

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

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.04.02 – Физика

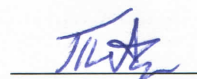
Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ИОНА
ГАДОЛИНИЯ С ТЕТРАПЕПТИДОМ И АМИЛОИДНЫМ ПЕПТИДОМ
В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ СПЕКТРОСКОПИИ
ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Студент 2 курса группы 06-919

«15» 06 2021 г.

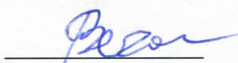


(Тарасов А.С.)

Научный руководитель

д.х.н., профессор

«15» 06 2021 г.

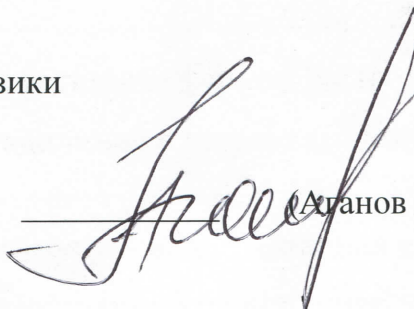


(Ключков В.В.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

«15» 06 2021 г.



(Аданов А.В.)

Казань-2021

Содержание

Введение	4
1. СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ	6
1.1. Физические основы спектроскопии ЯМР высокого разрешения.....	6
1.1.1. Векторная модель	6
1.1.2. Квантовомеханическое описание. Магнитные свойства ядер. Эффект Зеемана.....	8
1.1.3. Заселённость энергетических уровней	11
1.1.4. Процессы ЯМР-релаксации.....	11
1.1.5. Импульсный метод ЯМР. Фурье преобразование	13
1.1.6. Процесс накопления спектра.....	15
1.2. Спектроскопия ^1H ЯМР. Ключевые характеристики.....	16
1.2.1. Константа экранирования и химический сдвиг	16
1.2.2. Интенсивность сигналов и интегрирование резонансных линий .	17
1.2.3. Мультиплетность сигнала. Треугольник Паскаля	17
1.2.4. Константа спин-спинового взаимодействия	19
1.3. Спектроскопия ^{13}C ЯМР	20
1.3.1. Некоторые основные положения	20
1.3.2. Спин-спиновое взаимодействие в ^{13}C ЯМР спектроскопии.....	21
1.3. Основы двумерной спектроскопии ЯМР.....	23
2. Результаты и их обсуждение	24
2.1. Исследование процесса комплексообразования иона гадолиния с тетрапептидом	24
2.1.1. ^1H ЯМР спектр тетрапептида в фосфатном буферном растворе ..	24
2.1.3. ^1H ЯМР спектры комплекса иона гадолиния с тетрапептидом SFVG в фосфатном буфере.....	26
2.2. Исследование процесса комплексообразования иона гадолиния с амилоидным бета пептидом $\text{A}\beta_{13-23}$	30
2.2.1. ^1H ЯМР спектр амилоидного бета пептида $\text{A}\beta_{13-23}$ в боратном буферном растворе.....	30
2.2.2. ^1H ЯМР спектры комплекса иона гадолиния с амилоидным бета пептидом $\text{A}\beta_{13-23}$ в боратном буферном растворе.....	32

2.4 Материалы и методы.....	40
Заключение.....	43
Список литературы.....	44
Приложение А.....	47
Приложение Б.....	48
Приложение В.....	49

Введение

На сегодняшний день известно, что одной из возможных причин возникновения болезни Альцгеймера является накопление β -амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков в тканях головного мозга. Бляшки состоят из фибрилл, образованных в результате агрегации амилоидных $A\beta$ -пептидов. Из-за накопления в амилоидных отложениях ионы переходных металлов, такие как Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} и Mn^{2+} являются возможными патогенными агентами, приводящими к болезни Альцгеймера. Взаимодействие ионов переходных металлов с пептидами приводит к сильному изменению конформации пептида, что способствует агрегации $A\beta$ -пептидов и образованию бляшек [1]. Гадолиний так же входит в группу ионов переходных металлов, и, возможно, он таким же образом меняет конформацию амилоидного пептида, подобно другим ионам той же группы. С другой стороны, парамагнитные ионы гадолиния используются в качестве контрастных веществ для магнитно-резонансной томографии ввиду их низкой токсичности и хорошей растворимости по сравнению с другими ионами данной группы [2,3].

В настоящее время использование техники спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) является одним из самых мощных и надёжных инструментов для исследования внутренних динамических процессов и пространственного строения молекул [4]. Ранее при помощи методов ЯМР спектроскопии и методов компьютерного моделирования было установлено, каким именно образом редкоземельные ионы Mn^{2+} и Co^{2+} влияют на структуру амилоидного пептида $A\beta_{13-23}$ [5,6]. Ионы марганца и кобальта изначально присутствуют в нашем организме при малых концентрациях. Они играют важную роль в работе нашего организма, и только при превышении определенного порога концентраций этих веществ возникают патологии. В нормальных условиях в организме не должно быть ионов гадолиния, однако ион может попасть в организм случайно или при проведении магнитно-

резонансной томографии с контрастным усилением, где пациенту вводят внутривенно специальный препарат, содержащий данный парамагнитный ион. В недавних исследованиях обсуждался вопрос о накоплении ионов гадолиния в организме пациентов после проведения МРТ с контрастом [7-9].

Целью настоящей работы являлось исследование процесса комплексообразования иона гадолиния с тетрапептидом и амилоидным пептидом в водных растворах с помощью методов ЯМР спектроскопии высокого разрешения. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- регистрация одномерных ^1H ЯМР спектров пептидов в водных растворах при комнатной температуре и соотнесение полученные химических сдвигов с структурой соединений;
- регистрация одномерных ^1H ЯМР спектров пептидов в водных растворах с вариацией молярной концентрации соли гадолиния;
- анализ изменения формы линии в ^1H ЯМР спектрах для полученных комплексов ион-пептид в водных растворах;
- определение участков пептидов в которых локализуется ион гадолиния при процессе комплексообразования.

1. СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

1.1. Физические основы спектроскопии ЯМР высокого разрешения

1.1.1. Векторная модель

В качестве упрощенной модели ядро атома можно представить в виде положительно заряженной вращающейся сферы. Из-за вращения сферы возникает кольцеобразное вращательное движение заряда, которое, в свою очередь, создает микроскопический кольцевой ток. Следствием появления тока является возникновение магнитного поля. Таким образом, в качестве модели ядра выступает микроскопический магнит, магнитный момент которого прецессирует вдоль оси вращения ядра. Следовательно, ядро с соответствующими ему спиновым и магнитным моментами можно представить в виде маленького стержневого магнита [10-12].

Для рассмотрения возьмем ядро атома, которое помещают в магнитное поле \mathbf{B}_0 . Связь между магнитным дипольным моментом $\boldsymbol{\mu}$ и моментом количества движения (угловой момент) \mathbf{L} выражается следующим соотношением:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma * \mathbf{L}, \quad (1)$$

где γ - гиромагнитное отношение. Согласно классической теории, гиромагнитное отношение представляет собой коэффициент пропорциональности между вектором магнитной индукции и циклической частотой вращения магнитного момента. С другой стороны, гиромагнитное отношение определяется как отношение дипольного магнитного момента элементарной частицы к её механическому моменту. Данная величина характеризует тип ядра, например, для ядра водорода (^1H) она составляет $2.675 \cdot 10^{-8}$ рад/(Тл·с), а для ядра изотопа углерода (^{13}C) она равняется $0.673 \cdot 10^{-8}$ рад/(Тл·с).

Поведение момента импульса \mathbf{L} описывается вторым законом Ньютона:

$$\frac{d\mathbf{L}}{dt} = \mathbf{N}. \quad (2)$$

С учетом того, что на магнитный момент $\boldsymbol{\mu}$, помещенный во внешнее магнитное поле \mathbf{B}_0 действует момент силы \mathbf{N} , равный:

$$\mathbf{N} = [\boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0], \quad (3)$$

получаем уравнение:

$$\frac{d\mathbf{L}}{dt} = [\boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0] = \gamma[\mathbf{L} \times \mathbf{B}_0] = -\gamma[\mathbf{B}_0 \times \mathbf{L}]. \quad (4)$$

Его решение, это вектор \mathbf{L} , прецессирующий около направления \mathbf{B}_0 с ларморовской частотой:

$$\boldsymbol{\omega}_0 = -\gamma\mathbf{B}_0. \quad (5)$$

Направление ларморовской частоты зависит от γ . Если γ положительное, тогда ларморовская частота направлена в противоположную сторону относительно \mathbf{B}_0 . Если γ отрицательное, тогда ларморовская частота направлена вдоль \mathbf{B}_0 .

Макроскопическая намагниченность \mathbf{M} определяется как магнитный дипольный момент единицы объёма вещества:

$$\mathbf{M} = \sum_i \boldsymbol{\mu}_i. \quad (6)$$

В макроскопической системе ларморовская прецессия определяется через уравнение прецессии макроскопической намагниченности:

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = [\mathbf{M} \times \gamma\mathbf{B}_0]. \quad (7)$$

Его решение – вектор намагниченности \mathbf{M} , также прецессирует около направления вектора магнитной индукции \mathbf{B}_0 с частотой Лармора $\boldsymbol{\omega}_0$.

1.1.2. Квантовомеханическое описание. Магнитные свойства ядер. Эффект Зеемана

Угловой и магнитный моменты являются квантованными величинами [11].

$$L = \hbar I, \quad (8)$$

$$\mu = \gamma \hbar I. \quad (9)$$

Ядра атомов в основном состоянии обладают собственным механическим моментом – спином \bar{I} , значение которого согласно с законами квантовой механики определяется как:

$$|\bar{I}| = \hbar \sqrt{I(I+1)}, \quad (10)$$

где \hbar – постоянная Дирака (постоянная Планка, деленная на 2π), I – спиновое квантовое число ядра, которое в зависимости от атомных чисел A и Z принимает следующие дискретные значения: $I = 0$, если атомная масса A – чётная и атомный номер Z – чётный (^{12}C , ^{16}O , ^{18}O , ^{32}S); $I = 1/2, 3/2, 5/2$, и т.д., если атомная масса A – нечётная и атомный номер Z – нечётный (^1H ($I=1/2$), ^{11}B ($I=3/2$), ^{13}C ($I=1/2$), ^{15}N ($I=1/2$), ^{17}O ($I=5/2$), ^{19}F ($I=1/2$), ^{29}Si ($I=1/2$), ^{31}P ($I=1/2$)); $I = 1, 2, 3$, и т.д., если атомная масса A – чётная, а атомный номер Z – нечётный (^2H ($I=1$), ^{10}B ($I=3$), ^{14}N ($I=1$), ^{50}V ($I=6$)).

Для проекции углового момента ядра L_Z на ось вращения существуют как разрешенные, так и неразрешенные значения, которые может принимать L_Z . Разрешенные значения L_Z определяются согласно следующему условию:

$$L_Z = \hbar m_I, \quad (11)$$

где m_I – магнитное квантовое число, \hbar – постоянная Дирака (постоянная Планка, деленная на 2π). Число m_I может находиться в одном из $2I+1$ спиновых состояний, так как m_I принимает значения от $-I$ до $+I$ с шагом 1 ($I, I-1; \dots, -I+1, -I$). При $I=1/2$ возможны 2 спиновых состояния ($+1/2, -1/2$). При $I = 1$ возможны 3 спиновых состояния ($-1, 0, +1$). При $I = 3/2$ возможны 4

спиновых состояния $(-3/2, -1/2, +1/2, +3/2)$. При $I = 5/2$ возможны 6 спиновых состояний $(-5/2, -3/2, -1/2, +1/2, +3/2, +5/2)$.

С практической стороны в ЯМР спектроскопии удобнее использовать ядра ^1H , ^{13}C и д.р., которые обладают спиновым квантовым числом $I=1/2$.

Величина проекции магнитного момента для произвольного ядра $\mu_z = \gamma \hbar m_I$. Для примера рассмотрим ядра атома водорода ^1H , число I которых равно $1/2$, для них величина μ_z составляет $\pm \gamma \hbar$. Без внешнего магнитного поля для спиновых состояний ядер происходит вырождение по энергии. Если поместить ядра во внешнее магнитное поле B_0 , тогда вырождение по энергии ядер исчезает, и появляются ядра с магнитными моментами, которые направлены в сторону внешнего приложенного магнитного поля B_0 , и ядра с магнитными моментами, которые направлены против внешнего поля. Такие ядра с различными ориентациями магнитных моментов уже имеют различные энергии и возникает возможность энергетического перехода с одного уровня энергии на другой (рисунок 2). В общем случае расщепление энергетических уровней в магнитном поле носит название эффекта Зеемана.

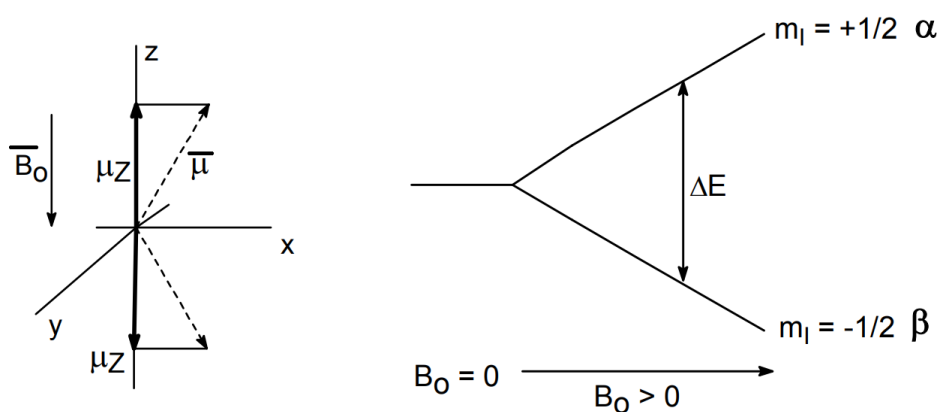


Рисунок 2 – Поведение магнитного момента и его проекции (слева),
и энергетическая диаграмма системы (справа)
при внесении во внешнее магнитное поле

Физической основой спектроскопии ядерного магнитного резонанса является переход с одного уровня энергии ядра на другой, где происходит поглощение электромагнитного излучения ядрами образца, помещенного в магнитное поле и при приложении радиочастотного поля.

