэффициентом самодиффузии. Поэтому далее речь пойдет об изучении самодиффузии липидов бицеллярной системе.

#### 1.4 Особенности самодиффузии липидов в бицеллярных системах

Известно [5], что для биологических систем в самом общем в виде систем коэффициент самодиффузии, является анизотропным тензором второго порядка в котором независимы 6 переменных

$$\begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{xy} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{xz} & D_{yz} & D_{zz} \end{pmatrix}. \quad (18)$$

В случае бицеллярных систем независимыми остаются только 2 переменных

$$\begin{pmatrix} D_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & D_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & D_{\parallel} \end{pmatrix}, \quad (19)$$

где  $D_{\perp}$  - это коэффициент, соответствующий латеральной диффузии, происходящей в плоскости мембраны (Рисунок 9), а  $D_{\parallel}$  соответствует коэффициенту самодиффузии в перпендикулярном по отношению к этой плоскости направлению [4,5,18]. Коэффициент  $D_{\parallel}$  соответствует так называемому флип-флоп переходу, происходящему за время порядка 10- 20 часов и более [19], что не позволяет измерить его с помощью ЯМР ИГМП.

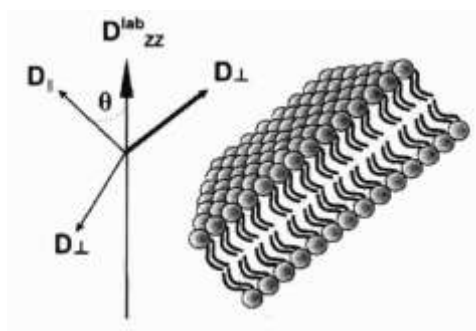


Рисунок 9- Схематическое изображение системы координат, где ось  $D_{zz}^{\text{lab}}$  соответствует направлению постоянного магнитного момента [5].

Итак, в чем же заключается научная ценность исследований молекулярной подвижности липидов в биомембране или ее моделях? Прежде всего, коэффициент латеральной самодиффузии липидов (КЛД) определяется характером взаимодействия между липидами [10]. Поэтому значение КЛД липидов отражает структурную организацию, фазовое поведение, наличие липидных доменов, подвижность и текучесть липидного бислоя, а также изменение этих факторов в присутствии других компонент биомембран – пептидов, белков, холестерина и т.д. То есть, обобщая всё сказанное, коэффициент самодиффузии липидов может быть использован как одна их интегральных характеристик, описывающих физическое состояние биомембраны [10].

Однако эксперименты по измерению коэффициента латеральной диффузии липидов в ЯМР ИГМП сталкиваются с рядом трудностей. Основной проблемой является жидкокристаллическая фаза липидов в воде. Вследствие того, что в этой фазе диполь-дипольного взаимодействия не усредняется за счет движения или вращения, время релаксации  $T_2$  менее 1 мс. Соответственно, затруднительно подобрать длительность градиентного импульса  $\delta$  таким образом, чтоб с одной стороны не исказить импульсную последовательность, а другой стороны, успеть «пометить» спины до расфазировки продольной составляющей намагниченности. Однако, есть множество способов, как решить эту проблему для модельных мембран. Один из них это применение MAS-спектроскопии (вращение под магическим углом) и образца, представляющего из себя липосомы [5]. Их помещают в ротор, который вращается с частотой  $\sim 1-10$  кГц, под магическим углом  $\vartheta=54.74^\circ$ . Откуда взялся этот угол? Если мы рассмотрим гамильтониан, описывающий вклад от диполь-дипольного взаимодействия, то он будет иметь масштабный множитель, являющийся вторым членом разложения полинома Лежандра:



$$P(\vartheta) = (3 \cos^2 \vartheta - 1) / 2 \quad (20)$$

где  $\vartheta$  - это угол между нормалью бислоя и направлением постоянного магнитного поля. Соответственно, если  $\vartheta = 54.74^\circ$ , то  $P(\vartheta) = 0$  и, следовательно, гамильтониан, описывающий вклад от диполь-дипольного взаимодействия, будет равен нулю. Другой вариант решения затруднений фиксирования сигнала от липидной системы - это применение ЯМР ИГМП и использования ориентированных бислоев в качестве образцов. Здесь не используется вращения образца как целого, однако возникает необходимость в специальных датчиках, и в принципе сам процесс приготовления образцов достаточно трудоемкий, поэтому нельзя сказать о том, что такую систему легко использовать для измерений коэффициентов самодиффузии. Поэтому исследователи обратили внимание на бицеллы. Благодаря тому, что они достаточно просты в приготовлении, стабильны, обладают плоским бислоем и способностью спонтанно ориентироваться в магнитном поле, такие системы кажутся привлекательными для измерения КЛСД. Однако, бицеллы бессмысленно вращать под магическим углом, и следовательно невозможно устранить вклад от гамильтониана диполь-дипольного взаимодействия.

Для этого решения этой проблемы проф. Р.М. Макдональдом был предложен метод, суть которого - это добавление ПЭГ-липидов в систему бицелл [4,5]. ПЭГ-липиды состоят из липида 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфотидилэтаноламина (ДМФЭ) и присоединенного к «головке» этого липида ковалентной связью полиэтиленгликоля (ПЭГ). В воде этот липид встраивается в плоский бислой бицелл (Рисунок 10). Таким образом, ПЭГ оказывается эффективно «привитым» к бислою. За счёт гибкости и подвижности данного полимера от него можно зафиксировать сигнал. Свою очередь латеральная самодиффузия ПЭГ-липидов, в основном определяется подвижностью липида, следовательно КЛСД соответствует латеральной диффузии липидов [4,5].

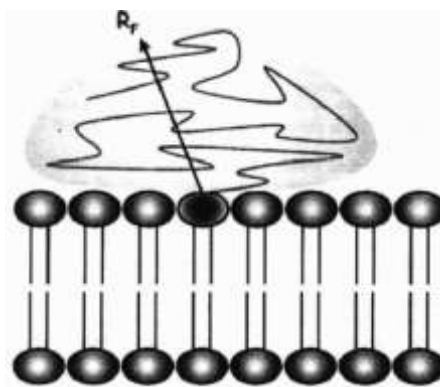


Рисунок 10 –Схематическое изображение липидного бислоя со встроенным ПЭГ-липидом [5].

Однако при использовании ПЭГ-липидов в таком качестве возникли некоторые нерешенные вопросы. Во-первых, автор указывает на зависимость получаемого при помощи такого метода коэффициента самодиффузии  $D_s$  от молярной концентрации ПЭГ-липидов в образце. Это означает возможное наличие взаимодействия между ПЭГ. Исходя из данных представленных в статье [4,5] для бицелл ДМФХ/ДГФХ с концентрацией  $c = 0,33$  г/мл и молярным соотношением  $q=4.5$   $D_{s(\text{ДМФЭ-ПЭГ}2000)} = 1.35 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$  для молярной концентрации ПЭГ-липидов, равной 1%, и  $D_{s(\text{ДМФЭ-ПЭГ})} = 1.15 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$  – для 2%. Объяснение подобного замедления коэффициента самодиффузии дано в тех же статьях [4,5]. Там предполагалось взаимодействие между различными молекулами ПЭГ-липидов, встроенными в бислой одной бицеллы [4,5]. Данное предположение делается исходя из размеров ПЭГ-липидов, находящегося над бислоем бицелл. Существует порог концентраций ДМФЭ-ПЭГ2000. Если он не достигнут, то прямые взаимодействия между полимерными частями молекул редки и носят случайный характер. Однако, по достижении порога концентраций, области, в которых могут свободно колебаться полимерные части молекул ПЭГ – липидов, начнут пересекаться, что приведет к их взаимодействию между собой и, как следствие, замедлению видимого КСД []. Для определения данного порога концентрации, необходимо определить размер области,

который характеризуется радиусом Флори. Согласно уравнению Флори [5] этот радиус определяется из следующего соотношения:

$$R_f = N^{3/5}a, \quad (21)$$

где  $N$  – количество мономеров и  $a$  – длина одного мономера.