Таким образом, упрощенно эксперимент по спектроскопии ЯМР выглядит следующим образом: образец располагают во внешнем магнитном поле и облучают электромагнитным излучением с частотой ω . При резонансной частоте ω_0 , соответствующей энергии $\Delta E = \hbar\omega_0$, возникает инверсия населенностей уровней и наблюдается максимальное поглощение энергии системой. Графически его изображают в виде спектра – зависимости поглощения энергии от частоты. При $I = 1/2$ разность энергий между двумя спиновыми состояниями ядра описывается уравнением [12]:

$$\Delta E = E_{-1/2} - E_{+1/2} = 2 \mu_Z B_0 = \gamma B_0 \hbar = \hbar \omega_0, \quad (12)$$

где B_0 - индукция магнитного поля, $\omega_0 = \gamma B_0$ - резонансная частота, $E_{-1/2} = \frac{1}{2} \gamma \hbar B_0$ - уровень энергии для состояния с $m_I = -1/2$, $E_{+1/2} = -\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0$ - уровень энергии для состояния с $m_I = +1/2$ (рисунок 3).

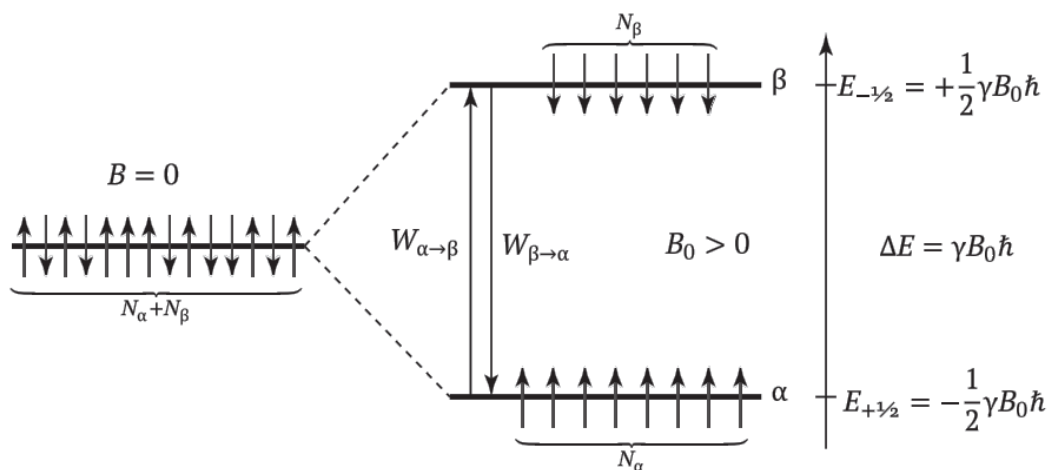


Рисунок 3 – Энергия системы ядер со спином $I=1/2$. При отсутствии магнитного поля, состояния с разной проекцией спина вырождены (слева). Если поместить систему в магнитное поле, то возникает два уровня энергии с разностью энергий ΔE и разной заселенностью уровней

1.1.3. Заселённость энергетических уровней

Заселенность энергетических уровней, для которых величины $m_I = +1/2$ и $-1/2$, определяется в соответствии с распределением Больцмана [11,12]:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right). \quad (13)$$

Вероятности переходов с одного уровня на другой и населенности уровней связаны между собой соотношением:

$$N_\alpha W_{\alpha \rightarrow \beta} = N_\beta W_{\beta \rightarrow \alpha} . \quad (14)$$

В условиях равновесной заселенности уровней эти вероятности различаются:

$$\frac{W_{\beta \rightarrow \alpha}}{W_{\alpha \rightarrow \beta}} = \frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left(\frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi kT}\right) \approx 1 + \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi kT} . \quad (15)$$

Это соотношение определяет суммарный эффект резонансного поглощения радиочастотной электромагнитной энергии. Данное поглощение нарушает исходное равновесие в системе из спинов и вызывает переход с одного уровня на другой, т.е. возникает инверсия населенностей энергетических уровней. Следствием появления инверсии населенностей является процесс возвращения системы к первоначальной населенности уровней, который определяется характерными временами релаксаций.

1.1.4. Процессы ЯМР-релаксации

Релаксация – это процесс перехода между энергетическими состояниями, который стремится восстановить исходное больцмановское распределение в спиновой системе. Существуют различные типы и механизмы релаксации [12].

Двум спиновым состояниям α и β соответствуют два ансамбля магнитных ядер N_α и N_β , прецессирующих с одинаковыми ларморовскими частотами вокруг вектора \mathbf{B}_0 . Если просуммировать все магнитные моменты ядер в состояниях α и β , то в итоге мы имеем некую макроскопическую намагниченность \mathbf{M} , пропорциональную разности заселенности состояний на уровнях α и β , которая будет направлена вдоль \mathbf{B}_0 , поскольку α -спинов больше, чем β -спинов. Вектор намагниченности \mathbf{M} не квантован и его равновесное значение \mathbf{M}_0 считают совпадающим с вектором намагниченности вдоль внешнего поля \mathbf{M}_z .

Когда на систему подается электромагнитное (РЧ) поле, то вектор \mathbf{M} отклоняется от своего равновесного положения на угол θ . При однородном постоянном магнитном поле \mathbf{B}_0 поведение вектора намагниченности \mathbf{M} после того как прекратилось действие радиочастотного импульса описывается следующим образом. После прекращения облучения спиновой системы электромагнитным полем внутри системы возникают процессы релаксации, возвращающие систему к равновесному состоянию (M_z возвращается к M_0 , а M_x и M_y стремятся к 0).

Блох предположил, что процессы релаксации имеют первый порядок и для их описания он ввел спин-решеточное T_1 и спин-спиновое T_2 времена релаксации, которые определяются уравнениями Блоха для вращающейся системы координат (X', Y', Z) . Уравнение Блоха для продольной (спин-решеточной) релаксации T_1 :

$$\frac{dM_z}{dt} = - \frac{M_z - M_0}{T_1}, \quad (16)$$

Уравнения Блоха для поперечной (спин-спиновой) релаксации T_2 :

$$\frac{dM_{X'}}{dt} = - \frac{M_{X'}}{T_2}, \quad (17)$$

$$\frac{dM_{Y'}}{dt} = - \frac{M_{Y'}}{T_2}. \quad (18)$$

Время продольной релаксации T_1 можно определить, как:

$$T_1 = \frac{1}{2} W = \frac{1}{2} \frac{(W_{\alpha \rightarrow \beta} + W_{\beta \rightarrow \alpha})}{2}, \quad (19)$$

где W – средняя вероятность переходов между уровнями энергий α и β .

Решениями уравнений Блоха являются: T_1 -процесс, который соответствует восстановлению равновесной заселенности Больцмановских уровней α и β :

$$M_z = M_0 \left(1 - e^{-t/T_1}\right); \quad (20)$$

T_2 -процесс, который соответствует полной расфазировке x и y компонент ядерных спинов:

$$M_z = \sqrt{M_x^2 + M_y^2} = e^{-t/T_2}, \quad (21)$$

$$M_{x,y} \sim \sin(\omega_0 t + \varphi) \cdot e^{-t/T_2}, \quad (22)$$

где φ – фаза колебаний. Эффект при котором M стремится к нулю называется спадом свободной индукции (ССИ).

1.1.5. Импульсный метод ЯМР. Фурье преобразование

При проведении исследования образца при помощи ЯМР спектрометра необходимо постоянное сильное магнитное поле. В спектрометрах, как правило, для его создания используют сверхпроводящие магниты [12,13].

При импульсном методе ЯМР образец подвергают не длительному непрерывному облучению, а воздействию кратковременного мощного радиочастотного прямоугольного импульса, повторяющегося через определенные промежутки времени. Длительность импульса достаточно мала, порядка нескольких микросекунд. Применение к системе кратковременного мощного импульса приводит к тому, что радиочастотное

поле генерируется в широком диапазоне (примерно 10^5 Гц), что возбуждает все ядра в образце одновременно. По завершении импульса, индуцированная намагниченность ядер быстро исчезает вследствие релаксации T_1 , и восстанавливается обычное бальцмановское распределение. Происходит ССИ, который описывается большим числом затухающих синусоидальных кривых во временной шкале, каждая из которых соответствует некой резонансной частоте.

Так как линия ССИ представляет собой набор гармонических функций, ее можно анализировать с помощью ЭВМ на базе математической операции, называемой Фурье-преобразованием. В результате преобразования временной шкалы в частотную получается обычная спектральная картина – зависимость поглощения излучения образцом от частоты. Многократно повторяя эту процедуру, получают усредненный спектр, при этом снижается соотношение сигнал-шум.

Для измерения зависимости амплитуды сигнала от частоты (измерение в частотном представлении) используют метод непрерывной развертки, который заключается в том, чтобы изменять частоту радиочастотного поля \mathbf{V}_1 при постоянном поле \mathbf{V}_0 . При регистрации данных после радиочастотного импульса измеряют то, как амплитуда сигнала меняется во времени. Таким образом, получают временное представление.

При помощи преобразования Фурье можно переходить от одного представления к другому и данная математическая операция является обычным методом анализа результатов импульсных экспериментов:

$$f(\omega) = \int f(t)e^{i\omega t} dt, \quad (23)$$

где $f(t)$ соответствует спектру "временного представления", а $f(\omega)$ - спектру "частотного представления". Здесь $f(\omega)$ - сложная функция частоты, состоящая из реальной (Re) и мнимой (Im) частей.

В одномерной спектроскопии ЯМР реальная часть имеет наибольшее значение, тогда как в двумерной спектроскопии ЯМР обычно получают спектр с использованием выражения:

$$M = \sqrt{Re^2 + Im^2} . \quad (24)$$

1.1.6. Процесс накопления спектра

ЯМР спектры на импульсном спектрометре получают за счет накопления "полезного" сигнала для ядер с низкой чувствительностью и очень разбавленных растворов – ССИ многих импульсов суммируются в компьютере, а потом подвергаются преобразованию Фурье. При этом "шум" усредняется, а "полезный" сигнал (S) растет. Их отношение пропорционально квадратному корню от "числа сканирований" (N):

$$S: N \sim \sqrt{NS} . \quad (25)$$

Запись ССИ и хранение ее в цифровой форме требует некоторого периода, называемого "временем регистрации", зависящего от числа используемых ячеек памяти. Выбор этого числа обусловлен шириной спектра, и поэтому невозможно устанавливать универсальные значения. Для спектра шириной 5000 Гц и с 8К ячеек памяти для сбора данных нужна ~1 сек (1Кб = 1024 Байт) [12,13].

1.2. Спектроскопия ^1H ЯМР. Ключевые характеристики

1.2.1. Константа экранирования и химический сдвиг

В реальных молекулах помимо наложенного внешнего поля на протоны воздействуют локальные электромагнитные поля молекулы – проявляется экранирование. Значение локального поля молекулы $\mathbf{V}_{\text{лок}}$:

$$\mathbf{V}_{\text{лок}} = \mathbf{V}_0 \sigma \quad (26)$$

где σ — безразмерная константа ядерного магнитного экранирования, определяемая электронной плотностью вокруг ядра атома [10]. Это приводит к смещению резонансной частоты ν_0 наблюдаемого сигнала. Значение результирующего поля $\mathbf{V}_{\text{эф}}$ под действием экранирования:

$$\mathbf{V}_{\text{эф}} = \mathbf{V}_0 - \mathbf{V}_{\text{лок}} = \mathbf{V}_0(1 - \sigma) \quad (27)$$

Вводится единая относительная шкала (δ -шкала), выражаемая в миллионных долях (м. д.) – шкала химических сдвигов. За ноль принимают сигнал протонов тетраметилсилана (ТМС) $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, шкала растет в направлении ослабления поля, или увеличения частоты). А величина относительного химического сдвига δ определяется следующим выражением:

$$\delta = \frac{\nu_{\text{вещество}} - \nu_{\text{эталон}}}{\nu_{\text{прибора}}} \quad (28)$$

Существуют несколько факторов, влияющие на величину химического сдвига. В экранировании данного ядра могут принимать участие как собственные электроны атома, так и электроны соседних групп и даже молекул. В первом приближении различают следующие вклады основных факторов в общее экранирование ядер [11]:

- диамагнитное экранирование, обусловленное диамагнитными токами электронов, окружающих данное ядро и ближайшие соседние ядра;
- парамагнитное экранирование за счет парамагнитных токов, возникающих под действием магнитного поля. Поскольку парамагнитные токи возникают

только в случае электронных переходов между p- и d- орбиталями, парамагнитный вклад в экранирование протонов мал;

- вторичные магнитные поля, индуцируемые внешним магнитным полем в соседних атомах и группах;
- электрические поля;
- Вандерваальсовы эффекты;
- влияние окружающей среды (растворителя, температуры и пр.).

1.2.2. Интенсивность сигналов и интегрирование резонансных линий

В эксперименте ЯМР можно определить относительное количество эквивалентных по химическому сдвигу протонов. Другими словами, методом ЯМР можно определить, сколько протонов «ответственны» за данный сигнал.

Интегральная интенсивность сигнала пропорциональна количеству протонов каждого типа и измеряется площадью пика. Относительные интенсивности различных сигналов можно показать в спектре ступенчатой интегральной кривой.

1.2.3. Мультиплетность сигнала. Треугольник Паскаля

Площадь мультиплета отражает число протонов, вызывающих данный сигнал, а мультиплетность сигнала – число протонов, взаимодействующих с рассматриваемым протоном (или протонами).

При наличии у группы эквивалентных протонов по соседству другого, неэквивалентного протона или группы протонов, сигналы протонов расщепляются в спектре и принимают форму не узкого одиночного пика, а пика с несколькими вершинами, т.е. мультиплета. Это явление, спин-

спиновое расщепление, появляется, потому что водороды на соседних атомах углерода влияют друг на друга.

Мультиплетность сигнала вычисляется как $2I_n+1$, где I – спиновое квантовое число изотопа, n – число соседних неэквивалентных атомов. Для атомов водорода, каждый тип протонов взаимодействует с неэквивалентными ему протонами на соседнем атоме/атомах углерода, и его резонансный пик расщепляется на $n + 1$ компонентов.

Относительные интенсивности внутри мультиплетов соответствуют коэффициентам биномиального ряда. Эти коэффициенты можно определить из треугольника Паскаля (таблица 1).

Таблица 1 – Виды мультиплетов и их относительная интенсивность из треугольника Паскаля

Число соседних ядер	Наблюдаемая интегральная интенсивность линий	Название и общепринятое обозначение мультиплета
0	1	синглет,
1	1 1	дублет,
2	1 2 1	триплет,
3	1 3 3 1	квадруплет (квартет),
4	1 4 6 4 1	квинтиплет (квинтет),
5	1 5 10 10 5 1	секстиплет(секстет)
6	1 6 15 20 15 6 1	септиплет (септет)
7	1 7 21 35 35 21 7 1	октиплет (октет)

Расщепление сигнала протона на компоненты происходит благодаря спин-спиновым взаимодействиям – взаимодействие спинов протонов через электронные связи.

Согласно принципу Паули, электроны, связывающие два ядра, спарены, т.е. их спины антипараллельны. В магнитном поле имеется определенная тенденция для каждого из ядер спаривать свой спин со спином

одного из связывающих электронов таким образом, чтобы большинство из них было антипараллельными (соответствует устойчивому состоянию).

1.2.4. Константа спин-спинового взаимодействия

Константа спин-спинового взаимодействия (КССВ) J - это расстояние между соседними пиками в простом мультиплете. Эта константа является мерой того, как сильно спиновые состояния соседних ядер влияют на ядро. Константа ССВ всегда выражается в Герцах. Константы спин-спинового взаимодействия всегда имеют одно и то же значение. Это значение КССВ не зависит от рабочей частоты прибора. Величина константы спин-спинового взаимодействия во многом определяет форму сигналов в спектрах ЯМР и зависит от многих факторов (рисунок 4): величин углов между связями, природой этих связей (наличием делокализованных π -систем, например, ароматических), и т.д. [12].

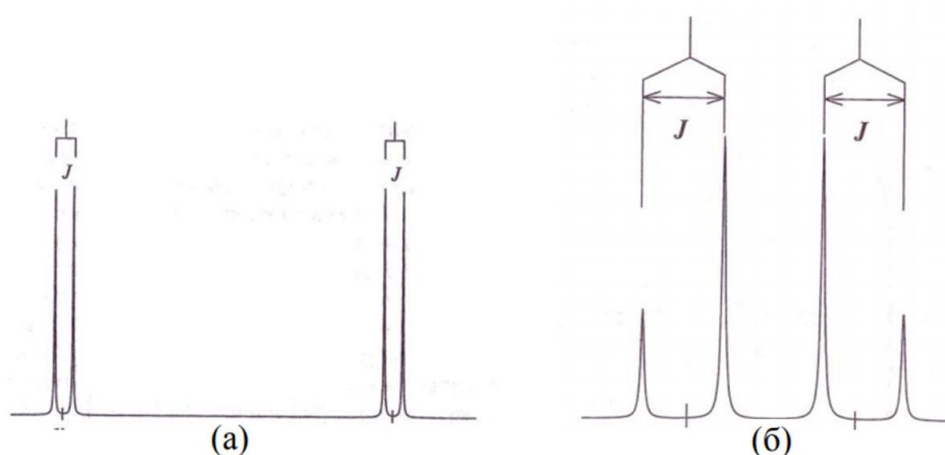


Рисунок 4 – Константа спин-спинового взаимодействия J в случае расщепления сигнала в дублет (а); (б) – расщепление в квадруплет

Энергия спин-спинового взаимодействия:

$$E = J_{1,2} \mathbf{I}_1 \mathbf{I}_2, \quad (29)$$

где $J_{1,2}$ – КССВ, \mathbf{I}_1 и \mathbf{I}_2 – вектора ядерного спина. Следствием этого является возникновение дополнительных уровней энергии и переходов между ними, что и приводит к мультиплетности спектра ЯМР.

1.3. Спектроскопия ^{13}C ЯМР

1.3.1. Некоторые основные положения

Основные особенности характерные для ядер ^{13}C в органических соединениях - это относительно невысокое природное содержание, более низкая по сравнению с протонами величина гиромагнитного отношения, а также большие времена релаксации. Несмотря на вышеуказанные недостатки, регистрация ^{13}C -спектров ЯМР является необходимой процедурой, так как эти спектры хранят в себе вполне информативные данные о структуре органических соединений.

Число сигналов в спектре ^{13}C ЯМР равно числу различных атомов углерода в молекуле органического соединения. В спектре ^{13}C ЯМР наблюдаются атомы углерода, не связанные с протонами - четвертичные атомы $>\text{C}=\text{C}<$, $=\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{C}<$ и $-\text{C}\equiv\text{C}-$, а также группы $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$, $>\text{C}=\text{O}$ и другие. Таким образом, информация, полученная из спектра ^{13}C ЯМР позволяет дополнить представление о структуре молекулы. Относительная чувствительность ^{13}C -ЯМР спектроскопии приблизительно в 6400 раз ниже чем у ^1H ЯМР спектроскопии. Поэтому, для регистрации ^{13}C -спектров с тем же разрешением, необходимо использовать либо большие концентрации вещества в образце, либо увеличивать число накоплений.

Многие основные понятия, применимые к ^1H ЯМР спектроскопии, также используются и в спектроскопии ^{13}C ЯМР. Ядра ^{13}C , также имеющие

различное локальное химическое окружение, тоже отличаются своими химическими сдвигами. В спектроскопии ^{13}C ЯМР также используется δ -шкала, а в качестве стандарта выбран аналогично тетраметилсилан (ТМС). Однако область химических сдвигов сигналов различных типов в спектрах ЯМР ^{13}C заметно шире по сравнению со спектрами ^1H и составляет 250 м.д. вместо 12 м.д.

Когда происходит регистрация ^1H ЯМР спектра, например, на приборе с рабочей частотой 400 МГц, то указывается резонансная частота поглощения протонов, соответствующая создаваемому в приборе магнитному полю. Однако, поскольку напряженность поля, создаваемого сверхпроводящим магнитом спектрометра, неизменна, таким образом, резонансная частота для ядер ^{13}C будет соответствовать рабочей частоте прибора ~ 100 МГц, что объясняется соотношением гироманнитных отношений для ядер ^1H (2.674) и ^{13}C (0.672), равному 0.251 и помноженному на 400 [13].

1.3.2. Спин-спиновое взаимодействие в ^{13}C ЯМР спектроскопии

Атомы углерода в органических соединениях почти всегда связаны с другими магнитными ядрами. Таким образом, возникает спин-спиновое взаимодействие между ядрами ^{13}C , которые обладают различным химическим окружением. Однако, в следствие малой естественной концентрации изотопа ^{13}C подобные взаимодействия наблюдаются в виде низкоинтенсивных сигналов, незаметных в обычном спектре.

Наличие С-Н связи в органических соединениях приводит к возникновению прямого спин-спинового взаимодействия между ядрами ^{13}C и ^1H . Взаимодействие данного типа не проявляется в спектрах ^1H ЯМР из-за низкого природного содержания изотопа ^{13}C , однако в ^{13}C -ЯМР спектрах его проявление заметно, т.к. подавляющее большинство ядер природного водорода ^1H имеет спин 1/2.

При регистрации спектров ^{13}C ЯМР мы получаем непростую картину. С одной стороны, регистрация сигналов ^{13}C ЯМР, имеющих спин-спиновое взаимодействие ^{13}C - ^1H , существенно упрощает решение задачи по подтверждению химической структуры соединения. С другой стороны, наличие спин-спиновое взаимодействие между ядрами ^{13}C и ^1H создает ряд проблем. Во-первых, в случае органических молекул со сложной структурой, где в узкой области (10-20 м.д.) находятся десятки сигналов, мультиплетность вносит путаницу при соотнесении сигналов. Во-вторых, интегральная интенсивность сигнала является величиной постоянной, из этого следует, что интенсивность каждой компоненты мультиплета уменьшается, что ведёт к снижению чувствительности метода. Чтобы решить данные проблемы регистрацию ^{13}C ЯМР спектров производят в режиме "широкополосной развязки от протонов" (гетероядерного двойного резонанса). Суть этого метода состоит в том, что вся область резонанса протонов облучается сильным радиочастотным полем, при этом происходит насыщение спинов протонов, и спин-спиновые взаимодействия ^{13}C - ^1H не наблюдаются, в результате чего резонансный сигнал атома углерода каждого типа представляет собой одиночную линию. Получаемый в результате углеродный спектр представляет собой совокупность тонких синглетных линий поглощения и выглядит существенно проще по сравнению с протонным спектром того же соединения.

Увеличение интенсивности сигналов в спектрах ^{13}C ЯМР, зарегистрированных в режиме широкополосной развязки от протонов, также связано с явлением ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО, англ. NOE). Оно заключается в следующем: если два магнитных ядра пространственно расположены рядом друг с другом, то облучение одного из них с его резонансной частотой вызывает увеличение интенсивности резонанса ядра-соседа. Отношение интенсивностей соседних ядер пропорционально величине $1/r^6$, где r - расстояние между ядрами. В случае гетероядерного двойного резонанса облучение всех протонов соединения вызывает

увеличение интенсивности сигналов атомов углерода, непосредственно связанных с протонами. В этом заключается принципиальное отличие ^{13}C ЯМР спектров от спектров ^1H ЯМР.

1.3. Основы двумерной спектроскопии ЯМР

Некоторые виды двумерных ЯМР экспериментов [14]:

- COSY (COrrelation SpectroscopY) – корреляционная ^1H – ^1H спектроскопия, позволяющая оценить магнитные взаимодействия между протонами через электроны, разделяющие их не более чем через одну химическую связь;
- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) – корреляционная ^1H – ^{13}C спектроскопия, позволяющая оценить магнитные взаимодействия между углеродными атомами и непосредственно связанными с ними протонами, т.е. через связи C–H;
- HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) – корреляционная ^1H – ^{13}C спектроскопия, позволяющая оценить дальние взаимодействия между углеродными атомами и протонами (как правило, через две или три связи), в то время как взаимодействия через одну связь в ходе эксперимента подавляются;
- NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера между ядрами ^1H , расположенными в пространстве на расстояниях до 5 Å (через диполь-дипольный механизм).

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Исследование процесса комплексообразования иона гадолиния с тетрапептидом

2.1.1. ^1H ЯМР спектр тетрапептида в фосфатном буферном растворе

^1H ЯМР спектр тетрапептида, растворенного в фосфатном буфере (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μl) с использованием методики подавления сигнала воды, представлен на рисунке 5. Химические сдвиги ЯМР протонов указаны в таблице 2. Химическая структура тетрапептида представлена на рисунке 15.

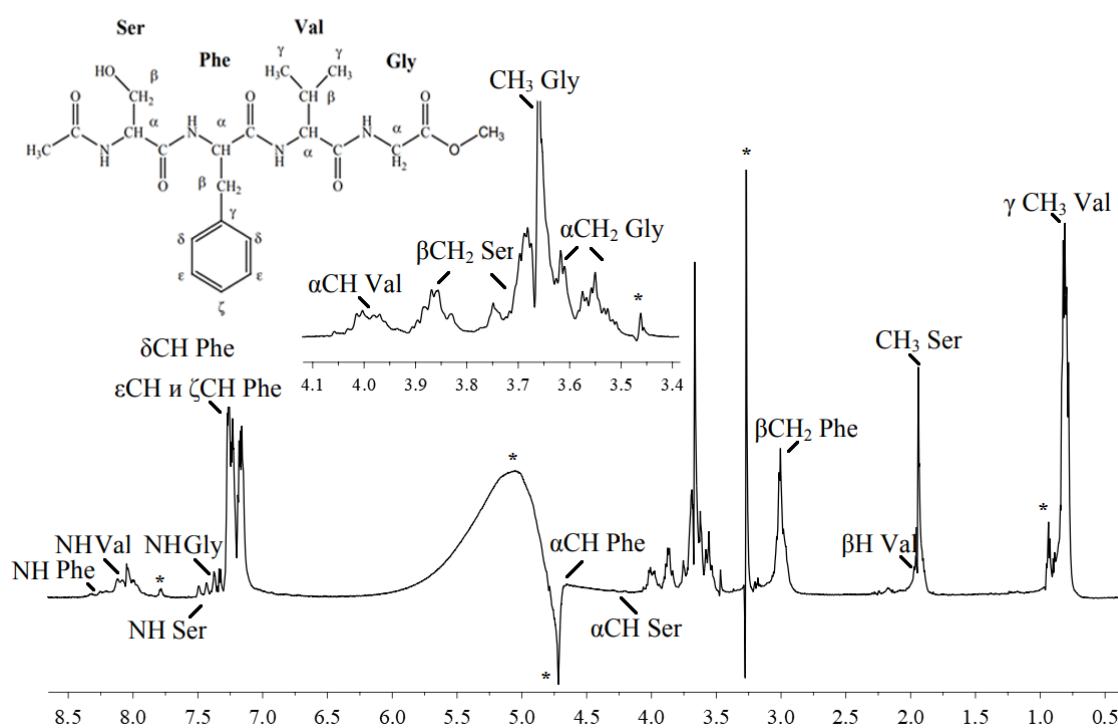


Рисунок 5 – ^1H ЯМР спектра тетрапептида $\text{NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe}$ (SFVG) в фосфатном буферном растворе (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μl),
* - звездочкой отмечены сигналы примесей и растворителя

Таблица 2 – Химические сдвиги ЯМР ^1H (δ_{H} , м.д.) соединения тетрапептида NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe в фосфатном буфере (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μl) при комнатной температуре

Остаток	HN (м.д.)	Ha (м.д.)	H β (м.д.)	H γ (м.д.)	H δ,ϵ (м.д.)
Ser	7.46	4.34	3.74; 3.86	-	-
Phe	8.24	4.68	3.04	-	7.16-7.24
Val	8.04	3.99	1.96	0.80	-
Gly	7.40	3.56; 3.63	-	-	-