Из литературных данных известно [20], что длина мономера ПЭГ равна  $3.5\text{Å}$ , а их количество в ДМФЭ-ПЭГ– 45. Тогда значение радиуса Флори равно:

$$R_f = 45^{3/5} * 3.5 \text{Å} = 34,5 \text{Å} \cong 35 \text{Å} \quad (22)$$

Исходя из такой оценки, авторы статьи получают, что полное покрытие всей ламеллярной поверхности бицеллы достигается при молярной концентрации ПЭГ-липида, равной 1,7% [5]. Таким образом при концентрации 2мол% ДМФЭ-ПЭГ2000 происходит перекрытие поверхности бислоя и тем самым и объясняя замедления коэффициента самодиффузии.

Вторым вопросом, не имеющим на данный момент четкого, обоснованного ответа, является неограниченная диффузия в образцах ДМФХ/ДГФХ бицелл. Это может говорить о том, что диффундирующие молекулы липида не встречают на своем пути никаких ограничений движения [4,5,18]. Однако, это достаточно странный факт, учитывая, что бицеллы – это отдельные частицы, имеющие конечные, и довольно малые, размеры. Как было указано в параграфе 1.2 линейный размер бицелл равен приблизительно  $300\text{Å}$  ( $q = 4.5$ ). Теперь оценим среднеквадратичное смещение молекул липидов по бицелле при значениях КСД  $D=1,35 \cdot 10^{-11}\text{м}^2/\text{с}$  и времени диффузии  $t_d= 615\text{мс}$  с помощью уравнения Эйнштейна:

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt_d \quad (23)$$

Значение  $r$  в таком случае будет приблизительно равно 6 мкм. Но каким образом молекула, заключенная в расстоянии 300 Å, могла сместиться на 6 мкм?

Первое предположение, которое было представлено в литературе, заключается в том, что образец, возможно, находится не в дискообразном фазовом состоянии, а в фазе перфорированной ламеллярной структуры (Рисунок 11).

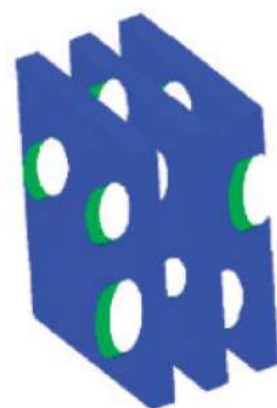


Рисунок 11 – Схематическое изображение перфорированной ламеллярной фазы липидной модельной системы. Синим цветом условно обозначено расположение молекул ДМФХ, зеленым – ДГФХ [2].

Если предположить, что исследуемый образец действительно находится не в дискообразной фазе, а существует в виде перфорированных ламелл (плоскостей), тогда становится очевидным отсутствие видимых диффузионных ограничений. Такая ламелла не имеет фиксированных размеров и теоретически может распространяться на расстояния, значительно превышающие 6 мкм [2]. Однако, в таком случае возникают некоторые вопросы, ставящие под сомнение возможность использовать такие системы для исследования латеральной диффузии липидов.

Во-первый, в этом случае становится не до конца ясен процесс ориентирования таких ламелл под воздействием магнитного поля. Ведь размер одной такой «частицы» будет во много раз превышать размер

бицеллы, а механизм поворота остается прежним. Данное обстоятельство ставит под сомнение возможность упорядочивания ориентации такой структуры под воздействием магнитного поля в принципе. К сожалению, информация, имеющаяся в литературе, выглядит слишком мозаично и несистематизировано [2,5], и делать выводы, основываясь только на ней, нам не представляется не совсем корректным.

Ещё одним вариантом объяснений несоответствия линейных размеров бицелл и смещением метки – это движение бицелл, как целого. В связи с этим в [4] была проведена оценка такого коэффициенты самодиффузии при помощи уравнения Стокса-Эйнштейна (8). Был получен коэффициент  $7 \cdot 10^{-15}$  м<sup>2</sup>/с, при этом вязкость среды оценивалась в 1000 раз больше воды [4]. Нам показалось некорректной такая оценка, так как в уравнение (8) входит вязкость растворителя, а для бицелл соответственно это будет вода и следовательно коэффициент самодиффузии равен –  $1,2 \cdot 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с, что коррелирует с полученным коэффициентом диффузии –  $D=1.35 \cdot 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с.

Таким образом, целью работы является исследование методом ЯМР ИГМП особенности трансляционной подвижности в бицеллярных системах и оценка применимость бицеллярных систем, в качестве нового класса модельных биомембран для исследования самодиффузии липидов.

## ЧАСТЬ 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИСЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Метод исследования

1) ЯМР ИГМП диффузометрия с импульсной последовательностью стимулированного эхо;

- значение градиента до 30 Тл/м;
- температура проведения измерений 303 К и 308 К;
- время ориентирования образца в магнитном поле 30мин;
- диапазон времен диффузии  $t_d = 50 - 1000$ мс.;
- программа обработки данных «TopSpin v.3.1».

Исследования проводились на спектрометре «AVANCE 400 III TM», оптимизированном для измерения самодиффузии.

2)  $^{31}\text{P}$  ЯМР спектроскопия;

- температура проведения измерений 303К;
- время ориентирования образца в магнитном поле 30мин.

Данные ЯМР ИГМП обработаны в программе «Origin 7.5». Графики представлены в полулогарифмических осях.

## 2.2. Объекты исследования

Объектом исследования является суспензии бицелл, состоящих из двух видов липидов – ДМФХ ( $M=678$  г/моль) и ДГФХ ( $M=453,5$  г/моль) с добавлением ПЭГ-липидов (ДМФЭ-ПЭГ2000), ПЭГ2000 и ДПФП, растворенных в буферном растворе. Буфер сделан на основе дейтерированной воды  $D_2O$ , 150 ммоль соли NaCl (молярная масса равна 58,4 г/моль) и 50 ммоль соли Tris (молярная масса - 121 г/моль). Изначальный pH раствора при таких концентрации солей равен  $\approx 10$ . Далее pH раствора был снижен до 7,4 путем добавления небольшого количества 0,1 М раствора соляной кислоты (HCl).

Было приготовлено пять типов образцов бицеллярной системы:

1. Бицеллярная система ДМФХ/ДГФХ с общей концентрации липидов равной  $c=0,33$  г/мл и  $q=4.5$ . с добавлением 2 мол% ПЭГ – липида (ДМФЭ-ПЭГ2000).
2. Бицеллярная система ДМФХ/ДГФХ с общей концентрации липидов равной  $c=0,07$  г/мл и  $q=3.2$  с добавлением 2 мол% ПЭГ – липида (ДМФЭ-ПЭГ2000).
3. Бицеллярная система ДМФХ/ДГФХ с общей концентрации липидов равной  $c=0,07$  г/мл и  $q=3.2$  (без метки)
4. Бицеллярная система ДМФХ/ДГФХ с общей концентрации липидов равной  $c=0,33$  г/мл и  $q=4.5$  с добавлением 2 мол% ПЭГ2000
5. Бицеллярная система ДМФХ/ДГФХ с общей концентрации липидов равной  $c=0,07$  г/мл и  $q=3.2$  с добавлением 5 мг ДПФП

Методика приготовления предполагает также наличие циклов нагревания – охлаждения с переходом через температуру фазового перехода гель – жидкокристаллическая фаза ДМФХ ( $T \approx 25$  °C).

Также нами был создан ещё один образец – это стандартные ориентированные бислои из ДМФХ (концентрация липидов 15 мг/мл) с добавлением 2 моль% ПЭГ - липида (ДМФЭ-ПЭГ2000).

### ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Исходя из того, что данные, представленные в литературе, были получены при максимальном градиенте 2,5 Тл/м, мы решили исследовать бицеллярную систему в более широком динамическом диапазоне (до 12 Тл/м). Первым экспериментом, который мы провели, было получение одномерного  $^1\text{H}$  спектра бицеллярной системы ДМФХ/ДГФХ с  $q=4.5$ ,  $c = 0,33$  г/мл и добавлении 2 мол% ДМФЭ-ПЭГ2000. На рисунке 12 представлен типичный для данной системы спектр.

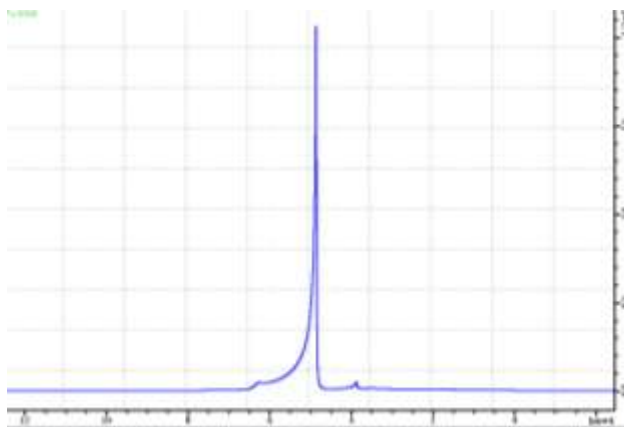


Рисунок 12 – Одномерный  $^1\text{H}$  спектр бицеллярной системы  $c = 0,33$  г/мл,  $q = 4,5$  с добавлением 2 мол% ДМФЭ-ПЭГ2000,  $T=303\text{K}$ .

Резонансный пик, находящийся на частоте приблизительно 5 ppm, принадлежит воде  $\text{H}_2\text{O}$  и находится на стандартном для воды положении. Его появление на спектре объясняется обменом протонами с молекулами составляющего бислой фосфолипида. Этот сигнал достаточно быстро затухает, что характерно для воды так, как она обладает много большей молекулярной подвижностью, по сравнению с липидами.

Второй явно выделенный резонанс на частоте порядка 4 ppm относится к сигналу, который в литературных данных приписывается к этиленоксидными группами молекул ДМФЭ-ПЭГ2000. Этот сигнал как характерно



для большой полимерной молекулы, прикрепленной к бислою, затухает значительно медленнее.

Так же на данном спектре видно «плато» в пределах от 8 до 0 ppm. Возможность появления подобного сигнала на спектре была указана в литературных данных [4,5] и объясняется сигналом от молекул липида ДГФХ, которые по сути являются «ободом» диска для каждой бицеллы и могут находиться под любыми возможными углами по отношению к направлению магнитного поля. С последним связывают то, что сигнал настолько уширен. Отметим, однако, что вклад от данного «плато» не дает существенного вклада в диффузионные затухания (ДЗ) при больших значениях градиента магнитного поля [4,5].

Далее, на рисунке 13 представлен график типичного ДЗ для данной системы.

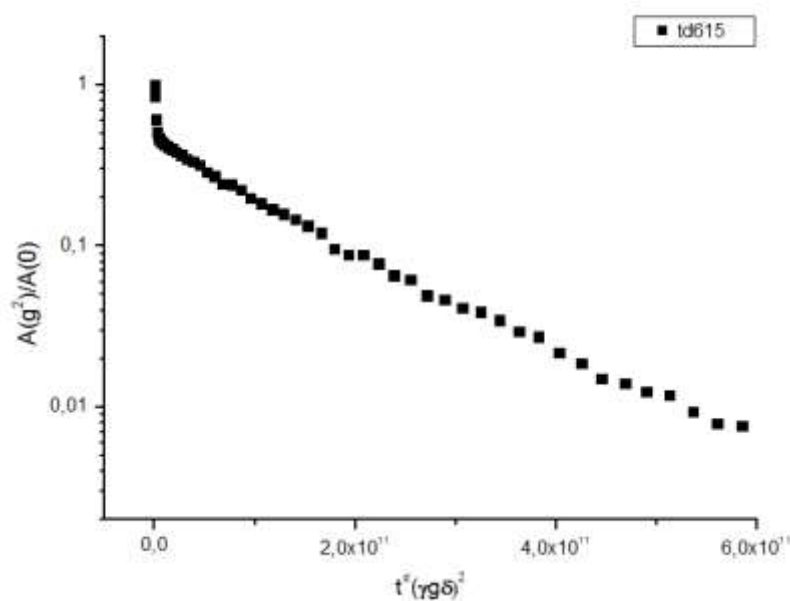


Рисунок 13 – График одиночного диффузионного затухания для образца бицеллярной модельной системы с соотношением  $q=4.5$  (ДМФХ/ДГФХ), 2 мол% ДМФЭ-ПЭГ2000,  $T=308\text{K}$ ,  $t_d=615\text{мс}$ .

График, построенный в полулогарифмических координатах, имеет явный немонотонноэкспоненциальный вид, который может быть описан при помощи 2-х экспоненциальной функции с коэффициентами самодиффузииД

$D = 1.5 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$  и  $D = 1.1 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ . Первая компонента соответствует КСД воды в биосистемах и не совпадает со значением для объемной воды при той же температуре.

Вторая компонента  $D=1.1 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ , согласно спектру приписывается ПЭГ-липиду и значение совпадает с данными, представленными в литературе  $D_s=1,1 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$  [4,5]. Данный коэффициент медленнее по сравнению с данными, полученными с помощью иных методов измерения КСД в таких системах  $D_s=1,35 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$  [4,5]. Причина уменьшения значения коэффициента в том, что в превышен порог молярной концентрации ДМФЭ-ПЭГ2000 в 1,7 мол%.

Так как в литературных данных [4,5] было указано, что указано отсутствие аномальной диффузии, нами была проведена серия экспериментов с той же бицеллярной системой с варьированием времени диффузии в диапазоне 10-1000 мс. График ДЗ в зависимости от времени диффузии представлен на рисунке 14.

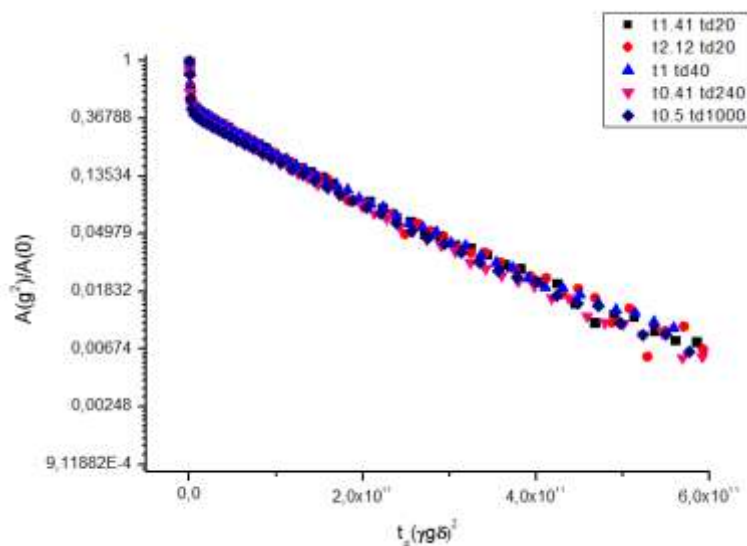


Рисунок 14 – График диффузионного затухания для образца бицеллярной модельной системы с концентрацией  $c = 0,33 \text{ г/мл}$ , с соотношением  $q=4.5$  (ДМФХ/ДГФХ), 2% ДМФХ-ПЭГ2000,  $T=308\text{К}$ , в зависимости от времени диффузии.  $t_d = 20\text{мс}$ , 40мс, 240мс, 1000мс.

Очевидно, что коэффициент самодиффузии для бицеллярной системы не зависит от времени диффузии. Из значений, представленных в таблице 1,

видно, что среднее значение КСД составляет  $D_s=1 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$  в пределах погрешности измерений.