В протонном спектре наблюдали 4 области скопления сигналов: 0.5 – 2.0 м.д.; 3.0 – 4.0 м.д.; 4.5 – 6.0 м.д.; 7.0 – 8.5 м.д. В области слабых полей наблюдали сигналы от амидных протонов тетрапептида (NH Ser, NH Phe, NH Val, NH Gly) и сигналы протонов бензольного кольца заместителя фенилаланина (δ , ϵ , ζ -CH Phe). Благодаря тому, что была выбрана методика подавления воды, стало возможным наблюдать сигналы от амидных протонов аминокислот серина, фенилаланина, валина, глицина. Определить их расположение удалось при наличии кросс-пиков в спектрах COSY [А], TOCSY. Нахождение сигналов от амидных протонов NH – Ser, Phe оказалось проблематичным, т.к. в двумерных спектрах проявления корреляционных взаимодействий от сигналов протонов данного типа были низкой интенсивности по сравнению с другими сигналами. Протоны бензола фенилаланина удалось найти по проявлениям кросс-пиков в спектрах TOCSY [Б], HSQC [В]. В области средних полей наблюдали несколько групп сигналов: два сигнала от растворителя, где один уширенный на 4.8 – 6.0 м.д., а второй одиночный со значением хим. сдвига 4.7 м.д.; сигнал от протона при альфа углеводе фенилаланина (α -CH Phe) на 4.68 м.д. Он перекрывается с сигналом от растворителя на 4.7 м.д. Его нахождение было установлено по наличиям кросс-пиков из COSY, TOCSY экспериментов; сигнал от протона при альфа углеводе серина (α -CH Ser) на 4.34 м.д. Он сильно уширен и с низкой интенсивностью, его расположение в спектре мы определили при

помощи двумерного спектра COSY по наличию кросс-пика. В области 3.5 – 4.0 м.д. наблюдалось скопление сигналов от протонов при альфа, бета углеродах серина, валина, глицина (β -CH₂ Ser, α -CH Val, α -CH₂ Gly) и протонов концевго заместителя глицина (CH₃ Gly): сигнал α -CH Val на 4.0 м.д.; сигналы от β -CH₂ Ser на 3.74, 3.86 м.д.; сигналы от α -CH₂ Gly на 3.56, 3.63 м.д. В области сильных полей наблюдали несколько отдельных сигналов от протонов при бета, гамма углеродах фенилаланина, валина (β -CH₂ Phe, β -CH Val, γ -CH₃ Val) и протонов концевго заместителя серина (CH₃ Ser): отдельный интенсивный сигнал от β -CH₂ Phe на 3.0 м.д.; сигнал от β -CH Val на 1.96 м.д., который перекрывается с сигналом от протонов CH₃ Ser; отдельный интенсивный сигнал от протонов γ -CH₃ Val на 0.8 м.д.

2.1.3. ¹H ЯМР спектры комплекса иона гадолиния с тетрапептидом SFVG в фосфатном буфере

¹H ЯМР спектры тетрапептида SFVG, растворенного в фосфатном буфере (90% H₂O + 10% D₂O, 500 μ l), с ионом гадолиния Gd³⁺ и без него представлены на рисунке 6. Сигналы протонов из полученных спектров были соотнесены с учетом экспериментальных данных [15]. Химическая структура тетрапептида SFVG представлена на рисунке 15. Полученные химические сдвиги ¹H ЯМР для растворенного в фосфатном буфере тетрапептида SFVG с ионом гадолиния Gd³⁺ и без него, приведены в таблице 3.

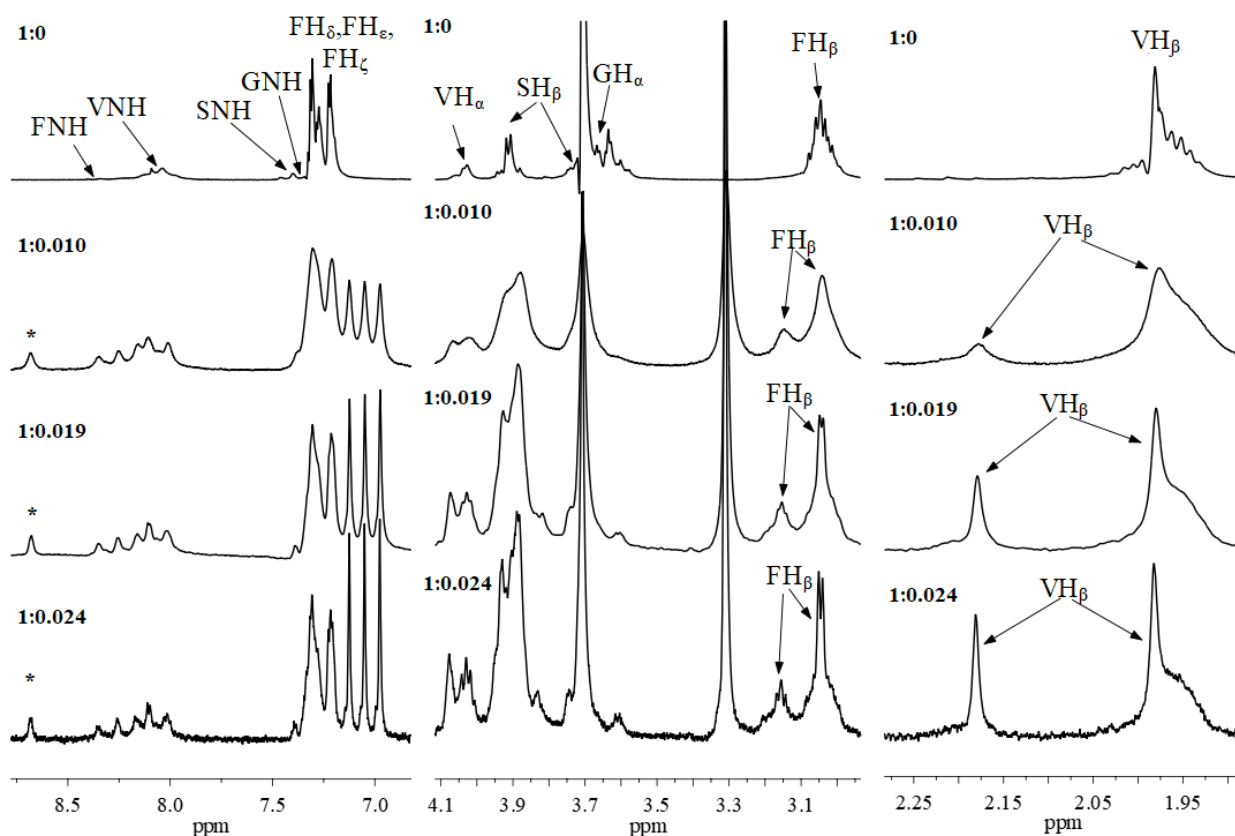


Рисунок 6 – Фрагмент(8.8 – 6.8 м.д.; 4.0 – 2.8 м.д.; 2.2 – 1.9 м.д.) ряда одномерных ^1H ЯМР спектров тетрапептида NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe с различным соотношением молярных концентраций пептид/ион в фосфатном буферном растворе (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μl), * - сигналы от примесей

Таблица 3 – Химические сдвиги (δ) ЯМР ^1H изучаемого соединения тетрапептида NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe в растворе 20 мМ фосфатного буфера (90% H_2O + 10% D_2O) с различными молярными концентрациями иона гадолиния Gd^{3+} при pH = 7.3, 293 К

Остаток	NH (м.д.)	Ha (м.д.)	H β (м.д.)	H γ (м.д.)	H δ,ϵ (м.д.)
Ser	7.46 (7.46) [7.46]	4.38 (4.31) [4.31]	3.91; 3.74 (3.90b; 3.74) [3.91b; 3.74]	-	-
Phe	8.38 (8.29b) [8.30b]	4.68 (4.68) [4.68]	3.05 (3.15b; 3.04b) [3.16b; 3.04b]	-	7.32-7.16 (7.32-7.16) [7.32-7.16]

Продолжение таблицы 3.

Остаток	NH (м.д.)	Н α (м.д.)	Н β (м.д.)	Н γ (м.д.)	Н δ, ϵ (м.д.)
Val	8.07 (8.05) [8.05]	4.04 (4.05b) [4.06b]	1.98b (2.18; 1.98b) [2.18; 1.98b]	0.86 (0.86b) [0.86b]	-
Gly	7.40 (7.38) [7.38]	3.65; 3.59 (3.62b) [3.61b]	-	-	-
b – уширенный сигнал, () – спектр с молярной концентрацией 0.100 Mm Gd ³⁺ , соотношение пептид/ион (1:0.010) [] – спектр с молярной концентрацией 0.234 Mm Gd ³⁺ , соотношение пептид/ион (1:0.024)					

При исследовании ряда ¹H ЯМР спектров комплекса тетрапептида SFVG с ионами гадолиния Gd³⁺ при различных концентрациях соли GdCl₃ были замечены следующие изменения протонного спектра: полное уширение всех резонансных сигналов (что наблюдалось и для других схожих соединений в комплексах с переходными металлами [5,6]); отрицательный сдвиг от -0.11 до -0.24 м.д. для сигналов протонов фенилаланина (H δ F, H ϵ F, H ζ F) при добавлении 0.100 мМ соли гадолиния Gd³⁺Cl₃¹⁻ (рисунок 6) (при дальнейшем увеличении концентрации соли происходило уширение сигналов без изменения их положения); чётко-выраженное расщепление на 3 сигнала для бета протонов серина (H β S) уже при концентрациях соли от 0.191 мМ; расщепление на 2 сигнала для бета протонов фенилаланина (H β F) при первичном добавлении соли (далее при увеличении концентрации наблюдалось просто уширение сигналов); положительный сдвиг на +0.16 м.д. для бета протона валина (H β V) при первичном добавлении соли гадолиния (при большем добавлении происходило уширение спектральных линий).

Изменение протонного спектра объясняется следующим образом: у сигнала протона валина β -CH(Val) (H β V), на самом деле, наблюдается не сдвиг, а именно расщепление, обусловленное анизотропией вращения

метильных групп $C_\gamma H_3$ вокруг связи $C_\alpha H - C_\beta H$, которое проявляется в присутствии иона гадолиния Gd^{3+} ; расщепление сигнала протона β - CH_2 фенилаланина ($H_\beta F$) может быть объяснено притормаживанием вращения фенольного цикла вокруг связи $C_\alpha H - C_\beta H_2$ из-за присутствия иона Gd^{3+} .

Таким образом, из эксперимента обнаружено, что происходит комплексообразование иона гадолиния и тетрапептида. Также мы предполагаем, что Gd^{3+} локализуется преимущественно в центре тетрапептида между аминокислотными остатками Phe и Val (рисунки 7, 8).

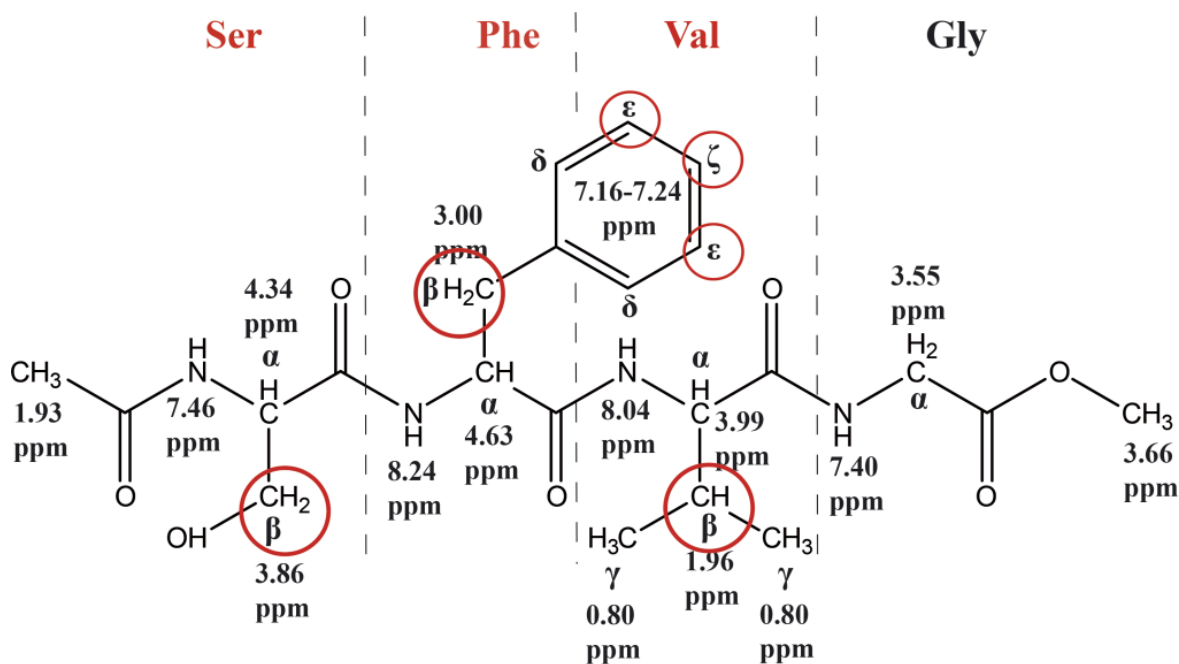


Рисунок 7 – Химическая структура тетрапептида NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe и участки аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с ионом Gd^{3+} . Фрагменты, участвующие во взаимодействии обведены красными окружностями. Соответствующие им аминокислотные остатки выделены красным цветом

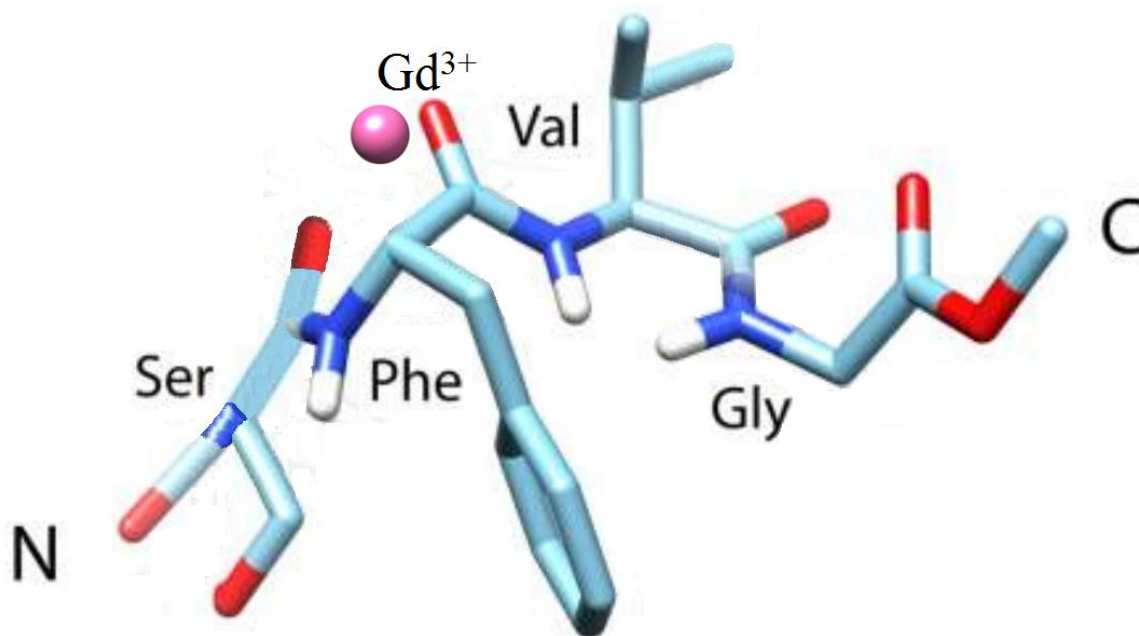


Рисунок 8 – Модель взаимодействия иона гадолиния (III) с тетрапептидом NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe [16]

2.2. Исследование процесса комплексообразования иона гадолиния с амилоидным бета пептидом $A\beta_{13-23}$

2.2.1. 1H ЯМР спектр амилоидного бета пептида $A\beta_{13-23}$ в боратном буферном растворе

1H ЯМР спектр амилоидного бета-пептида $A\beta_{13-23}$, растворенного в боратном буфере (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μ l) с использованием методики подавления сигнала воды WATERGATE, представлен на рисунке 9. Соотнесение сигналов из протонного спектра с химической структурой соединения произвели в соответствии с основными методами спектроскопии ЯМР, также сравнили полученные соотнесения с экспериментальными данными [5,6,16]. Химические сдвиги ЯМР протонов пептида $A\beta_{13-23}$ указаны в таблице 4. Химическая структура соединения представлена на рисунке 16.