Таблица 1 – Значения КСД для бицеллярной системы ДМФХ/ДГФХ с  $q=4.5$ , 2 мол% ДМФЭ-ПЭГ2000,  $T=308\text{K}$

|  | $t_d=20\text{мс}$     | $t_d=20\text{мс}$    | $t_d=40\text{мс}$  | $t_d=240\text{мс}$    | $t_d=1000\text{мс}$   |
|--|-----------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| $D_s(\text{ДМФЭ-ПЭГ2000}), \text{ м}^2/\text{с}$ | $0.95 \cdot 10^{-11}$ | $1.1 \cdot 10^{-11}$ | $1 \cdot 10^{-11}$ | $1.04 \cdot 10^{-11}$ | $0,98 \cdot 10^{-11}$ |

Из-за того, что вид диффузионного затухания и значения КСД не зависят от времени диффузии можно предположить, что при движении молекула липида на всем диапазоне времен  $t_d$  не взаимодействует с пространственными ограничениями, что соответствует выводу проф. П.М. Макдональда в его исследованиях [4,5]. Если провести оценки среднеквадратичного смещения с помощью уравнения Эйнштейна (23), мы получим, что молекула ПЭГ – липида сместиться на расстояние в сотни раз больше, чем размер одной бицеллы (6 мкм по сравнению с  $300 \text{ \AA}$  . Но каким образом молекула ПЭГ- липида могла сместиться на такое расстояние и не почувствовала ограничений? В статьях [4,5] данный факт объясняется нахождением системы в другом фазовом состоянии, не дискообразном, а в виде перфорированных пластин. Так как теоритически перфорированные пластины могут быть размерами порядка 1 мкм [2], данное поведение ПЭГ-липиды можно соотнести к перемещению по данной системе. Однако возникает ряд вопросов связанных, например, с ориентированием данной системы, ведь размеры системы во много раз превышают размеры одной бицеллы, а механизм данного процесса остается прежним

Еще одним объяснением отсутствия на диффузионных затуханиях зависимости от времени диффузии может быть движением бицелл как

целого, ведь для их движения действительно не существует никаких ограничений. В статьях П.Ф. Макдольнода [4,5] была проведена оценка коэффициента самодиффузии движений бицелл как целого и значение оценивалось порядка  $7 \cdot 10^{-15} \text{ м}^2/\text{с}$ . Однако мы не согласны с данной цифрой, так как вязкость среды была оценена в 1000 раз больше воды [4], но ведь бицеллы растворены в воде и, следовательно, в формуле Стокса – Эйнштейна (8) надо брать вязкость соответствующей воде. Таким образом, пересчитав значение с вязкостью воды, получим  $1,2 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ , что коррелирует с полученными данными.

Итак, если в системе действительно присутствует движение бицелл как целого, то, скорее всего, это можно зафиксировать и без добавления в систему метки, поэтому следующим шагом было исследования бицеллярной системы ДМФХ/ДПФХ с концентрации  $c = 0,07 \text{ г/мл}$ ,  $q = 3,2$ . Концентрация липидной системы была уменьшена, чтобы снизить вероятность образования перфорированных пластин, так как исключить появления данное фазовое состояния мы не можем.

На рисунке 15 был получен одномерный  $^1\text{H}$  спектра для бицеллярной системы ДМФХ/ДПФХ с концентрации  $c = 0,07 \text{ г/мл}$ ,  $q = 3,2$  при температуре  $T = 303 \text{ К}$ .

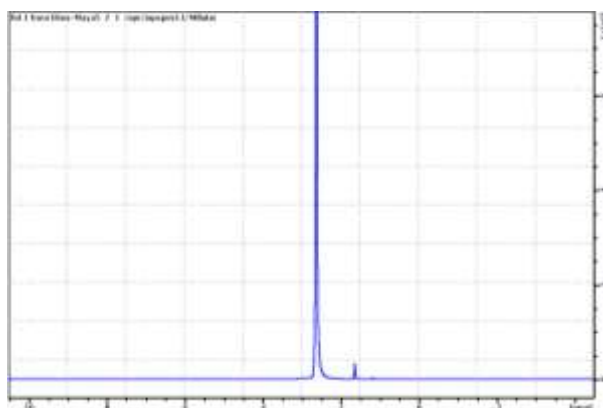


Рисунок 15 – Одномерный  $^1\text{H}$  спектр бицеллярной системы  $c = 0,07 \text{ г/мл}$ ,  $q = 3,2$ ,  $T = 303 \text{ К}$ .

Резонансный пик, находящийся на частоте приблизительно 5 ppm, принадлежит воде HDO и находится на стандартной для воды частоте. Его появление, также как на спектре бицелярной системы с ПЭГ-липидом, объясняется обменом протонами с молекулами составляющего бислой фосфолипида.

Второй явно выделенный резонанс на частоте порядка 4 ppm относится к сигналу, который можно приписать только к CH<sub>3</sub> и CH<sub>2</sub> группам, входящих в состав липидов. Вообще говоря, в рамках метода ЯМР невозможно наблюдать сигнал от отдельных липидов, так как они находятся в жидкокристаллическом состоянии. Данное состояние подобно твердому телу, и из-за диполь-дипольных взаимодействии «укорачивается» время T<sub>2</sub> релаксации. Наблюдать сигнал возможно только или при помещении системы под магический угол и при вращении образца или наличие такого вращения в системе. Так как в данной работе технологий с использованием магического угла не использовались, и образец не помещался в ротор, наблюдение сигнала от липидов говорит о вращении бицелл как целого. Также данный факт подтверждается <sup>31</sup>P спектром, представленным на рисунке 16.

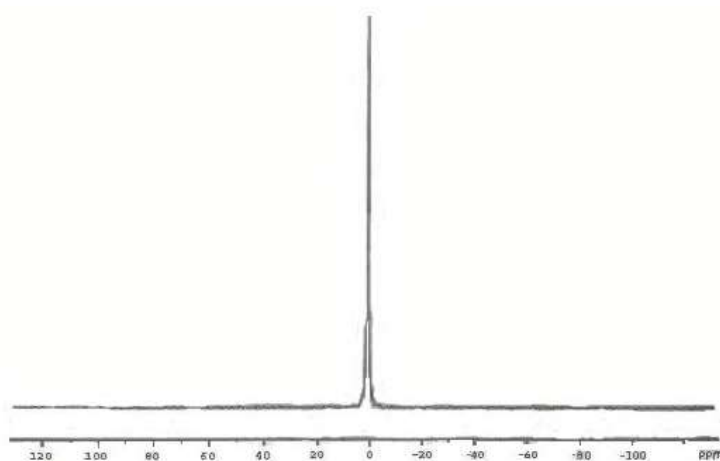


Рисунок 16 – <sup>31</sup>P ЯМР спектр образца бицелярной системы без метки с концентрацией c=0,33 г/мл, соотношением q=3.2, T=303 К, время выдержки в магнитном поле 30мин.

На графике четко видна узкая резонансная линия в районе 0 ppm. Данный вид спектра соответствует бицеллярной системе, в которой присутствует быстрое изотропное вращение бицелл как целых [21]. При таком вращении химические сдвиги ДМФХ и ДПФХ усредняются, поэтому на графике видна узкая линия [21]. Следует отметить тот факт, что данная система является не ориентированной.

Далее было получено диффузионное затухание ДМФХ/ДГФХ с  $q = 3.2$ ,  $c = 0,07$  г/мл. График типичного диффузионного затухания представлен на рисунке 17.

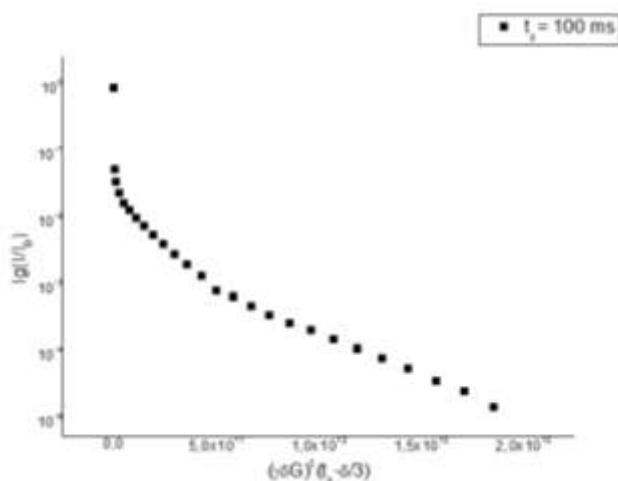


Рисунок 17 – График диффузионного затухания для образца бицеллярной системы с концентрацией  $c = 0,07$  г/мл, с соотношением  $q=3.2$  (ДМФХ/ДГФХ),  $T=303$ К, время диффузии.  $t_d = 50$ мс.

График построен в полулогарифмических координатах, и, имеет явный немонотонноэкспоненциальный вид, который может быть описан при помощи 3-х экспоненциальной функции с КСД  $D_1 = 1,8 \cdot 10^{-9}$  м<sup>2</sup>/с,  $D_2 = 9,0 \cdot 10^{-12}$  м<sup>2</sup>/с.  $D_3 = 2,9 \cdot 10^{-12}$  м<sup>2</sup>/с. Первая компонента принадлежит воде, и ее значение коэффициента коррелирует со значением, полученным в ходе эксперимента бицеллярной системы с ПЭГ – липидом.

Вторая компонента со значением коэффициента  $D = 9,0 \cdot 10^{-12}$  м<sup>2</sup>/с, судя по спектрам принадлежит  $\text{CH}_3$  и  $\text{CH}_2$  группам липидов. Значение коррелируют с тем, что было получено ранее для исследований с

«диффузионной» меткой ПЭГ – липидом, тем самым подтверждая теорию о движении бицелл как целого в этой системе, так как говорилось ранее сигнал от отдельных липидов в данной системе зафиксировать не возможно и таким образом, получить их КСД нельзя. Следовательно, полученный КСД может говорить, только о движении бицелл как целого.

Также четко выделяется третья компонента со значением коэффициента  $D = 2.9 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ . Появление этой компоненты в данном диффузионном затухании можно объяснить возможными агрегатами, состоящими из нескольких бицелл, времена корреляции которых позволяют дать вклад в систему. Чтобы определить коэффициент самодиффузии подобных агрегатов воспользуемся формулой Стокса – Эйнштейна (8), однако сами бицеллы и их агрегаты имеют явную несферическую форму, поэтому для оценки возьмем формулу Стокса – Эйнштейна, модифицированную для случая эллипсоида [22]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R F} \quad (24)$$

где  $F$  – это так называемый форм – фактор, формула которого выглядит следующим образом ( $p = a/b$ , где  $a$  и  $b$  – это большая и малая полуось эллипса) [22,23]:

$$F = \frac{\sqrt{p^2 - 1}}{p^{2/3} \arctan(\sqrt{p^2 - 1})},$$

если  $p > 1$                       (25)

$$F = \frac{\sqrt{1 - p^2}}{p^{2/3} \log \frac{1 + \sqrt{1 - p^2}}{p}}, \quad \text{если } p < 1 \quad (26)$$

Таким образом, если мы предложим, что бицеллы взаимодействуют между собой преимущественно бислоем и создают агрегаты, у которых не меняясь в радиусе увеличивается высота или если описывать с точки зрения эллипса малая полуось, можно рассчитать КСД. Для расчета использовалось что для бицелл большая полуось соответствует ее радиусу  $R = 150\text{\AA}$  [2,4,5,12], малая полуось соответствует ширине бислоя и равна  $60\text{\AA}$  [2,12]. Расчеты велись для значение температуры  $T = 303\text{ K}$  и вязкости системы  $\eta = 0,0125\text{ Па}\cdot\text{с}$ , соответствующей вязкости  $D_2O$ . Результаты расчетов приведены в таблице 2.

Таблица 2 – значение коэффициента самодиффузии для агрегатов бицелл

| Количество бицелл, создавших агрегата | Соотношении $p = a/b$ | Форм – фактор F | Коэффициент диффузии D, $10^{-12}\text{ м}^2/\text{с}$ |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------|--|
| 2                                     | 1,250                 | 1,004           | 9,82   |
| 3                                     | 0,8(3)                | 2,309           | 4,3  |
| 4                                     | 0,625                 | 2,349           | 4,2  |
| ...                                   |                       |                 |  |
| 20                                    | 0,125                 | 3,301           | 3,0  |

Из таблицы 1 видно, что коэффициент для агрегата из двух бицелл и из трех отличаются примерно в два раза, так как очевидно меняется геометрия бицелл и из сплющенного эллипсоида, для которого  $p > 1$ , система становится вытянутым эллипсоидом  $p < 1$  (Рисунок 18). Также следует отметить, что сказать какое именно количество бицелл образуют один агрегат, мы не можем, так как помимо значения коэффициента самодиффузии это определяется и временами корреляции системы.



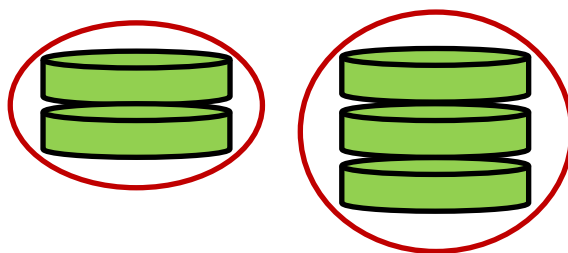


Рисунок 18 – Схематическое изображение агрегатов состоящих их 2 и 3 отдельных бицелл. Зеленые цилиндры соответствуют отдельным бицеллам., бордовая линия - предполагаемой эллипсоидальной оценке системы.

Данная оценка также коррелирует с данными, полученными для бицелярной системы без метки. Тем самым можно предположить, что мы наблюдаем движение как одиночных бицелл, так и агрегатов, состоящих из нескольких бицелл. Таким образом, теоритическая оценка подтверждает наше предположение об создание агрегатов в этой системе, однако это по-прежнему остается лишь гипотезой, так как в рамках наших исследований её невозможно проверить.

Для того чтобы убедиться, что появление третьей компоненты не связано с уменьшением концентрации липидов в системе, нами было проведено исследование диффузионного затухания бицеллярной системы ДМФХ/ДПФХ с концентрации  $c = 0,07$  г/мл,  $q = 3,2$  с добавлением 2 мол% ДМФЭ-ПЭГ2000 при температуре  $T = 303$  К. График типичного затухания представлен на рисунке 19.

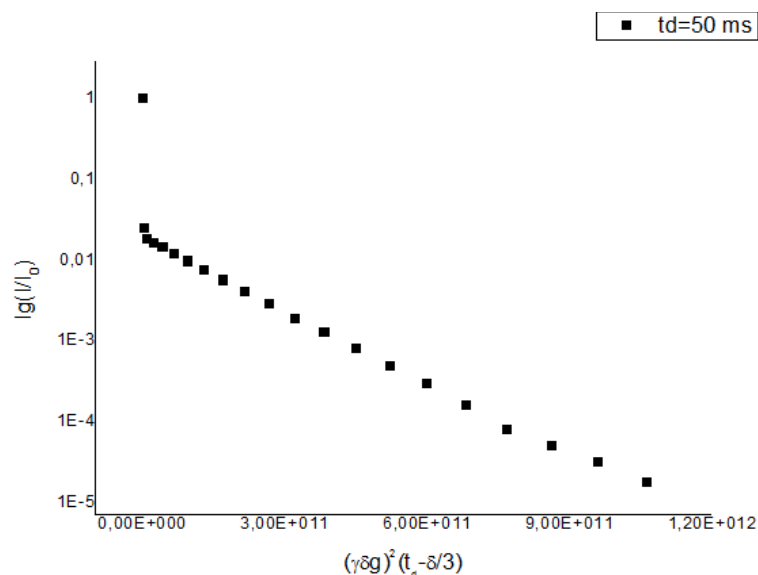


Рисунок 19 – График диффузионного затухания для образца бицеллярной модельной системы с концентрацией  $c = 0,07$  г/мл, с соотношением  $q=3.2$  (ДМФХ/ДГФХ), 2 мол% ДМФХ-ПЭГ2000,  $T=303$ К, времени диффузии.  $t_d = 50$ мс.