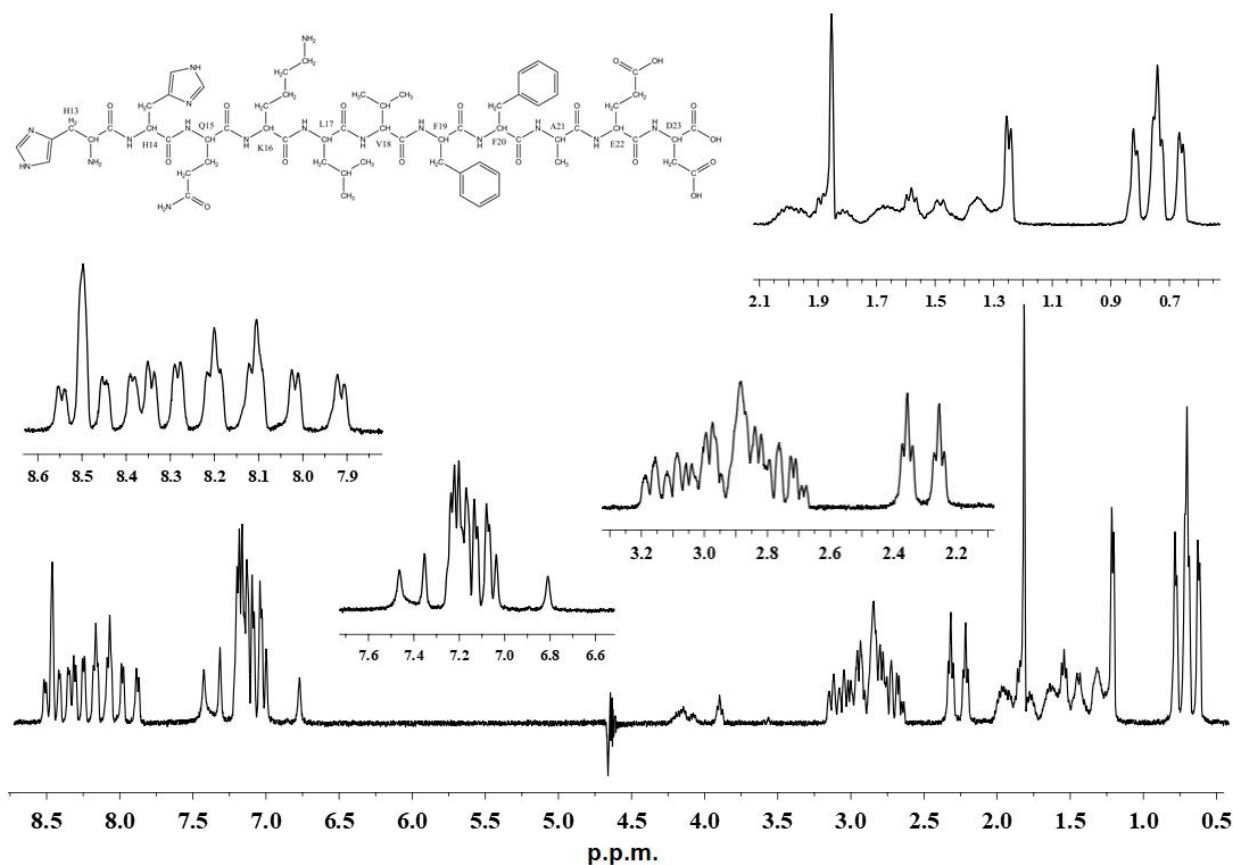


Рисунок 9 – ^1H ЯМР спектр пептида $\text{A}\beta_{13-23}$ (NHQKLVFFAED) в боратном буферном растворе (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μl при 298 K, * - сигнал примеси

Таблица 4 – Химические сдвиги ЯМР ^1H (δ_{H} , м.д.) изучаемого соединения $\text{A}\beta_{13-23}$ в растворе 20 мМ боратного буфера (90% H_2O + 10% D_2O) при pH = 7,3, 293 К.

Остаток	NH (м.д.)	Н α (м.д.)	Н β (м.д.)	Н γ (м.д.)	Прочие (м.д.)
H ₁₃	8.55	4.67	3.15, 3.03		
H ₁₄	8.60	4.6 0	3.22, 3.10		7.27, 7.22
Q ₁₅	8.25	4.24	2.00, 1.94	2.40	NH ₂ : 7.40; H δ : 7.06
K ₁₆	8.16	4.58	1.70	1.40	H δ : 1.64; H ϵ : 2.93; NH ₂ : 7.51;

Продолжение таблицы 4.

Остаток	NH (м.д.)	Ha (м.д.)	Hβ (м.д.)	Hγ (м.д.)	Прочие (м.д.)
L ₁₇	8.44	4.28	1.53	2.04	Hδ: 0.86(d), 0.80;
V ₁₈	7.96	3.98	1.86	0.78, 0.71	
F ₁₉	8.40	4.20	2.90, 2,83		7.17, 7.12
F ₂₀	8.07	4.58	3.00(d), 2.88(d)		7.18, 7.13
A ₂₁	8.17	4.17	1.30		
E ₂₂	8.50	4.18	2.06, 1.90	2.30	
D ₂₃	8.33	4.57	2.75	2.76	

2.2.2. ¹H ЯМР спектры комплекса иона гадолиния с амилоидным бета пептидом Aβ₁₃₋₂₃ в боратном буферном растворе

¹H ЯМР спектры растворенного в боратном буфере (90% H₂O + 10% D₂O, 500 μl) амилоидного пептида Aβ₁₃₋₂₃ с ионом гадолиния Gd³⁺ и без него представлены на рисунках 10, 11. Полученные химические сдвиги ¹H ЯМР спектра для растворенного в боратном буфере амилоидного пептида Aβ₁₃₋₂₃ с ионом гадолиния Gd³⁺ и без него приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Химические сдвиги (δ) ЯМР ¹H изучаемого соединения Aβ₁₃₋₂₃ в растворе 20 мМ боратного буфера (90% H₂O + 10% D₂O) с различной молярной концентрацией иона Gd³⁺ при pH = 7.3, 293 К.

Остаток	NH (м.д.)	Ha (м.д.)	Hβ (м.д.)	Hγ (м.д.)	Прочие
H ₁₃	8.55 (8.57 (d)) [8.57(d)]	4.67	3.15, 3.03 (3.16(m), 3.03(m)) [3.16(b), 3.03(b)]		
H ₁₄	8.60 (8.59 (d)) [8.59(b)]	4.60	3.22, 3.10 (3.23(m), 3.11(m)) [3.23(b), 3.11(b)]		7.27, 7.22 (7.27, 7.22) [7.27, 7.22]

Продолжение таблицы 5.

Остаток	НН (м.д.)	Нα (м.д.)	Нβ (м.д.)	Нγ (м.д.)	Прочие
Q ₁₅	8.25 (8.25(d), 8.20(d)) [8.25(b), 8.18(b)]	4.24 (4.24) [4.24(b)]	2.00, 1.94 (2.01, 1.94) [2.01(b), 1.93(b)]	2.40 (2.44) [2.45]	NH ₂ : 7.40 (7.41(b)) [7.37(b)]; H δ : 7.06
K ₁₆	8.16 (8.13(d)) [8.05(b)]	4.58	1.70 (1.75, 1.71) [1.75, 1.71]	1.40 (1.40) [1.40]	H δ : 1.64 (1.64) [1.64]; He: 2.93 (2.94) [2.95]; NH ₂ : 7.51 7.48(b) [7.45(b)];
L ₁₇	8.44 (8.43(d)) [8.43(b)]	4.28 (4.29) [4.30(b)]	1.53 (1.53) [1.53]	2.04 (2.07(d), 2.01(d)) [2.06(b)]	H δ : 0.86(d), 0.80 (0.86(d), 0.80) [0.86(d), 0.80];
V ₁₈	7.96 (7.96) [7.90(b)]	3.98 (3.98) [3.99(b)]	1.86 (1.86) [1.86(b)]	0.78, 0.71 (0.78, 0.71) [0.78, 0.71]	
F ₁₉	8.40 (8.39) [8.37(b)]	4.20 (4.20) [4.20]	2.90, 2.83 (2.89(b)) [2.89(b)]		7.17, 7.12 (7.17, 7.12) [7.17, 7.12]
F ₂₀	8.07 (8.05) [8.00(b)]	4.58	3.00(d), 2.88(d) (3.00(m), 2.89(m)) [3.00(m), 2.90(b)]		7.18, 7.13 (7.18, 7.13) [7.18, 7.13]
A ₂₁	8.17 (8.16(d)) [8.10(b)]	4.17 (4.17) [4.19(b)]	1.30 (1.30(d)) [1.29(d)]		
E ₂₂	8.50 (8.49(d)) [8.49(b)]	4.18 (4.18) [4.21]	2.06, 1.90 (2.06, 1.90) [2.06, 1.90]	2.30 (2.31) [2.31(b)]	
D ₂₃	8.33 (8.35) [8.33(b)]	4.57	2.75 (2.80) [2.80(b)]	2.76 (2.82) [2.82(b)]	
<p>d – дублет; b – уширенный сигнал, m – мультиплет. () – спектр с молярной концентрацией 0.191 Mm Gd³⁺, соотношение пептид/ион (1:0.127) [] – спектр с молярной концентрацией 0.353 Mm Gd³⁺, соотношение пептид/ион (1:0.235)</p>					

Химические сдвиги протонных сигналов амилоидного пептида $A\beta_{13-23}$ в боратном буфере с ионом Gd^{3+} и без него значительно отличались. При исследовании полученных 1H ЯМР спектров с ионами гадолиния Gd^{3+} были замечены следующие изменения протонного спектра.

В амидной области (8.7 – 7.4 м.д.), представленной на рисунке 10, у некоторых сигналов от амидных протонов при увеличении концентрации Gd^{3+} наблюдалось заметное уширение сигналов с последующим подавлением, сдвиг резонансных сигналов, дробление сигналов. Наиболее важные изменения в данной области наблюдались для отрицательно заряженных аминокислотных остатков глутаминовой кислоты (E_{22}) и аспарагиновой кислоты (D_{23}) – их сигналы $H_N E_{22}$, $H_N D_{23}$ уширились и подавились; у неполярного аминокислотного остатка лейцина (L_{17}) сигнал $H_N L_{17}$ уширился и подавился; у полярного аминокислотного остатка глутамина (Q_{15}) сигнал $H_N Q_{15}$ разделился на две линии и затем обе линии $H_N Q_{15}$ подавились с уширением. Сигнал от амидных протонов неполярного аминокислотного остатка аланина ($H_N A_{21}$) и положительно заряженного аминокислотного остатка лизина ($H_N K_{16}$) сначала разделился на два отдельных сигнала $H_N A_{21}$, $H_N K_{16}$, а затем оба сигнала сдвинулись в область сильных полей, при этом сигнал $H_N K_{16}$ незначительно сузился, а сигнал $H_N A_{21}$ уширился. Сигнал от амидного протона валина ($H_N V_{18}$) сдвинулся в область сильных полей с уширением. Сигналы от амидных протонов двух соседних аминокислотных остатков фенилаланина ($H_N F_{19}$, $H_N F_{20}$) незначительно уширились и сдвинулись в область меньших химических сдвигов, причем сдвиг сигнала амидного протона $H_N F_{20}$ оказался большим, чем у протона $H_N F_{19}$. Сигнал амидного протона лейцина ($H_N H_{14}$) сместился в область сильных полей и с подавлением, а сигнал протона соседнего аминокислотного остатка $H_N H_{13}$ незначительно сместился в область слабых полей без уширения. Сигналы от протонов аминогрупп (NH_2) аминокислотных остатков лизина (K_{16}) и глутамина (Q_{15}) также сдвинулись в область сильных полей и затем уширились.