График построен в полулогарифмических координатах, и, имеет явный немонотонноэкспоненциальный вид, который может быть описан при помощи 2-х экспоненциальной функции с КСД  $D = 1,8 \cdot 10^{-9}$  м<sup>2</sup>/с и  $D = 9,0 \cdot 10^{-12}$  м<sup>2</sup>/с. Оба полученных коэффициентов совпадают с теми, что бы получены для бицеллярной системы с более большей концентрацией, таким образом мы можем утверждать, что концентрация не влияет на полученные КСД.

Отсутствие третьей компоненты в экспериментах с «диффузионной» меткой ПЭГ – липидом может говорить о том, что система находится в другом в фазовом состоянии и причина кроится в возможном взаимодействии ПЭГ, входящего в структуру метки, с системой.

Для того чтобы понять взаимодействует или нет ПЭГ с бицеллярной системой нами было проведено исследование диффузионного затухания ДМФХ/ДГФХ с  $q = 4.5$ ,  $c = 0,33$  г/мл при добавлении 2 мол% ПЭГ2000. Следует отметить, что этот тип образцов визуально отличается от предыдущих. Он имеет бело-молочный цвет, в отличие от остальных образцов, которые были оптически прозрачны. Это свидетельствует о наличие в системе объектов размерами приблизительно равными длине волн

видимого света, т.е. порядка 1 мкм. Таким образом, это уже свидетельствует об изменении фазового состояния системы. График типичного затухания представлен на рисунке 20.

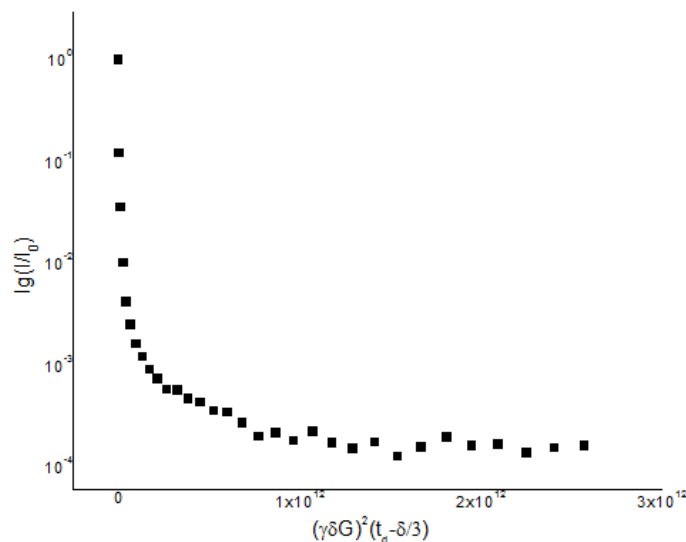


Рисунок 20 – График диффузионного затухания для образца бицеллярной модельной системы с концентрацией  $c = 0,33$  г/мл, с соотношением  $q=4.5$  (ДМФХ/ДГФХ), 2 мол% ПЭГ2000,  $T=303K$ , времени диффузии.  $t_d = 100$ мс.

График диффузионного затухания построен в полулогарифмических координатах и имеет вид, явный немонотонноэкспоненциальный вид, сходный для диффузионного затухания липосом [24]. Как известно, анализировать такие данные достаточно сложно [24], так как не представляется возможным понять какой из имеющих коэффициентов диффузии приписать ПЭГ, воде и т.д. Вид диффузионного затухания может свидетельствовать о наличии в системе агрегационных взаимодействий как между самим молекулами ПЭГа, так и взаимодействия ПЭГ с липидами. Данный факт ставит под сомнение использования данного класса «диффузионных» меток. Однако, необходимо отметить, что идея применения «диффузионных меток» для изучения трансляционной подвижности липидов в составе модельной биомембраны является перспективной и заслуживает отдельного исследования.

Таким образом, следующим нашим шагом, было исследовать метку ПЭГ – липид в составе другой модельной липидной системы. Выбор пал на

традиционную для метода ЯМР ИГМП модельную систему – ориентированные бислои, в которые мы добавили 2 мол% ДМФЭ-ПЭГ2000. Обычно ориентированные бислои изучают, помещая данную систему под магическим углом по отношению градиенту, так как это связано с не усреднённым диполь-дипольным взаимодействием в этой системе и без этой процедуры зафиксировать сигнал от липидов невозможно. Данная система была ориентирована под 90 градусов, таким образом, фиксирование какого – либо сигнала помимо воды, уже будет говорить о подвижности метки. График типичного диффузионного затухания представлен на рисунке 21.

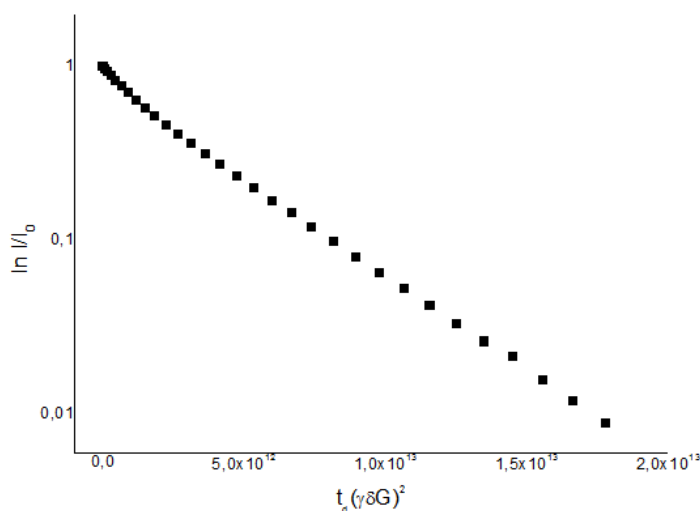


Рисунок 21 – График диффузионного затухания для образца бицеллярной модельной системы с концентрацией  $c = 0,33$  г/мл, с соотношением  $q=4.5$  (ДМФХ/ДГФХ), 2% ДМФХ-ПЭГ2000,  $T=308$ К, время диффузии.  $t_d = 100$ мс.

График построен в полулогарифмических координатах, и, имеет немонотонноэкспоненциальный вид, который может быть описан при помощи 2-х экспоненциальной функции. Первая компонента принадлежит воде, а вторая компонента  $D = 2,5 \cdot 10^{-13}$  м<sup>2</sup>/с, судя по спектрам принадлежит ПЭГ-липиду. Это значение на порядки ниже значения для ДМФХ в подобном образце ( $D = 9.3 \cdot 10^{-12}$  м<sup>2</sup>/с). Это означает возможность того, что ПЭГ «притянул» к себе воду и тем самым, возможно, изменил фазовое состояние бислоя. Это также свидетельствует о взаимодействии метки со системой. Однако тот факт, что

ПЭГ достаточно гигроскопичное соединение, а содержание воды в ориентированных образцах ограничено (порядка 30%), это означает, что взаимодействие ПЭГ с липидами и изменение фазового состояния в этой системе неизбежно. Таким образом, ПЭГ-липид и в данной системе не подходит для измерения коэффициента самодиффузии липидов, однако тот факт, что мы в принципе наблюдаем медленную компоненту в данном исследовании все ещё дает возможность говорить о перспективах применения подобных модифицированных липидов в качестве «диффузионных» меток.

Поэтому мы решили подобрать другую «диффузионную» метку. Наш выбор пал на модифицированный липид 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилпропанол (ДПФП) (Рисунок 22).

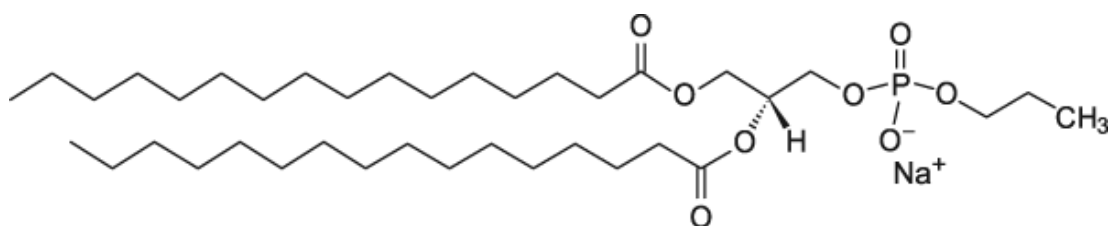


Рисунок 22 – Структурная формула дипальмитоилфосфотидилпропанола (ДПФП)

Его основное отличие от ПЭГ – липида состоит в том, что вместо присоединенного к головной группе полимера, ДПФП содержит другой многоатомный спирт – пропанола (пропиловый спирт). Таким образом, вместо полимера, над бислоем бицелл располагается остаток спирта, содержащий  $\text{CH}_3$  группу, от которой можно зафиксировать сигнал, так как уже она будет находиться не в жидкокристаллическом состоянии. Он должен меньше влиять на значение КСД, к тому же практически исключена возможность взаимодействия меток между собой, так как взаимодействие с  $\text{CH}_3$  групп несравнимо с взаимодействием между собой двух полимеров ПЭГ с молекулярной массой 2000 дальтон.

Для того чтобы оценить возможности новой метки нами было проведено исследование диффузионного затухания бицеллярной системы ДМФХ/ДГФХ с  $q = 3.2$ ,  $c = 0,07$  г/мл при добавлении 5 мг ДПФП. Количество метки было рассчитано на основании данных о чувствительности прибора [Приложение А]. График типичного диффузионного затухания для данной системы представлен на рисунке 23.

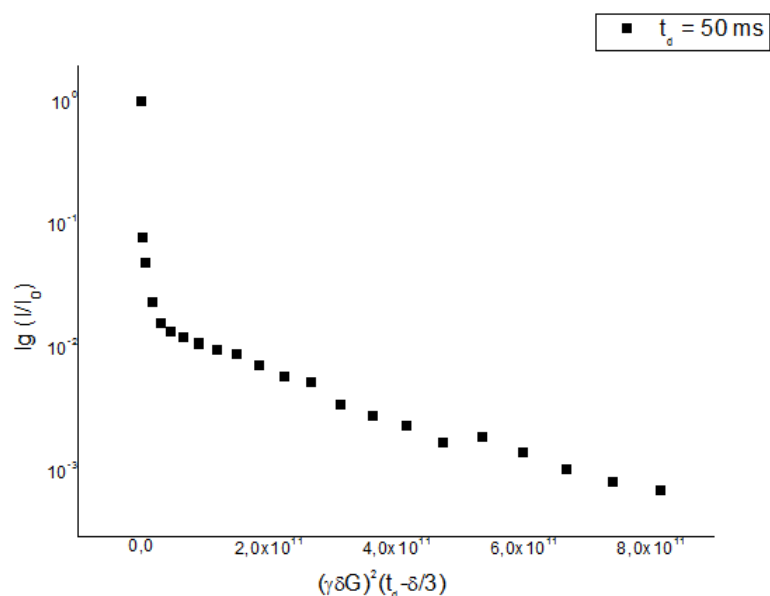


Рисунок 23 – График диффузионного затухания для образца бицеллярной модельной системы с концентрацией  $c = 0,07$  г/мл, с соотношением  $q=3.2$  (ДМФХ/ДГФХ), 5 мг ДПФП,  $T=303K$ , времени диффузии.  $t_d = 50$ мс.

График построен в полулогарифмических координатах, и, имеет явный немонотонноэкспоненциальный вид, который может быть описан при помощи 3-х экспоненциальных функций с КСД  $D_1 = 1,710^{-9}$  м<sup>2</sup>/с,  $D_2 = 9,2 \cdot 10^{-12}$  м<sup>2</sup>/с и  $D_3 = 2,9 \cdot 10^{-12}$  м<sup>2</sup>/с. Значения КСД соответствуют в пределах ошибки значениям для бациллярной системы без метки и объясняются исходя из тех же соображений. Таким образом, очевидно, что метка не взаимодействует со системой, однако оценить ее возможности в рамках наших исследований не предоставляется возможным.

## ВЫВОДЫ

В ходе работы удалось установить, что основной вклад в диффузионные затухания бицеллярной системы обусловлен движением бицелл как целого. Соответственно, исследуемая бицеллярная система как модельная биомембрана не позволяет измерять коэффициенты латеральной диффузии липидов.

Присутствие ПЭГ-липидов в качестве «диффузионных меток» в составе бицеллярной системы приводит к существенным изменениям в структуре и фазовом состоянии липидной системы, что ставит под сомнение целесообразность применения данного типа «диффузионных меток».

Применение «диффузионных меток» представляется перспективным при исследовании латеральной диффузии липидов в составе модельной биомембраны методом ЯМР ИГМП. Необходимым условием является адекватный выбор структуры и свойств «диффузионной метки» и фазового состояния липидной системы.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Расчет количества «диффузионной метки» ДПФП

Для того чтобы определить какое количество «диффузионной» метки – ДПФП необходимо добавить в бицеллярную систему, чтобы зафиксировать сигнал, было принято решение о проведение эксперимента для определения предела чувствительность прибора. Для этого фиксировался сигнал от небольшого количества воды (5 мкл) (Рисунок А.1).

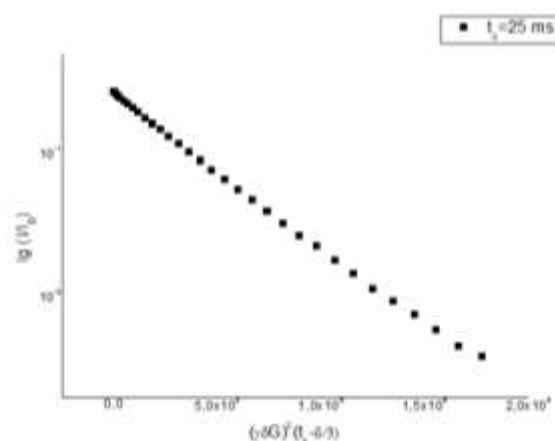


Рисунок А.1 – График диффузионного затухания для воды объемом 5 мкл, время диффузии,  $t_d=25$  мс  $T=303$  К.

График построен в полулогарифмических координатах, и, имеет явный моноэкспоненциальный вид, который может быть описан при помощи 1-х экспоненциальной функции с КСД  $D_1 = 2,5 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ . Значение коэффициента в пределах ошибки совпадает со табличным значением.