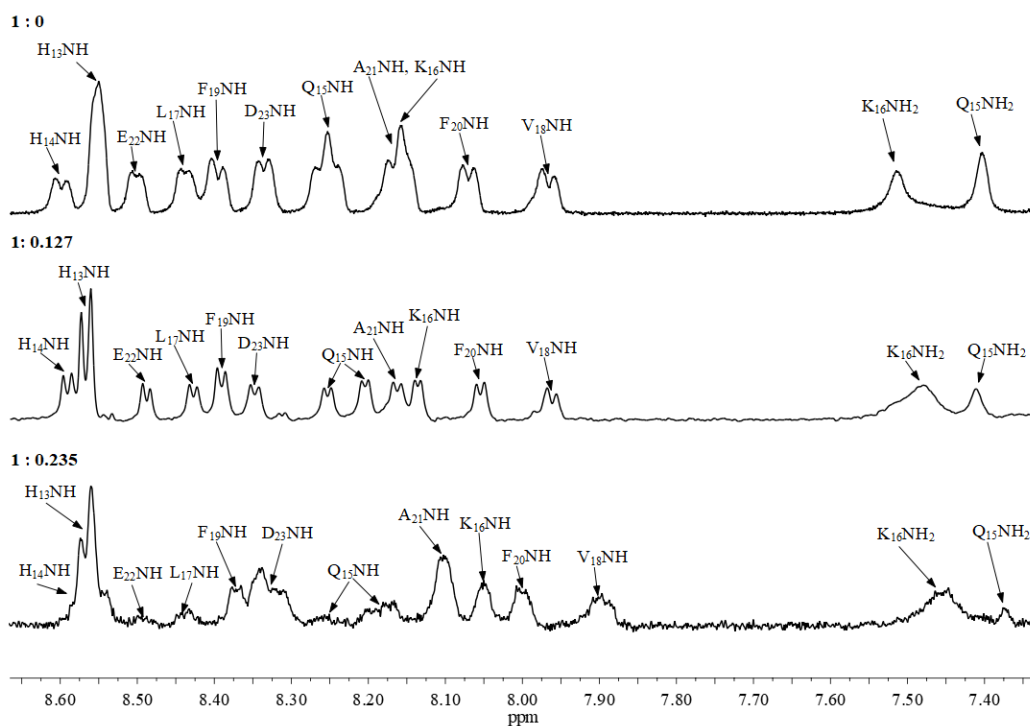


Рисунок 10 – Амидная область ^1H ЯМР спектров $\text{A}\beta_{13-23}$ в боратном буферном растворе (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μl) с различным соотношением молярных концентраций пептид/ион

В области 3.0 – 2.2 м.д. ^1H ЯМР спектра (рисунок 8) сигналы бета протонов (H_β) аминокислотных остатков F_{19} , F_{20} , D_{23} , гамма протонов (H_γ) аминокислотных остатков Q_{15} , L_{17} , E_{22} и протонов аминокислотного остатка K_{16} (H_ϵ) также заметно изменились при увеличении концентрации иона Gd^{3+} . Сигнал протонов фенилаланина $\text{F}_{19}\text{H}_\beta$ сдвинулся в область слабых полей (положительный сдвиг), разделился на дуплет, а затем часть сигнала слилась с сигналом от $\text{F}_{20}\text{H}_\beta$, а другая часть дуплета заметно уширилась. Сигнал протонов от соседнего аминокислотного остатка фенилаланина $\text{F}_{20}\text{H}_\beta$ сначала разделился на дуплет, незначительно сдвинулся в область больших химических сдвигов и затем часть дуплета уширилась. Сигнал протонов аспарагиновой кислоты $\text{D}_{23}\text{H}_\beta$ сдвинулся в область слабых полей и затем уширился. Сигнал протонов лизина $\text{K}_{16}\text{H}_\epsilon$ незначительно сдвинулся в область слабых полей. Триpletный сигнал гамма протонов аминокислотного

остатка $Q_{15}H_\gamma$ сначала перешел в один сигнал, и затем он разделился на дуплет, у которого одна часть значительно уширилась, а другая его часть сигналов незначительно сдвинулась в область слабых полей. Сигнал протонов $E_{22}H_\gamma$ при увеличении концентрации Gd^{3+} значительно уширился. Сигнал протонов $L_{17}H_\gamma$ незначительно сдвинулся в область слабых полей.

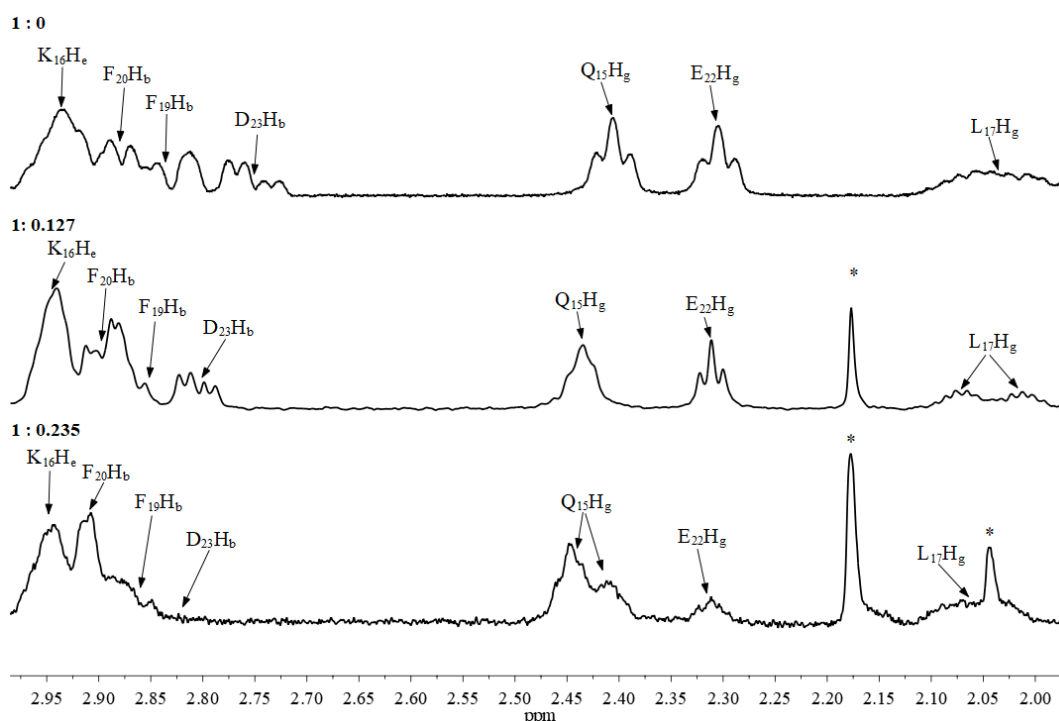


Рисунок 11 – Область сигналов 3.0 – 2.2 м.д. 1H ЯМР спектров $A\beta_{13-23}$ в боратном буферном растворе (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μl) с различным соотношением молярных концентраций пептид/ион, * - сигналы от примесей

Наличие подобных изменений спектра говорит о том, что в амидной области и в области 3.0 – 2.2 м.д. протоны пептида $A\beta$ испытывают влияние иона Gd^{3+} . Уширение спектральных линий происходит за счёт увеличения скорости релаксации, данный эффект – следствие пространственной близости с парамагнитным ионом Gd^{3+} . Заметное уширение сигналов $H_N E_{22}$, $H_N D_{23}$, $H_N Q_{15}$, $H_N L_{17}$, $NH_2 K_{16}$, $NH_2 Q_{15}$, $H_N V_{18}$ позволяет нам предположить, что в данных участках амилоидного пептида $A\beta_{13-23}$ наблюдается место

локализации иона Gd^{3+} . На рисунке 12 представлен график зависимости изменения ширины линии в ЯМР спектре от концентрации иона Gd^{3+} .

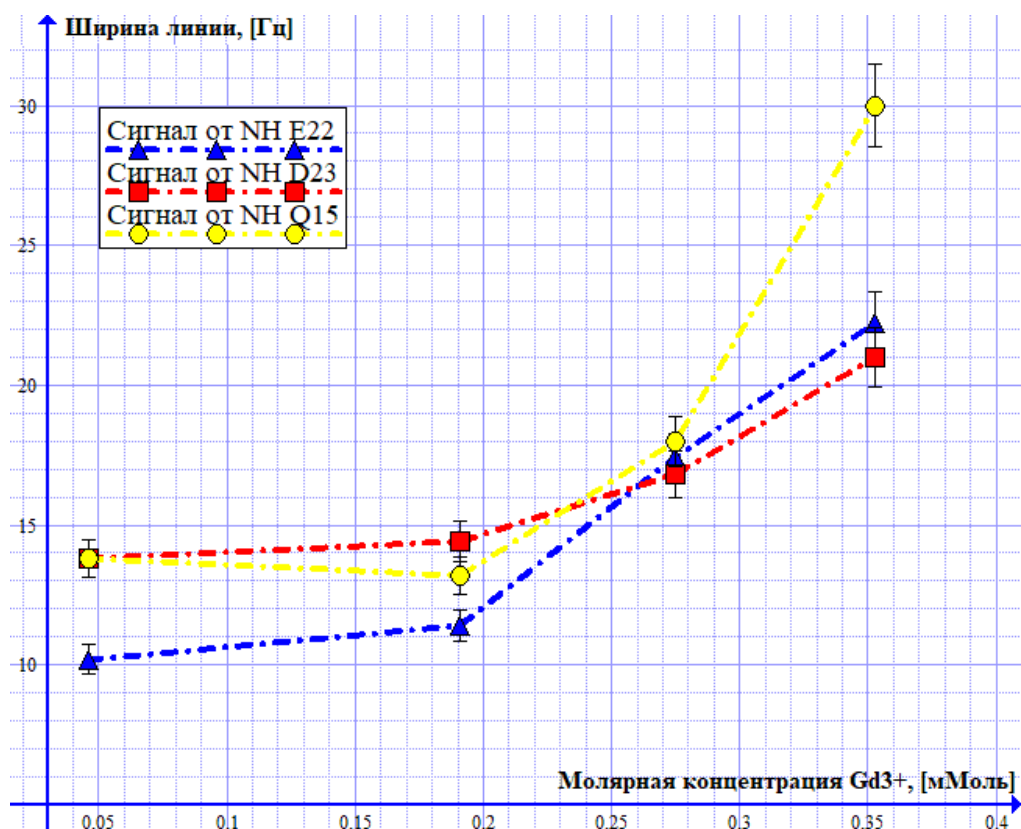


Рисунок 12 –График зависимости ширины линии в ЯМР спектре от концентрации иона Gd^{3+} . На графике представлены линии ЯМР сигналов от амидных протонов аминокислотных остатков Gln(Q₁₅), Glu(E₂₂), Asp(D₂₃)

Сдвиг резонансных сигналов происходит за счет того, что присутствует смещение электронов окружающих ядро, для которого наблюдается резонанс, в результате у атома ядра меняется электронная плотность, что приводит либо к экранированию ядра (внутренние электроны атома располагаются плотнее к ядру), либо к разэкранированию (внутренние электроны атома отдаляются от ядра). Если происходит разэкранирование ядра окружающими его электронами, то его резонансный сигнал на ЯМР спектре сместится в область слабых полей (в сторону больших химических сдвигов), в случае экранирования ядра окружающими электронами, сигнал от

ядра в ЯМР спектре, наоборот, сместится в область сильных полей (в сторону меньших химических сдвигов). Таким образом, сдвиг сигналов $H_N A_{21}$, $H_N K_{16}$, $H_N V_{18}$, $H_N F_{19}$, $H_N F_{20}$, $H_N H_{14}$, $NH_2 K_{16}$, $NH_2 Q_{15}$, $F_{20} H_\beta$ в область меньших химических сдвигов объясняется тем, что в данных участках пептида происходит эффект экранирования электронами ядер данных фрагментов при добавлении положительного иона гадолиния. А сдвиг сигналов $D_{23} H_\beta$, $F_{19} H_\beta$, $K_{16} H_\epsilon$, $Q_{15} H_\gamma$, $L_{17} H_\gamma$ в область больших химических сдвигов, объясняется тем, что в данных участках пептида, наоборот, происходит эффект разэкранирования электронами ядер при добавлении положительного иона гадолиния.

Разделение некоторых сигналов можно объяснить следующим образом. Изначально ЯМР спектр, в котором присутствует эффект быстрого обмена, представляет собой усреднённую картину положений ядер. Пик ЯМР линии соответствует наиболее вероятному положению ядра с соответствующей резонансной частотой. Если же у ядра мы будем видеть расщепление изначальной линии на две линии с характерными пиками, то это будет соответствовать двум наиболее вероятным положениям ядра в молекуле. Таким образом, можно описать поведение сигналов полярного аминокислотного остатка Q_{15} . Сигналы $H_N Q_{15}$, $Q_{15} H_\gamma$ в ходе взаимодействия с положительным ионом Gd^{3+} разделились на две линии, что соответствует тому, что в аминокислотном остатке Q_{15} в ходе пространственного сближения с ионом гадолиния произошло уменьшение эффекта быстрого обмена и возникло два наиболее вероятного расположения полярного радикала, у которого на окончании положительная NH_2 и отрицательная CO группы. Также в данном участке происходит торможение вращения карбоксильной группы (CO) пептидной связи между аминокислотными остатками $Gln(Q_{15})$ и $Lys(K_{16})$, что приводит к уменьшению эффекта быстрого обмена между ионом Gd^{3+} и участком аминокислотного остатка Q_{15} . Предположительно линии $H_N Q_{15}$ (8.25 м.д.), $Q_{15} H_\gamma$ (2.01 м.д.) соответствуют такой конформации, когда ион гадолиния локализуется между

NH и NH₂ фрагментами аминокислотного остатка Q₁₅, а линии H_NQ₁₅(8.18 м.д.), Q₁₅H_γ(1.93 м.д.) соответствуют расположению иона гадолиния между NH и CO фрагментами аминокислотного остатка Q₁₅. Расщепление сигнала от двух протонов H_NA₂₁(8.17 м.д.), H_NK₁₆(8.16 м.д.) на две отдельные линии можно объяснить тем, что в ходе взаимодействия иона Gd³⁺ с Aβ₁₃₋₂₃ протоны H_NA₂₁ и H_NK₁₆ разэкранировались и их сигналы сместились в область меньших химических сдвигов. Для протона H_NK₁₆ данный эффект проявляется сильнее, чем для протона H_NA₂₁, поэтому его резонансный сигнал сместился дальше в область сильных полей, чем у протона H_NA₂₁.

Таким образом, мы предполагаем, что Gd³⁺ может локализоваться преимущественно в местах сцепления аминокислотных остатков (пептидная связь NH-CO). Наиболее вероятно, что ион гадолиния локализуется у аминокислотных остатков Gln(Q₁₅), Lys(K₁₆), Leu(L₁₇), Glu(E₂₂), Asp(D₂₃). (рисунки 13,14).

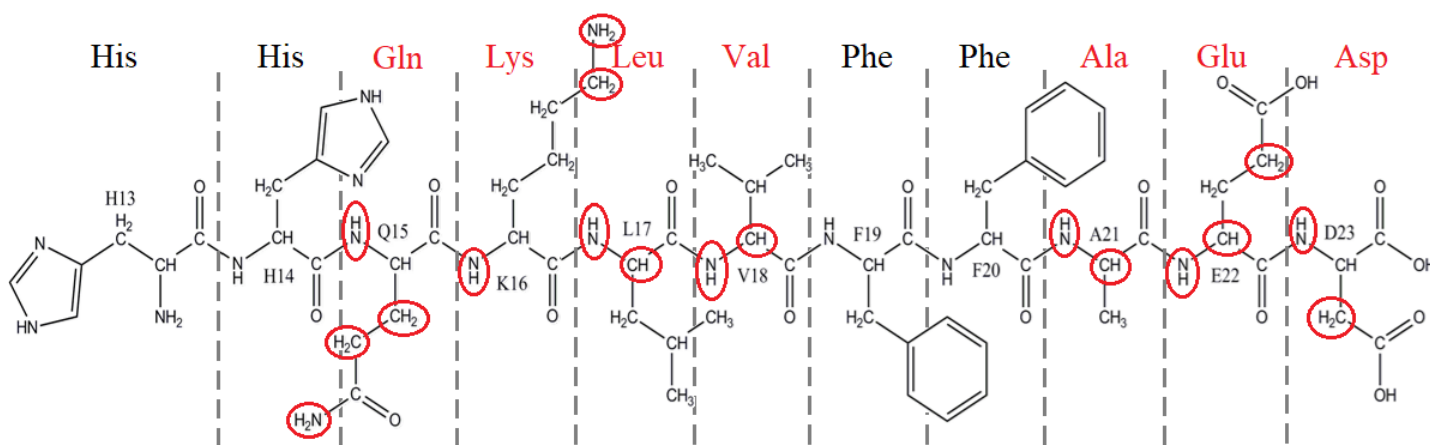


Рисунок 13 – Химическая структура бета-амилоидного пептида Aβ₁₃₋₂₃ (NHQKLVFFAED) и участки аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с ионом Gd³⁺. Фрагменты, участвующие во взаимодействии обведены красными окружностями

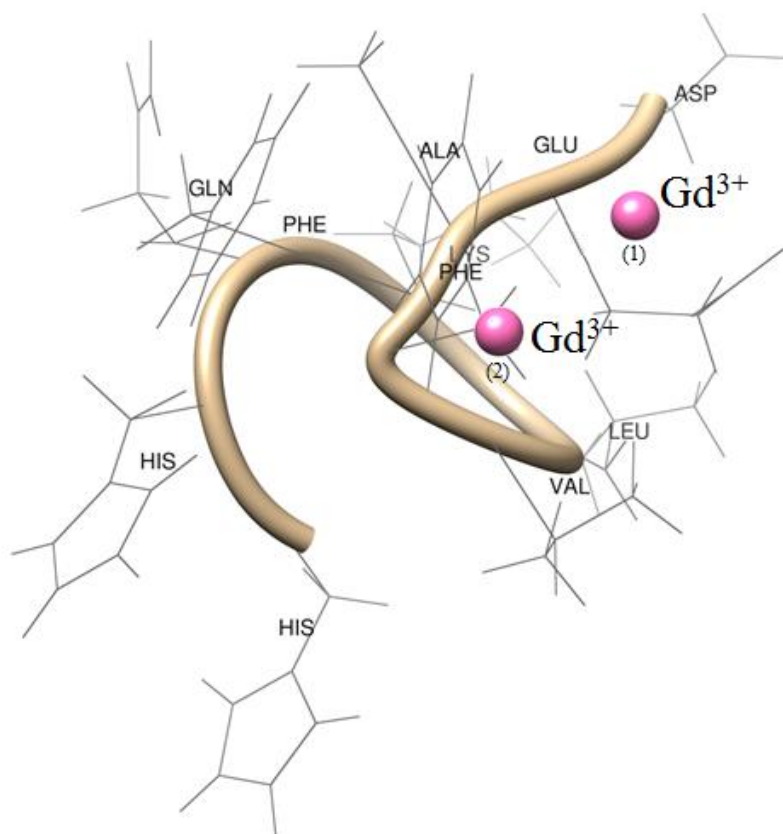


Рисунок 14 - Модель взаимодействия иона гадолиния (III) с пептидом $A\beta_{13-23}$ [6]. (1), (2) – Возможные места локализации иона Gd^{3+} с наиболее значительным эффектом на структуру $A\beta_{13-23}$

2.4 Материалы и методы

Тетрапептид NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe (SFVG) (рисунок 15) включает в себя четыре аминокислотных остатка: серин, фенилаланин, валин, глицин. Тетрапептид SFVG удобно использовать в качестве модели, так как он представляет собой фрагмент белка. В данном пептиде присутствуют полярные, ароматические и заряженные аминокислотные остатки, каждый из которых может по-разному взаимодействовать с положительным ионом гадолиния Gd^{3+} .

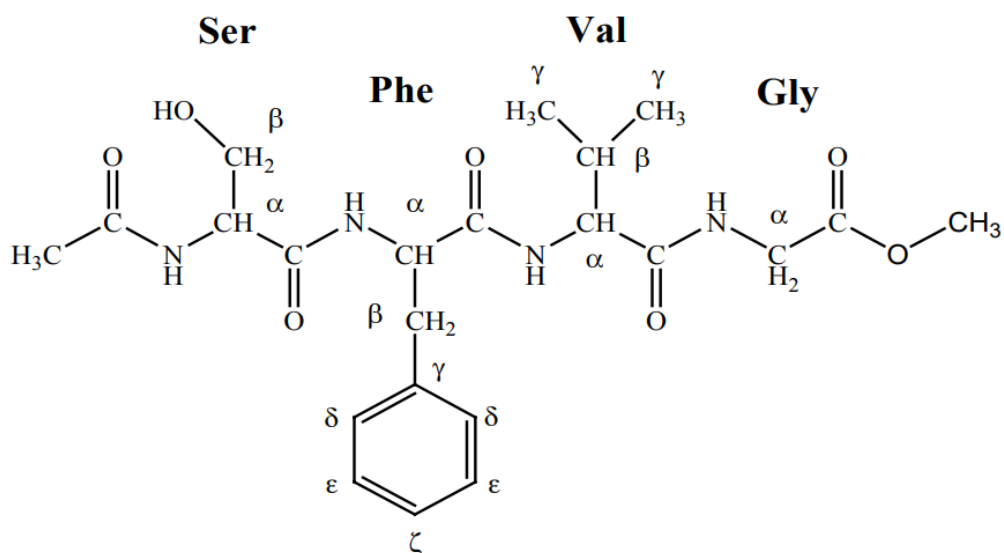


Рисунок 15 – Химическая структура тетрапептида NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe (SFVG).

Пептид A β ₁₃₋₂₃ (рисунок 16) состоит из одиннадцати аминокислотных остатков. В данном пептиде аминокислотные остатки E₂₂ и D₂₃ полярные и заряжены отрицательно, аминокислотные остатки K₁₆, H₁₃, H₁₄ так же обладают полярностью, но заряжены положительно. Аминокислотный остаток Q₁₅ полярный и незаряженный, а остальные аминокислотные остатки неполярные и незаряженные.

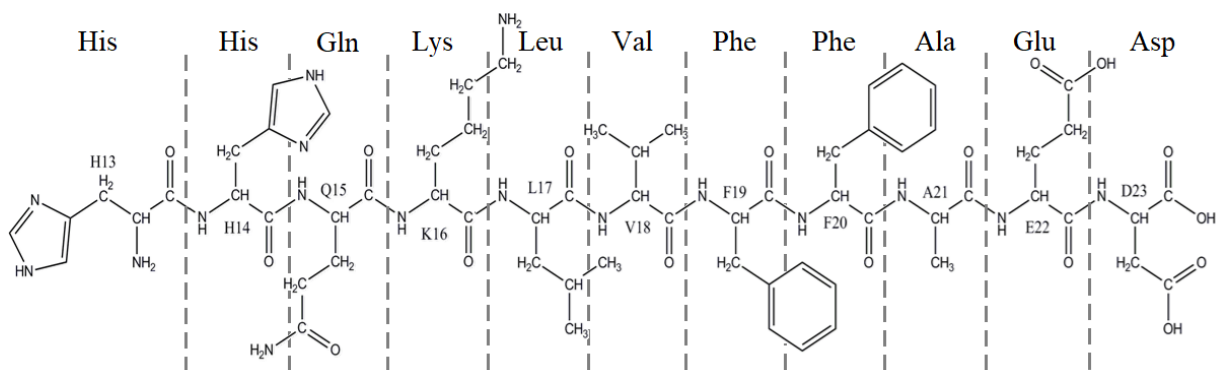


Рисунок 16 – Химическая структура бета-амилоидного пептида A β ₁₃₋₂₃ (HHQKLVFFAED).

Регистрация ^1H ЯМР спектров тетрапептида SFVVG в фосфатном буфере (90% H_2O + 10% D_2O , pH = 7.3) и амилоидного пептида $\text{A}\beta_{13-23}$ в боратном буферном растворе (90% H_2O + 10% D_2O , pH = 7.3) с добавлением GdCl_3 и без него происходила при комнатной температуре с использованием импульсного ЯМР спектрометра Bruker, Avance III HD-700MHz (Bruker, Avance III 700).

^1H ЯМР спектры регистрировали с использованием 90° импульсов, задержка между импульсами 2 с, ширина спектра 12 м.д., число накоплений от 16. Для подавления сигнала воды использовали импульсную последовательность WATERGATE. Для получения спектров была использована программа TOPSPIN(3.0), для анализа и обработки спектров применялась программа MestReNova. Соотнесение спектральных линий в ^1H ЯМР спектрах производили при помощи методов ЯМР спектроскопии высокого разрешения.

Все образцы были приготовлены в стандартных 5-мм ЯМР-пробирках. Концентрации веществ составляли 9.6 мМ (SFVVG), 1.5 мМ ($\text{A}\beta_{13-23}$) и 0.1 – 0.4 мМ (GdCl_3). Объем раствора составлял 0.5 мл. Дейтериевые сигналы растворителя использовались для стабилизации магнитного поля.

Заключение

- Зарегистрированы одномерные ^1H ЯМР спектры тетрапептида в фосфатном буфере и амилоидного бета пептида $\text{A}\beta_{13-23}$ в боратном буфере и их комплексов с ионом Gd^{3+} при комнатной температуре. Проведено полное соотнесение сигналов ^1H ЯМР спектров исследуемых соединений тетрапептида и амилоидного бета пептида в водных растворах при комнатной температуре и получены их химические сдвиги.
- На основе данных полученных из одномерных ^1H ЯМР спектров тетрапептида с GdCl_3 в фосфатном буфере обнаружено, что происходит комплексообразование иона Gd^{3+} и тетрапептида. Фрагмент тетрапептида, наиболее активно участвующий во взаимодействии с ионом Gd^{3+} – это центральная часть между аминокислотными остатками Phe и Val. Данный фрагмент является наиболее вероятным местом локализации иона Gd^{3+} в тетрапептиде.
- На основе данных полученных из одномерных ^1H ЯМР спектров амилоидного бета пептида $\text{A}\beta_{13-23}$ с GdCl_3 в боратном буфере обнаружено, что происходит комплексообразование иона Gd^{3+} и пептида $\text{A}\beta_{13-23}$. Фрагменты пептида $\text{A}\beta_{13-23}$, наиболее активно участвующий во взаимодействии с ионом Gd^{3+} – это центральная часть между аминокислотными остатками Lys(K₁₆) и Leu(L₁₇) и центральная часть между аминокислотными остатками Glu(E₂₂) и Asp(D₂₃). Данные фрагменты являются наиболее вероятными местами локализации иона Gd^{3+} в амилоидном бета пептиде $\text{A}\beta_{13-23}$.