Эксперимент показал, что прибору достаточно такого количества протонов, которое содержится в 5 мкл воды. Исходя из этого, мы можем рассчитать необходимое количество ДПФП, исходя из того, что от него можно зафиксировать только  $\text{CH}_3$  – группу, располагающуюся на конце головной группы этого липида:

$$V = 5 \text{ мкл} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ л} = 5 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{-3} \text{ м}^3 \quad (1 \text{ л} = 1 \text{ дм}^3) = 5 \cdot 10^{-9} \text{ м}^3 \quad (\text{A.1})$$

$$\rho = 1000 \text{ кг/м}^3 \quad (\text{A.2})$$



$$m_1 = \rho \cdot V = 5 \cdot 10^{-9} \text{ м}^3 \cdot 10^3 \text{ кг/м}^3 = 5 \cdot 10^{-6} \text{ кг} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ г} = 5 \text{ мг} \quad (\text{A.3})$$

$$M(\text{H}_2\text{O}) = 2 \cdot 1 \text{ г/моль} + 16 \text{ г/моль} = 18 \text{ г/моль} \quad (\text{A.4})$$

$$\mu = \frac{m_1}{M} = \frac{5 \text{ мг}}{18 \text{ г/моль}} = \frac{5 \cdot 10^{-3} \text{ г} \cdot \text{моль}}{18 \text{ г}} = 0,278 \text{ ммоль} \quad (\text{A.5})$$

$$N_A = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1} \quad (\text{A.6})$$

$$n = \mu \cdot N_A = 0,278 \cdot 10^{-3} \text{ моль} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1} = 1,67 \cdot 10^{20} \text{ молекул воды} \quad (\text{A.7})$$

$$M(\text{CH}_3) = 12 \text{ г/моль} + 3 \cdot 1 \text{ г/моль} = 15 \text{ г/моль} \quad (\text{A.8})$$

$$m = M \cdot \mu = 15 \text{ г/моль} \cdot 0,278 \cdot 10^{-3} \text{ моль} = 4,17 \cdot 10^{-3} \text{ г} = 4,2 \text{ мг} \quad (\text{A.9})$$

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

### Список опубликованных работ

Результаты, полученные в ходе данных исследований были представлены на:

1. Итоговой студенческой конференции Института физики 2014,2015 годов
2. Всероссийской школе – конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века», 11-12 декабря 2014
3. VI Всероссийской конференции «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях», 6-9 апреля 2015

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Katsaras, J. "Bicellar" lipid mixtures as used in biochemical and biophysical studies [Текст] / J. Katsaras, T.A. Harroun, J. Pencer, M. Nieh // Springer-Verlag – 2005. – V.92 – P. 355-366
2. Marcotte, I. Bicelles as model membranes for solid and solution-state NMR studies of membrane peptides and proteins [Текст] / I. Marcotte, M. Auger // Wiley InterScience – 2005. – V.24A(1) – P. 17-37
3. Prosser, R.S. Magnetically aligned phospholipid bilayers with positive ordering: a new model membrane system [Текст] / R.S. Prosser, J.S. Hwang, R.R. Vold // Biophys J. – 1998. – V.74 – P. 2405-2418
4. Soong, R. Lateral diffusion of PEG-lipid in magnetically aligned bicelles measured using stimulated echo pulsed field gradient  $^1\text{H}$  NMR [Текст] / R. Soong, P.M. Macdonald // Biophys J., - 2005. – V.88 – P. 255-268.
5. Macdonald, P. M. Diffusion NMR and bicelle morphology [Текст] / P.M. Macdonald, R. Soong // Can. Chem. J. – 2011. – V.89 – P. 1021-1035
6. Маклаков, А. И. Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров [Текст] / А.И. Маклаков, В.Д. Скирда, Н.Ф. Фаткуллин. - Казань: Издательство Казанского Университета. – 221с.
7. Чижик, В. И. Квантовая радиофизика. Магнитный резонанс и его приложения [Текст] / В. И. Чижик. - Санкт-Петербург, СПбГУ, - 2004. – 700с.
8. Klass, N. Diffusion NMR spectroscopy [Текст] / N. Klass, K.P.J. Braun, R.A. deGraaf, R.M. Dijkhuizen, M.J. Kruiskamp // NMRBiomed.,- 2001. - V.14 – P. 94-111
9. Тейлор, Д. Биология в трех томах под редакцией Р. Сопера. Том 1 [Текст] / Д. Тейлор, Н. Грин, У. Стаут; пер.с англ. Ю.Л. Амченкова, М.Г. Дунина, Н.Ю. Замаева, Л.Г. Тер-Саркисян, Н.О. Фомина. – Москва: Мир, 2004. – 454 с.

10. Геннис, Р. Биомембраны [Текст] / Р. Геннис; пер.с англ. Л.И. Барсукова, А.Я. Мулкиджаняна, А.Л. Семейкиной, В.Д. Следя. - Москва: Мир, 1997. – 213с
11. Кольман, Я. Наглядная биохимия [Текст] / Я. Кольман, К.-Г. Рем; пер.с нем. Л.В. Козлова, Е.С. Левиной, П.Д. Решетова. – Москва: Мир, 2000. – 460с.
12. Diller, A. Bicelles: A natural ‘molecular goniometer’ for structural, dynamical and topological studies of molecules in membranes [Текст] / A. Diller, C. Loudet, F. Aussenac, G. Raffard, S. Fournier, M. Laguerre, A. Grelard, S.J. Opella, F.M. Marassi, E.J. Dufourc // Biochimie – 2009. - V. 99 – P. 744-751
13. Arnold, A. Cation modulation of bicelle size and magnetic alignment as revealed by solid-state NMR and electron microscopy [Текст] / A. Arnold, T. Labrot, R. Oda, E.J. Dufourc // Biophys J. – 2002. – V.83 – P. 2667-2680
14. Soong, R. Bicellar mixture containing Pluronic F68: Morphology and lateral diffusion from combined SANS and PFG NMR studies [Текст] / R. Soong, M.P. Neih, E. Nicholson, J. Katsaras, P.M. Macdonald // Langmuir, - 2010. – V.26(4) – P. 2630-2638
15. Scholz, F. Magnetic anisotropy of lecithin membranes A new anisotropy susceptometer [Текст] / F. Scholz, E. Boroske, W. Helfrich // Biophys. J. - 1984. – V.45 – P. 589-592
16. Ландау, Л.Д. Статистическая физика. Часть 1 [Текст] / Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц. – Москва: Издательство «Наука», 1976. – 584 с.
17. McLaughlin, A.C. Application of <sup>31</sup>P NMR to model and biological membrane systems [Текст] / A.C. McLaughlin, P.R. Cullis, M.A. Hemminga, D.I. Hoult, G.K.Radda, G.A. Ritchie, P.J. Seeley, R.E. Richards // FEBS letters,- 1975. - V.57 – P 213-218
18. Dürr,U.H.N. When detergent meets bilayer: Birth and coming of age of lipid bicelles [Текст] / U.H.N. Dürr, R. Soong, A. Ramamoorthy // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy,- 2013. - V.69 – P 1-22

19. Рубин, А.Б. Биофизика в двух томах. Том 2: Биофизика клеточных процессов [Текст] / А.Б. Рубин. – Москва, Книжный дом «Университет», - 2000. -468 с.
20. Svergun, D.I. Solution Structure of Poly(ethylene) Glycol-Conjugated Hemoglobin Revealed by Small-Angle X-Ray Scattering: Implications for a New Oxygen Therapeutic [Текст] / D.I. Svergun, F. Ekstro, K.D. Vandegriff, A. Malavalli, D.A. Baker, C. Nilsson, R.M. Winslow // Biophysical Journal, - 2008. – V.94 – P.173-181
21. Triba, M.N. Reinvestigation by phosphorus NMR of lipid distribution in bicelles [Текст] / M.N. Triba, D.E. Warschawski, P.F. Devaux // Biophysical Journal, - 2005. – V.88 – P.1887-1901
22. Халиуллина, А.В. Исследование самодиффузии белков в растворе методом ЯМР [Текст] / А.В. Халиуллина, А.В. Филипов – Казань, Издательство Казанского Университета, - 2013. – 12 с.
23. Perrin, F. The brownien movement of an ellipsoide. I Dielectric dispersion of an ellipsoidal molecule. [Текст] / Perrin F. // J. Phys. Radium – 1934. – V. 5. – P. 497–511.
24. Hinton, D. P. Diffusion ordered 2D NMR spectroscopy of phospholipid vesicles: determination of vesicle size distributions [Текст] / D.P. Hinton, C.S. Johnson Jr. // J.Phys.Chem, -1993. - V.97 – P 9064-9072