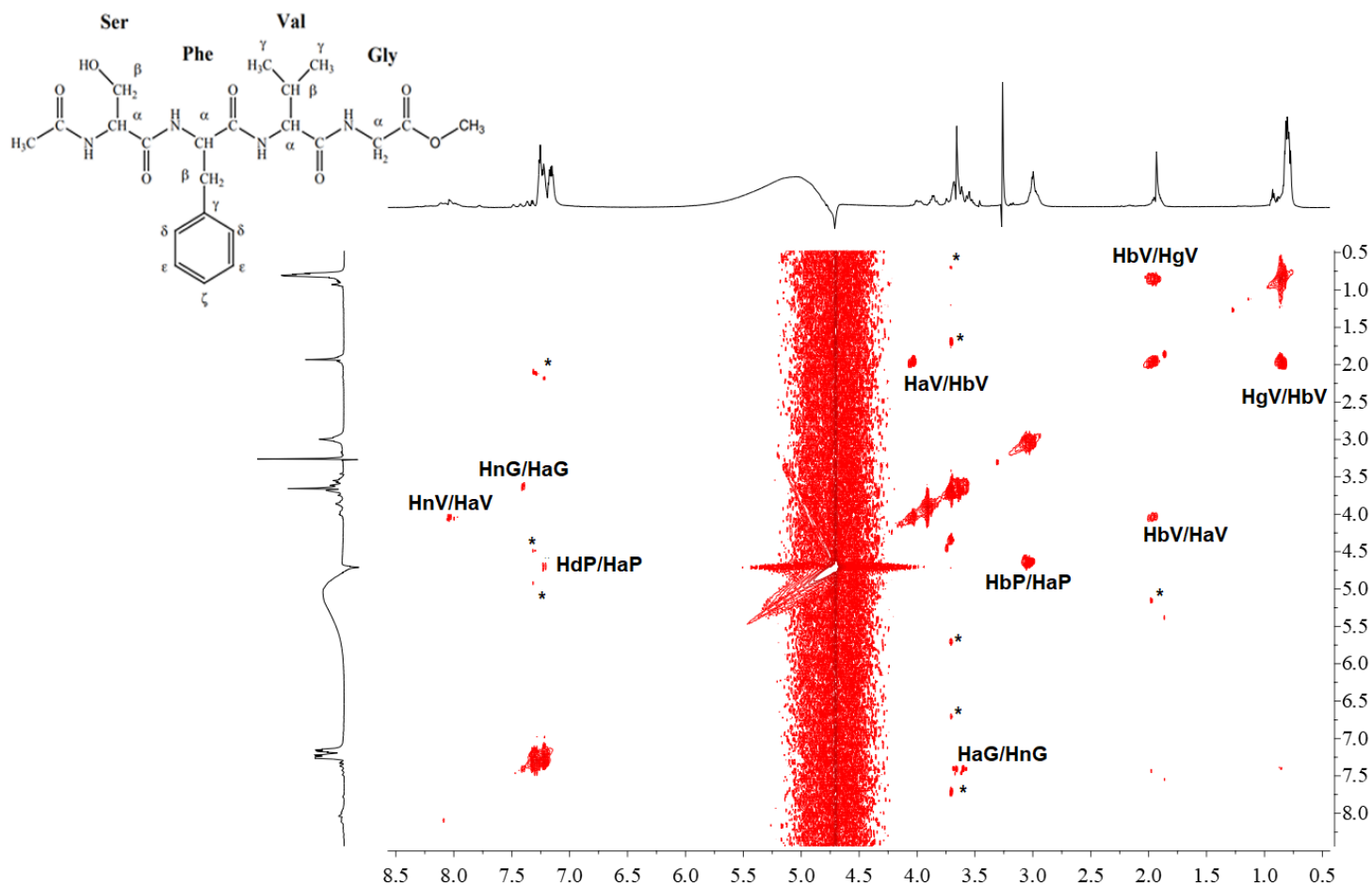
Список литературы

1. Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics / J. Hardy, D. J. Selkoe. – Текст : непосредственный // Science. – 2002. – Vol. 297, N 5580. – P. 353-356.
2. Model-free global tractography / L. V. Konopleva, K. A. Il'yasov, H. Skibbe [et al.]. – Текст : непосредственный // NeuroImage. – 2018. – Vol. 174. – P. 576-586.
3. Ramalho, M. Gadolinium Retention and Toxicity — An Update / M. Ramalho, J. Ramalho, L. M. Burke. – Текст : непосредственный // Adv. Chronic Kidney Dis. – 2017. – Vol. 24, N 3. – P. 138–146.
4. Casarini, D. Recent advances in stereodynamics and conformational analysis by dynamic NMR and theoretical calculations / D. Casarini, L. Lunazzi, A. Mazzanti. – Текст : непосредственный // Eur. J. Org. Chem. – 2010. – Vol. 1, N 11. – P. 2035-2056.
5. NMR Studies of the Mn^{2+} Interactions with Amyloid Peptide $A\beta_{13-23}$ in Water Environment / R. J. Abdrakhmanov, D. S. Blokhin, K. S. Usachev, F. K. Karataeva, V. V. Klochkov [et al.]. – Текст : непосредственный // BioNanoScience. – 2017. – Vol. 7. – P. 204-206.
6. Modeling the Co^{2+} Binding to Amyloid Peptide $A\beta_{13-23}$ in Water Environment by NMR Spectroscopy / R. J. Abdrakhmanov, D. S. Blokhin, K. S. Usachev, V. V. Klochkov. – Текст : непосредственный // BioNanoScience. – 2018. – Vol. 8. – P. 423-427.
7. Gadolinium deposition in the brain: summary of evidence and recommendations / V. Gulani, F. Calamante, F. G. Shellock [et al.]. – Текст : непосредственный // The Lancet. Neurology. – 2017. – Vol. 16, N 7. – P. 564–570.
8. Comparison of Gadolinium Concentrations within Multiple Rat Organs after Intravenous Administration of Linear versus Macrocyclic Gadolinium Chelates /

- R. J. McDonald, J. S. McDonald, D. Dai [et al.]. – Текст : непосредственный // Radiology. – 2017. – Vol. 285, N 2. – P. 536-545.
9. Syrkashev, E. M. Gadolinium deposition in cerebral tissue after intravenous injection of linear type contrast agent / E. M. Syrkashev, V. G. Bychenko, V. E. Sinitsyn. – Текст : непосредственный // REJR. – 2018. – Vol. 8, N 3. – P. 113-121.
10. Дэроум, Э. Современные методы ЯМР для химических исследований : монография / Э. Дэроум. Пер. с англ. – Москва : Мир, 1992. – 401 с. – ISBN 5-03-001750-х. – Текст : непосредственный.
11. Эрнст, Р. ЯМР в одном и двух измерениях : учебно-методическое пособие / Р. Эрнст, Д. Боденхаузен, А. Вокаун ; Пер. с англ. – Москва : Мир, 1990. – 711 с. – ISBN 5-03-001394-6. – Текст : непосредственный.
12. Нифантьев, И. Э. Практический курс спектроскопии ядерного магнитного резонанса : учебно-методическое пособие / И. Э. Нифантьев, П. В. Ивченко ; Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. – Москва : МГУ, 2006. – 200 с. – Текст : непосредственный.
13. Каратаева, Ф. Х. Спектроскопия ЯМР в органической химии. Часть I. Общая теория ЯМР. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C : учебно-методическое пособие / Ф. Х. Каратаева, В. В. Клочков ; Казанский федеральный университет. – Казань : КФУ, 2013. – 129 с. – Текст : непосредственный.
14. Тоукач, Ф. В. Применение двумерной спектроскопии ЯМР в органической химии : учебно-методическое пособие / Ф. В. Тоукач, П. А. Беляков ; Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова. – Москва : МИТХТ, 2006. – 36 с. – Текст : непосредственный.
15. Blokhin, D. S. Spatial structure of tetrapeptide N-Ac-Ser-Phe-Val-Gly-OMe in "protein-micelle of sodium dodecyl sulfate" complex and in solid state by NMR spectroscopy / D. S. Blokhin, V. V. Klochkov, S. Berger. – Текст : непосредственный // Magnetic Resonance in Solids. – 2013. – Vol. 15, N 2. – P. 13202-13209.

16. Solution structures of Alzheimer's amyloid A β_{13-23} peptide: NMR studies in solution and in SDS / K. S. Usachev, A. V. Filippov, E. A. Filippova [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of Molecular Structure. – 2013. – Vol. 1049. – P. 436-440.

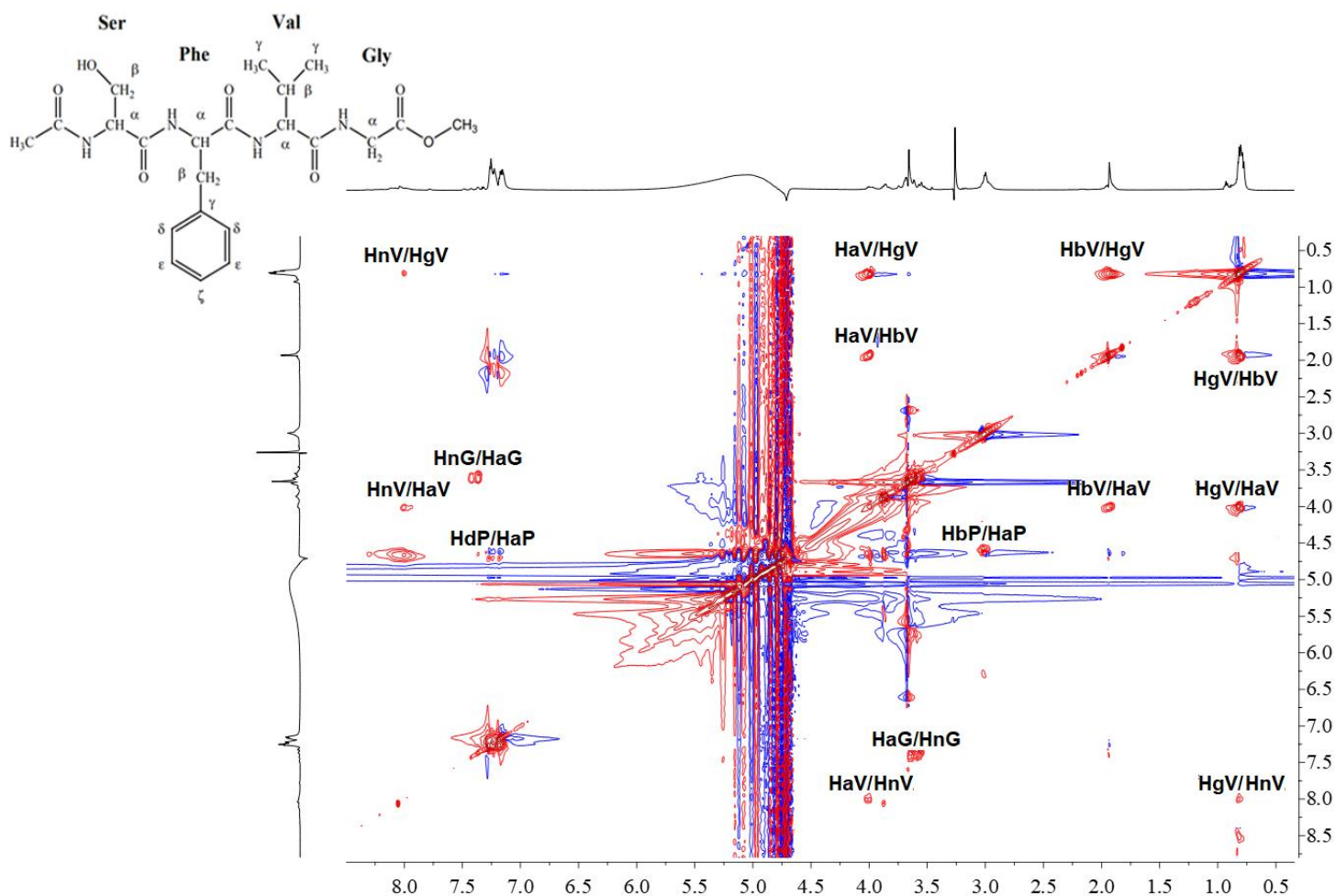
Приложение А



Двумерный ^1H - ^1H COSY ЯМР спектр тетрапептида NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe в буферном растворе (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μl),

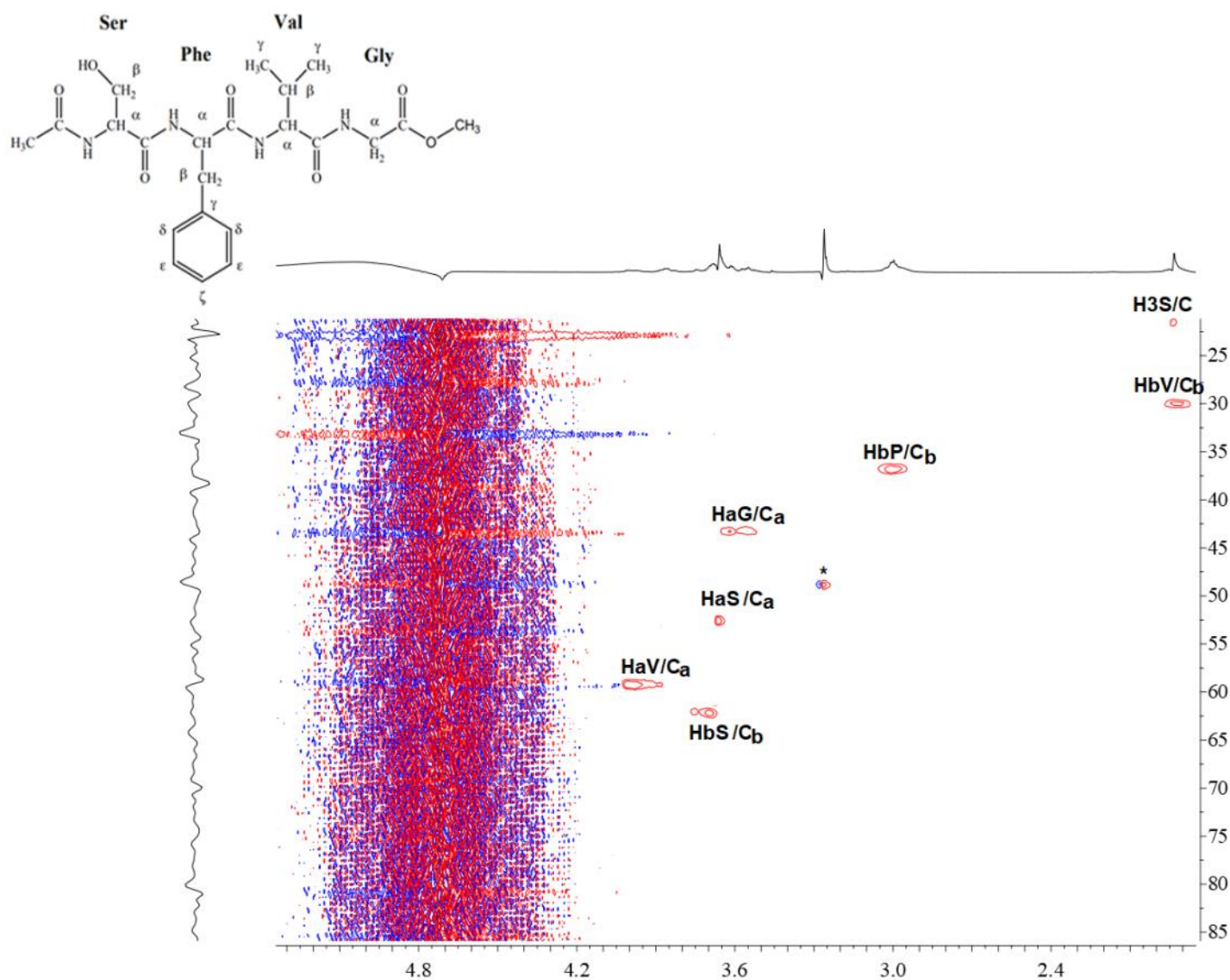
* - звездочкой отмечены сигналы примесей

Приложение Б



Двумерный ^1H - ^1H TOCSY ЯМР спектр тетрапептида NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe в буферном растворе (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μl)

Приложение В



Двумерный ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР спектр тетрапептида NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe в буферном растворе (90% H_2O + 10% D_2O , 500 μl),

* - звездочкой отмечен сигналы примеси